

DALILA GIANINI SUTERIO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO RELATIVA DE GENES PRÓ E  
ANTIVIRAL EM CÉLULAS JURKAT ESTIMULADAS COM A  
PROTEÍNA TAT DO HIV-1**

Trabalho de Conclusão de Curso  
submetido ao Centro de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de  
Santa Catarina para a obtenção do Grau  
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo  
Roberto Pinto

Coorientador: Msc. Jéssica Campestrini

Florianópolis  
2017

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

Suterio, Dalila Gianini

Análise da expressão relativa de genes pró e  
antiviral em células Jurkat estimuladas com a  
proteína Tat do HIV-1 / Dalila Gianini Suterio ;  
orientador, Aguinaldo Roberto Pinto, coorientador,  
Jéssica Campestrini, 2017.

58 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de  
Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,  
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. HIV. 3. Tat. 4.  
moléculas antivirais. 5. controle da infecção. I.  
Pinto, Aguinaldo Roberto . II. Campestrini,  
Jéssica. III. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Dalila Gianini Suterio

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO RELATIVA DE GENES PRÓ E  
ANTIVIRAL EM CÉLULAS JURKAT ESTIMULADAS COM A  
PROTEÍNA TAT DO HIV-1**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, e aprovado em sua forma final pelo Centro de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 22 de Novembro de 2017.

---

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Dr.<sup>a</sup> Naira Fernanda Zanchett Schneider  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Msc. Douglas Bardini Silveira  
Universidade Federal de Santa Catarina



Este trabalho é dedicado à minha família e a todos que de alguma contribuíram para a elaboração deste trabalho.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus e à Nossa Senhora Aparecida por sempre iluminar o meu caminho e guiar os meus passos. Agradeço à mim, por fazer as escolhas certas e aproveitar as oportunidades que apareceram ao longo da minha trajetória, pois se eu não tivesse me encantado pelas aulas de imunologia do professor Zanetti, eu não teria conhecido o meu orientador.

Meu orientador, Aguinaldo Roberto Pinto, agradeço pela orientação e por toda a paciência neste um ano e meio de parceria. Por ter me aceitado mesmo sabendo dos meus medos e anseios com a escrita, ele foi muito importante no meu desenvolvimento durante esse período. Agradeço por me ver como pessoa e sempre perguntar se eu estava bem (acho que já sabia do meu forte lado emocional), o que muitas vezes me deu forças para continuar minha caminhada sem perder o foco.

Agradeço também a Jéssica Campestrini minha co-orientadora, por deixar eu acompanhar seus experimentos e ir me ensinando tudo o que sabe, principalmente sobre a encantadora Tat. E pelas produtivas reuniões onde discutimos sobre o destino do meu projeto (visto que mudei algumas vezes), que com certeza auxiliaram no meu desenvolvimento crítico.

Agradeço o pessoal do Laboratório de Imunologia Aplicada (LIA) que foram receptivos comigo e estavam sempre dispostos a ajudar. Obrigada pelos ensinamentos, pelas conversas e pelas confraternizações. Ao pessoal do Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) que liberaram o equipamento para eu fazer meus experimentos e sempre estavam dispostos a ajudar. Em especial, agradeço ao Douglas Bardini (LIA) por ter aceito fazer parte da banca do meu TCC, e principalmente à Naira Schneider (LVA), pois além de fazer parte da banca também se disponibilizou para a correção do meu projeto de TCC.

Gostaria de agradecer também a todos os professores que tive ao longo desses cinco anos que de alguma forma acrescentaram na minha formação e em mim, como pessoa. Aos colegas e amigos de faculdade que levarei comigo sempre e aos bons momentos que tivemos juntos, além de todos que estiveram ao meu lado durante a confecção deste trabalho.

Principalmente ao meu inenarrável namorado (sim, ele me obrigou!), Ricardo Siementcoski por ter me aturado ao longo de todo o processo de escrita. Por estar ao meu lado neste momento tão importante da minha vida e por sempre apoiar meus próximos passos.

Por fim, agradeço minha família pois foi fundamental nessa minha caminhada até aqui. Obrigada por “nunca terem cogitado” a hipótese de me fazer mudar para medicina por achar que eu levo jeito, mas mesmo assim ouviram a minha escolha, me apoiaram na Biologia e fizeram de tudo para eu me formar. Agradeço a minha irmãzinha Marcela por compreender a minha ausência e agradeço a minha outra irmã Natália pela parceria e por estar presente nos momentos bons e ruins.



“Scientia potentia est”.  
(Francis Bacon, 1597)



## RESUMO

O vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1) é capaz de infectar células do sistema imune humano através da interação com receptores encontrados na superfície dessas células. A síndrome da imunodeficiência humana (aids) é considerada o estágio final da infecção pelo HIV, podendo desenvolver-se de forma diferenciada entre diferentes indivíduos devido a fatores genéticos e imunológicos. Objeto deste estudo, o gene regulador *tat* tem importante atuação na fase inicial da infecção, garantindo a replicação viral e influenciando a patogenicidade da doença, pois codifica uma proteína responsável pela transativação da replicação dos genes virais. A forma extracelular da proteína Tat, liberada por células infectadas, é capaz atuar sobre células responsivas não infectadas e induzir a apoptose nessas células através do efeito *bystander*. O objetivo deste TCC foi avaliar os níveis de expressão de moléculas pró e antiviral em células Jurkat estimuladas com a proteína recombinante Tat do HIV-1 subtipo C, através da técnica de qPCR. Os resultados foram obtidos pelo método  $\Delta\Delta Cq$ , utilizando a expressão relativa dos genes de interesse *TRIM5 $\alpha$*  e *LEDGF/p75* comparada com a expressão relativa dos genes de referência *TBP* e *B2M*. Subsequentemente utilizou-se o programa *GraphPad Prisma versão 6* para a análise de ANOVA *one-way* com pós teste Bonferroni. Para ambos os genes observou-se um aumento significativo na expressão relativa nas primeiras 24 horas de incubação ( $p < 0,0001$ ), havendo uma redução, também significativa, em 48 horas, retornando aos níveis basais em 72 horas (não significativo). Sabendo-se que a proteína Tat do HIV-1 induz a apoptose em células Jurkat por efeito *bystander*, a diminuição significativa observada na expressão de *TRIM5 $\alpha$*  e *LEDGF/p75*, ao longo do período de incubação, também depende de características da própria regulação gênica ou do ambiente celular.

**Palavras-chave:** HIV; Tat; moléculas antivirais; controle da infecção.



## ABSTRACT

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is capable of infecting cells of the human immune system through interaction with receptors found on the surface of these cells. Human immunodeficiency syndrome (AIDS) is considered the final stage of HIV infection, and can develop differently among infected individuals due to genetic and immunological factors. The aim of this study, the *tat* regulatory gene, plays an important role in the initial phase of infection, ensuring viral replication. The extracellular form of Tat protein, released by infected cells, is capable of interact with uninfected cells inducing apoptosis on them by the bystander effect. The aim of this project was to evaluate the expression levels of proviral and antiviral molecules in Jurkat cells stimulated with the recombinant Tat protein of HIV-1 subtype C through the qPCR technique. The results were obtained by the  $\Delta\Delta Cq$  method, using the relative expression of the genes of interest *TRIM5 $\alpha$*  and *LEDGF/p75* compared to the relative expression of the reference genes *TBP* and *B2M*. Subsequently, the *GraphPad Prisma version 6* program was used for one-way ANOVA analysis by Bonferroni post-test. For both genes a significant increase in the relative expression within the first 24 hours of incubation ( $p < 0.0001$ ) was observed, showing a significant reduction in 48 hours, until returning to the basal levels in 72 hours (not significant). Knowing that HIV-1 Tat protein induces apoptosis in Jurkat cells by the bystander effect, the significant decrease observed in the expression of *TRIM5 $\alpha$*  and *LEDGF/p75* over the incubation period also depends on characteristics of the gene regulation itself or of the cellular environment.

**Keywords:** HIV; Tat; antiviral molecules; infection control.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação do genoma viral do HIV-1.....	25
Figura 2 – Efeito da proteína viral Tat em células responsivas através do efeito <i>bystander</i> .....	29
Figura 3 – Expressão relativa dos genes de interesse ao longo do período de incubação.....	40
Figura 4 – Panorama proposto a partir dos resultados deste trabalho.....	47





## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – Iniciadores utilizados nas reações de qPCR.....	37
------------------------------------------------------------	----



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância  
AP-2 – Proteína adaptadora 2  
APOBEC3G – do inglês *apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like editing complex*  
ATF – do inglês *activating transcription factor*  
B2M – Beta 2 microglobulina  
Bcl-2 – do inglês *B-cell lymphoma 2*  
Bim – do inglês *Bcl-2-like protein 11*  
BST-2 – do inglês *bone marrow stromal cells*  
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  
CCR5 $\Delta$ 32 – Deleção de 32 pares de bases no locus do CCR5  
CDC – Centro de controle de doenças  
CFLAR – do inglês *CASP8 and FADD-like apoptosis regulator*  
Cq – Ciclo de quantificação  
CXCR4 – Receptor de quimiocina C-X-C do tipo 4  
Fas/CD95 – Receptor Fas/Grupo de diferenciação 95  
FasL – ligante ao receptor de morte Fas  
Fw – do inglês *foward*  
HIV – Vírus da imunodeficiência humana  
HLA – Antígeno leucocitário humano  
ICTV – Comitê internacional de taxonomia de vírus  
IL – Interleucina  
IRE1 – do inglês *inositol requiring protein*  
LEDGF – do inglês *lens epithelium-derived growth factor*  
LPR – Receptor de lipoproteína  
LTR – Longas sequências repetitivas  
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade  
MMWR – do inglês *morbidity and mortality weekly report*  
Mn-SOD – Manganês Superóxido Dismutase  
Nef – Fator de regulação viral  
NF- $\kappa$ B – Fator de transcrição nuclear kappa B  
p62 – do inglês *sequestosome 1*  
PBS – Tampão fosfato  
PCR – Reação em cadeia da polimerase  
PERK – do inglês *PKR-like endoplasmic reticulum kinase*  
PI(4,5)P<sub>2</sub> – Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato  
PSIP1 – do inglês *PC4 and SFRS1 interacting protein 1*

P-TEFb – Fator positivo de alongamento e transcrição  
qPCR – PCR quantitativa em tempo real  
Rev – Regulador da transcrição viral  
ROS – Espécie Reativa de Oxigênio  
RPL13A – do inglês *ribosomal protein L13a*  
RRE – Elemento Responsivo à Rev  
Rv – do inglês *reverse*  
SAMHD1 – do inglês *sterile alpha motif and HD domain 1*  
SDF1 – do inglês *stromal derived factor 1*  
SDF1-3'A – Mutação pontual na troca de G para A no gene SDF1  
SIV – Vírus da Imunodeficiência Símia  
Sp1 – Proteína de Especificidade 1  
TAR – Região Transativadora Responsiva  
Tat – Transativação da Transcrição  
TBP – do inglês *TATA box binding protein*  
TNF – Fator de Necrose Tumoral  
TRIM – do inglês *tripartite motif*  
UNAIDS – Programa das nações unidas para HIV/aids  
UPR – do inglês *unfolded protein response*  
Vif – Fator de Infectividade Viral  
Vpr – Proteína Viral R  
Vpu – Proteína viral U

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>21</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
1.1 VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA.....	23
1.2 PROTEÍNA VIRAL TAT E SEUS EFEITOS EM LINFÓCITOS.....	26
1.3 CONTROLE NATURAL DA INFECÇÃO DO HIV-1.....	29
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
3.1 OBJETO DE ESTUDO.....	35
3.2 ETAPAS PRELIMINARES.....	35
3.2 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL.....	36
3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	37
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é responsável pelo desenvolvimento da síndrome da imunodeficiência humana (aids), caracterizada pela falência do sistema imune, predispondo o organismo ao desenvolvimento de infecções oportunistas. A aids foi identificada em 1981 e reportada pelo *Center for Disease Control* (CDC) em seu relatório semanal MMWR, na qual 5 homens homossexuais apresentavam uma pneumonia rara caracterizada como uma infecção oportunista que geralmente acomete pacientes imunodeprimidos. Considerada o último estágio da infecção pelo HIV, a aids pode se desenvolver de forma diferenciada entre os indivíduos infectados, dada a heterogeneidade genética dos mesmos, bem como devido a fatores imunológicos que podem modificar a progressão da doença (SCHNEIDER; HLOPHE; RENSBURG, 2008).

Estudos de filogenia molecular revelam que o vírus da imunodeficiência humana originou-se a partir de transmissões zoonóticas do vírus da imunodeficiência simíia (SIV) entre duas espécies de primatas (HAHN *et al.*, 2000), sendo o HIV-1 originado do SIV que infecta chimpanzés (*Pan troglodytes*), enquanto o HIV-2 oriundo de uma cepa do SIV que infecta outro primata (*Cercocebus atys*). A hipótese de que o HIV foi originado a partir do SIV é suportada pelas semelhanças na organização dos genomas desses vírus, por serem filogeneticamente relacionados, pela coincidência geográfica com o epicentro da epidemia e pela existência de vias de transmissão admissíveis entre as espécies, em que a infecção humana pelo SIV deu-se pela exposição ao sangue dos macacos infectados no processo de caça ou quando mantidos como *pets* (GAO *et al.*, 1999; HAHN *et al.*, 2000).

Com o passar do tempo, diversos eventos independentes geraram as diversas linhagens de HIV, o que subdividiu o HIV-1 nos grupos M, N, O e P e o HIV-2 nos subtipos de A-H (revisado por HEMELAAR, 2012). O estado epidêmico de cada grupo apresenta diferenças consideráveis, na qual se tem grupos endêmicos a uma região ou população e também grupos pandêmicos, como o HIV-1 do grupo M responsável por infecções em escala global. Além disso, o grupo M pode ser subdividido em subtipos e subtipos recombinantes filogeneticamente relacionados (GAO *et al.*, 1999), sendo o subtipo C responsável por quase a metade das infecções globais. No Brasil, tem-se a predominância dos subtipos B, C e do subtipo recombinante BC distribuídos de forma

heterogênea pelo país, mas a região sul tem uma maior prevalência do subtipo C (GRÄF; PINTO, 2013). Ademais um estudo realizado por Bello e colaboradores (2008) mostrou que o subtipo C encontrado no sul do Brasil originou-se de um subgrupo monofilético proveniente do Burundi, no leste da África.

Atualmente existem em torno de 36,7 milhões de pessoas vivendo com HIV/aids no mundo (UNAIDS, 2016). Somente na América Latina, há 2 milhões de pessoas infectadas, havendo no Brasil mais de 840 mil casos notificados e mais de 300 mil óbitos decorrentes da doença desde a sua descoberta no início da década de 80 (BRASIL, 2017). Pouco mais de 20% destes casos estão localizados na região Sul do Brasil. Somente em Santa Catarina foram registrados 43.101 casos notificados até junho de 2016, estando a doença presente em quase todos os municípios, com destaque para Itajaí, Lages e São José (BRASIL, 2017).

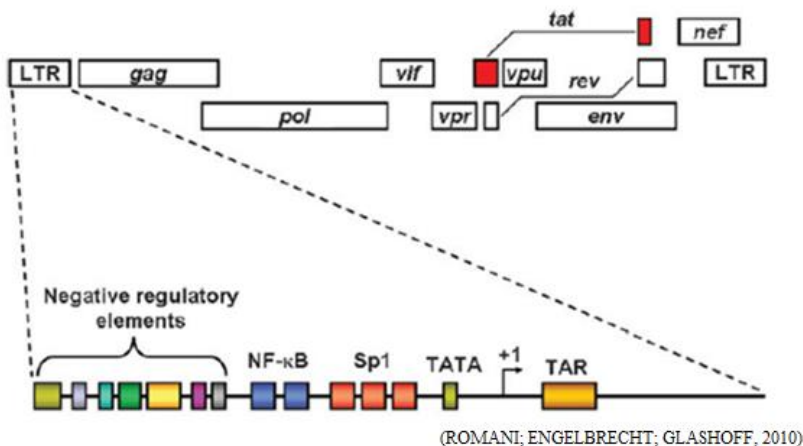
O HIV encontra-se taxonomicamente na família *Retroviridae* e no gênero *Lentivirus*, listado como uma nova espécie no *5th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. É um vírus que possui um capsídeo cônico com duas fitas simples de RNA senso positivas (TURNER; SUMMERS, 1999; Da COSTA *et al.*, 2015). A família dos retrovírus possui a capacidade de transcrever seu genoma de RNA em DNA para ser integrado ao genoma da célula hospedeira através da enzima transcriptase reversa – uma DNA polimerase dependente de RNA. O HIV-1 infecta as células do sistema imune através da interação de glicoproteínas do envelope viral com o receptor celular primário CD4, resultando na ancoragem do vírus na membrana celular, seguida da interação com os correceptores CCR5 ou CXCR4 que auxiliam na fusão entre membranas. No citoplasma, o vírus é descapsulado, sendo o RNA viral convertido em DNA de dupla fita pela transcriptase reversa e subsequentemente integrado no genoma da célula hospedeira pela ação da integrase. O processo de infecção do vírus na célula hospedeira até a integração do genoma viral no genoma celular caracteriza a fase inicial da infecção. Na fase tardia, tem-se a utilização da maquinaria celular para a replicação viral, através da síntese de proteínas virais para a montagem e liberação de vírions por brotamento (Da COSTA *et al.*, 2015).

O genoma viral, de aproximadamente 9 kb, é constituído por nove genes ladeados por longas sequências repetitivas (LTR). Dentre esses genes encontram-se três genes principais: *gag*, *pol* e *env*. O gene *gag* codifica as proteínas do capsídeo viral, o gene *env* codifica as proteínas de superfície (gp120 e a gp41) e o gene *pol* codifica as enzimas envolvidas na replicação viral (protease, transcriptase reversa e integrase) (revisado



por FRANKEL; YOUNG, 1998). O HIV ainda possui os genes acessórios *nef*, *vpu*, *vpr* e *vif*, além de dois genes regulatórios *tat* e *rev*, responsáveis pela replicação e propagação viral (Figura 1).

**Figura 1 – Representação do genoma viral do HIV-1**



Com a representação do genoma do HIV-1 tem-se em destaque (vermelho) os dois éxons que codificam a proteína Tat, sendo o primeiro responsável por sua função transativadora.

Um das proteínas acessórias virais é a Vpu, que promove a degradação de CD4 no retículo endoplasmático, regulando o transporte de proteínas do envelope para a superfície celular onde o vírion será liberado por brotamento (FRANKEL; YOUNG, 1998), além de diminuir a expressão na membrana celular de proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) do tipo I, o que protege a célula infectada de ser reconhecida por linfócitos T citotóxicos (KERKAU, 1997). Assim como Vpu, a proteína Nef é capaz de reduzir a expressão de CD4 e do MHC, além de regular a atividade de tirosinas kinases que aumentam a infectividade viral (MOAREFI *et al.*, 1997; FRANKEL; YOUNG, 1998) e ser uma proteína imunogênica, o que acaba influenciando na progressão da doença.

A proteína Vif é necessária durante a infecção viral *in vivo*, sendo capaz de iniciar a infecção em células não-infectadas em diferentes linhagens de linfócitos T CD4, além de modular a maturação e a liberação de vírions (SIMON; MALIM, 1996). A proteína acessória Vpr é

incorporada ao vírion quando associada à proteína Gag do capsídeo viral (PAXTON; CONNOR; LANDAU, 1993), e apresenta uma sequência sinal que transporta o complexo nucleoproteico para o núcleo, onde o genoma viral será integrado, além de impedir a proliferação celular, mantendo a célula em G2 (JOWETT *et al.*, 1995), de forma a otimizar a replicação e bloquear a apoptose. Por fim, a proteína regulatória Rev liga-se a seu elemento responsivo (RRE) codificado pelo gene *env*, na exportação dos transcritos virais, que apresentem a região RRE, para fora do núcleo celular. O transcrito gênico dos genes *rev*, *tat* e *nef* sofre *splicing* para a retirada de íntrons e são acumulados no citoplasma, para que no ciclo de replicação tardia, a proteína Rev possa atuar regulando a expressão de genes estruturais e acessórios (BLISSENBACH *et al.*, 2010).

## 1.2 PROTEÍNA VIRAL TAT E SEUS EFEITOS EM LINFÓCITOS

A função regulatória da proteína Tat tem importante atuação na fase inicial da infecção a fim de garantir a replicação viral e a patogenicidade da doença, sendo codificada pelo gene *tat*, representado por dois éxons formando um polipeptídeo que varia de 86-104 aminoácidos, com peso de 14-16 kDa (PUGLIESE *et al.*, 2005; ROMANI; ENGELBRECHT; GLASGOFF, 2010). A proteína Tat codificada por esse gene é dividida em seis regiões diferentes: i) região ativadora rica em prolina, que medeia a interação com o maquinário celular e possui um triptofano na posição 11, o que favorece a inserção da Tat na membrana do endossomo para sua translocação no citosol; ii) região altamente conservada e rica em cisteína, envolvida na ligação com íons metálicos, principalmente o zinco; iii) região *core* que interage com proteínas do microtúbulo, alterando a sua dinâmica e podendo induzir a apoptose pela via mitocondrial; iv) região básica, uma sequência bem conservada e responsável pela internalização da Tat nas células não infectadas, a qual interage com proteínas citosólicas na sinalização proteica para a translocação nuclear e que possivelmente auxilie na estabilização da Tat ao interagir com resíduos da região N-terminal; v) região rica em glutamina, com a maior taxa de variação na sua sequência, traz consigo alterações nos efeitos transativadores e apoptóticos da Tat; vi) região C-terminal codificada pelo segundo éxon, o que induz um estado pré-oxidativo através da supressão da expressão de Mn-SOD (do inglês, *Mn-dependent superoxide dismutase*), capaz de induzir a morte celular.

A proteína Tat é uma transativadora da replicação viral e atua nesse processo através da interação com o mRNA nascente em sua região transativadora-responsiva (TAR), localizado na região LTR proviral (BERKHOUT; SILVERMAN; JEANG, 1989). Durante a fase inicial da infecção, após o DNA viral ser integrado a transcrição gênica é regulada por fatores de transcrição da célula hospedeira que interagem com as diversas regiões do LTR (Figura 1), promovendo a transcrição dos genes *rev*, *tat* e *nef*. A proteína Tat atua nesse processo facilitando a transcrição gênica de duas formas principais: é capaz de remodelar a cromatina através da acetilação de histonas, deixando o genoma viral exposto para a RNA polimerase II; e promove a transcrição completa do genoma viral com o auxílio do complexo ternário composto por um fator de alongação e uma quinase responsável por fosforilar a polimerase (ZHOU *et al.*, 2003). Além disso, a região LTR apresenta o domínio Sp1 (Figura 1) que é capaz de recrutar uma subunidade do fator de alongação positivo (P-TEFb), a ciclina T1 (YEDAVALLI; BENKIRANE; JEANG, 2003) que auxilia na formação do complexo de transcrição.

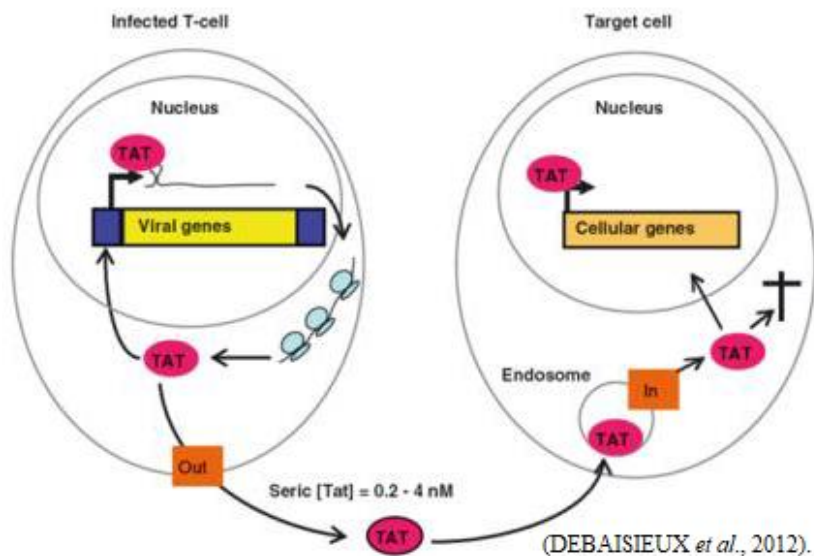
Além de induzir a transcrição do genoma viral, a proteína Tat também induz a expressão de genes celulares, de forma a exercer funções que favoreçam a replicação viral. Em células infectadas, a proteína Tat é capaz de induzir o estado de imunossupressão por diversos mecanismos. Na produção de citocinas pela célula, a Tat aumenta a expressão da interleucina-10 (IL-10), uma citocina próinflamatória capaz de suprimir a produção e secreção de citocinas antiinflamatórias em linfócitos e está relacionada com a progressão da doença (SHIN *et al.*, 2000). Na expressão do complexo MHC I, responsável por apresentar antígenos intracelulares à linfócitos T CD8, a proteína Tat reduz a expressão de MHC possibilitando que o vírus evite a resposta imune do hospedeiro (HOWOROFT *et al.*, 1993). Na morte celular induzida pelo estresse oxidativo, a proteína Tat reduz a expressão de Mn-SOD – gene que codifica uma enzima presente na matriz mitocondrial, com função de reduzir o oxigênio impedindo a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) – de forma a aumentar os efeitos citotóxicos do fator de necrose tumoral (TNF) (WESTENDORP *et al.*, 1995). O TNF estimula a replicação viral através da ativação do NF- $\kappa$ B que interagirá ao seu sítio de ligação na região LTR viral, mas em células não infectadas, além disso o NF- $\kappa$ B atua como fator de transcrição na ativação de genes em resposta ao estresse celular e de genes regulatórios da apoptose (revisado por HAYDEN; GHOSH, 2008), mediado pela proteína Tat ao modulação a atividade do TNF, alterando o estado redox da célula.

O efeito bystander, em sua primeira concepção reflete as respostas biológicas detectadas em células não diretamente irradiadas, mas que de alguma forma, captam sinais emitidos por células vizinhas irradiadas (MOTHERSILL; SEYMOUR, 1997). Dentre as respostas biológicas observadas tem-se alterações cromossômicas, indução de mutações, da carcinogênese e da apoptose celular, e essas respostas variam de acordo com a célula estimulada e com o período de exposição à radiação ionizante. O efeito bystander é transmitido por intermédio de junções gap, célula à célula ou através da secreção de moléculas ionizantes (MOTHERSILL; SEYMOUR, 1998; LYGNG; SEYMOUR; MOTHERSILL, 2000). Seguindo esse raciocínio, a proteína Tat é capaz de influenciar células não infectadas e responsivas à ela, de forma a induzir a apoptose pelo efeito bystander (FINKEL *et al.*, 1995), ao ser secretada por uma célula que está infectada com o HIV (Figura 2).

A proteína Tat é secretada das células de forma não convencional, pois ela não apresenta um peptídeo sinal para ser direcionada ao complexo de Golgi por intermédio do retículo endoplasmático (revisado por NICKEL; RABOILLE, 2009) e nem uma polaridade que facilite seu transporte pela membrana plasmática. Rayne e colaboradores (2010) demonstraram que a secreção da Tat, em células T CD4 é dependente da interação com o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PI(4,5)P<sub>2</sub>), um fosfolípido negativamente carregado que se encontra na membrana plasmática interna. Uma vez secretada, a proteína Tat extracelular pode ser internalizada em células não infectadas através de receptores de membrana, como o CD26, o receptor de lipoproteína (LPR), sítios ligados ao correceptor CXCR4 que aumentam a susceptibilidade da célula à infecção através do correceptor CCR5 (GHEZZI *et al.*, 2000) e a dependência de clatrina, mediada por AP-2, em células T (VENDEVILLE *et al.*, 2004).

A apoptose induzida pela proteína Tat atinge diversos tipos celulares e pode ocorrer tanto através da ativação da via intrínseca da apoptose mediada por caspases (BUDIHARDJO *et al.*, 1999), ou outros mecanismos (revisado por ROMANI; ENGELBRECHT; GLASHOFF, 2010); bem como através da ativação da via extrínseca. A preferência da Tat extracelular por células T (VENDEVILLE *et al.*, 2004) resulta na característica patognomônica da infecção pelo HIV, levando ao desenvolvimento da aids: a depleção de linfócitos T CD4.

**Figura 2 – Efeito da proteína viral Tat em células responsivas 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 ao se ligar ao RNA nascente da região TAR; 2) a proteína Tat pode ser excretada por células infectadas, entrar em células responsivas vizinhas através de endocitose, sendo direcionada ao núcleo, na ativação de diversos genes celulares, podendo promover a apoptose pelo efeito *bystander*.

### 1.3 CONTROLE NATURAL DA INFECÇÃO DO HIV-1

Há diversos fatores do hospedeiro que podem conferir um controle natural da infecção pelo HIV. Dentre eles tem-se o complexo de antígeno leucocitário humano (HLA) de classe I, em que algumas variações nos alelos desse complexo podem estar atreladas ao controle da infecção através da resposta imune mediada por linfócitos T CD8 (WALKER; YU, 2013). Os correceptores CCR5 e CXCR4, cruciais para a adsorção do vírus e sua entrada nas células, quando em homozigose, o alelo CCR5  $\Delta 32$  e SDF1-3'A, podem conferir resistência à infecção pelo HIV-1 ou uma progressão lenta para aids em indivíduos heterozigotos

(GALVANI; NOVENBRE, 2005; WINKLER *et al.*, 1998). Também a produção de anticorpos anti-HIV que se ligam ao envelope viral impedindo a entrada do vírus nas células, a produção de quimiocinas e de moléculas antivirais.

Algumas moléculas antivirais produzidas por células do hospedeiro podem atuar no controle da replicação viral e são constitutivamente expressas ou induzidas por interferon (BLANCO-MELO; VENKATESH; BIENIASZ, 2012). São elas: APOBEC3G, TRIM5 $\alpha$ , BST-2, SAMDH1 e CFLAR, além de LEDGF/p75, uma molécula pró-viral diretamente envolvida na replicação viral. Dentre essas moléculas, a TRIM5 $\alpha$  e a LEDGF/p75 foram abordadas nesse trabalho.

A molécula TRIM5 $\alpha$  (do inglês *tripartite motif*), apresenta atividade antiviral e se liga ao capsídeo viral após a entrada do vírus na célula hospedeira, impedindo seu descapsulamento e, portanto, atua em uma fase precoce da replicação viral. A TRIM5 $\alpha$  é uma proteína citoplasmática que utiliza microtúbulos para seu transporte ao longo do citoplasma (CAMPBELL *et al.*, 2007), o que poderia estar atrelado a função de restrição no controle da replicação viral, através da autoubiquitinação na degradação via proteossomo ou na ativação da via NF- $\kappa$ B, que indiretamente defende o organismo contra a infecção por intermédio da resposta imune inata (ZHENG; JEANG; TOKUNAGA, 2012). Na ausência da infecção viral, a regulação da expressão de TRIM5 $\alpha$  é mediada pela p62, uma proteína induzida por interferon que mantém o estado antiviral da célula por via proteossomo ou autofágica (SEIBENHENER *et al.*, 2004).

Por sua vez, a molécula LEDGF/p75 (do inglês *lens epithelium-derived growth factor*) apresenta uma atividade próviral sugerida por Cherepanov e colaboradores (2003) através da observação de um envolvimento direto da proteína LEDGF/p75 no processo de integração do DNA viral na célula hospedeira. Mesmo apresentando atividade próviral, LEDGF/p75 é constitutivamente expressa e atua como fator de transcrição regulando a expressão de genes em resposta ao estresse celular (SHINOHARA; SINGH; FATMA, 2002). O controle da replicação do HIV-1 depende do balanço entre os fatores celulares que atuam como cofatores virais ou como fatores de restrição com atividade antiviral. No entanto, não se pode descartar a possível influência do LEDGF/p75 nos efeitos de outras moléculas antivirais (MOUS *et al.*, 2012).

Tanto as proteínas regulatórias quanto as acessórias do HIV apresentam uma função em comum ao recrutarem fatores celulares para

atuarem em diversas etapas da replicação viral (STREBEL, 2003). A partir da função de recrutadora de fatores celulares, a proteína Tat tem sido empregada em alguns estudos como uma ferramenta para o transporte de outras moléculas com atividade antiviral, para a descoberta de novas drogas no tratamento da infecção pelo HIV; além de ser um potencial alvo para a terapia antirretroviral (MELEKHOVETS *et al.*, 2001; TURPIN, 2003). Neste contexto, o entendimento do efeito *bystander* da proteína Tat e sua relação com a expressão de moléculas intrínsecas com atividade pró e antiviral pode revelar como a célula se comporta frente ao estímulo dessa proteína na indução da apoptose. Desta forma este projeto visou avaliar a expressão gênica de TRIM5 $\alpha$  e LEDGF/p75 em células Jurkat estimuladas com a proteína viral Tat.

**Hipótese:** A proteína Tat exerce efeitos sobre a expressão gênica de fatores intracelulares envolvidos na resistência natural ao HIV.





## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos da proteína Tat em células Jurkat sobre a expressão de genes celulares que influenciem na replicação viral.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- i. Avaliar a cinética da expressão gênica relativa da proteína próviral LEDGF/p75;
- ii. Avaliar a cinética expressão do transcrito gênico da proteína antiviral TRIM5 $\alpha$ .



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa apresenta passos metodológicos realizados por Jéssica Campestrini no Laboratório de Imunologia Aplicada no decorrer de seu mestrado, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da UFSC. Esses passos estão listados no item 3.1 Etapas preliminares e os protocolos detalhados encontram-se descritos em Campestrini (2017).

#### 3.1 OBJETO DE ESTUDO

Com o objetivo de avaliar os níveis de expressão gênica em linfócitos estimulados com a proteína Tat do HIV-1 utilizou-se células Jurkat pertencentes a uma linhagem leucêmica de células T CD4 derivadas da medula óssea, que foram primeiramente utilizadas em estudos de ativação de células T por Weiss, Wiskocil e Stobo (1984). A partir do trabalho desses pesquisadores, as células Jurkat passaram a ser utilizadas como modelo imunológico em diversos estudos *in vitro* abrangendo a interação entre linfócitos T e moléculas do HIV (revisado por RUIZ; PRASAD, 2016). A escolha do subtipo da proteína recombinante Tat foi determinada pela prevalência do subtipo C do HIV-1 na região sul do Brasil (GRÄF; PINTO, 2013). A proteína recombinante foi comercialmente adquirida da empresa Diatheva (Fano, Itália), na qual sua sequência completa encontra-se no GenBank sob número de acesso AAL06113.1 e com a capacidade de ser internalizada por células responsivas, necessário para estudos *in vitro*.

#### 3.2 ETAPAS PRELIMINARES

Células Jurkat E-61 provenientes do banco de células do Rio de Janeiro (número CR063, lote 04/07/2006), livres de *Mycoplasma*, foram mantidas em garrafas de cultura onde  $5 \times 10^5$  células foram transferidas para placas de 12 poços (TPP) para serem estimuladas durante 72 horas com 200nM da proteína recombinante Tat do HIV-1 subtipo C (Diatheva), diluída em 1 ml de tampão fosfato (PBS), 0,1% de glicerol (Invitrogen<sup>TM</sup>, Life Technologies) e *Protease Inhibitor Cocktail 50x* (Promega). O controle negativo utilizado foi o meio no qual a proteína Tat foi diluída. Após a estimulação das células com a proteína Tat, elas foram centrifugadas para a extração do RNA seguindo as indicações do *PureLink® RNA Mini Kit* (Ambion®, Life Technologies). O RNA extraído foi eluído em 50µl de água *RNase-free* (Invitrogen<sup>TM</sup>, Applied

Biosystem), em seguida, foi tratado com DNase do *kit DNase I Amplification Grade* (Invitrogen™, Applied Biosystems), conforme o protocolo do fabricante, na garantia de que as amostras de RNA estariam livres da contaminação com DNA genômico. Para a realização da síntese do DNA complementar (cDNA), as amostras tiveram sua quantificação realizada através da leitura de absorbância a 260nm em espectrofotômetro (Picodrop, Eppendorf), para a determinação da concentração de RNA total a ser utilizado. Com um volume de RNA correspondente a 500ng totais de cada amostra, a síntese do cDNA foi realizada com todas as amostras processadas simultaneamente, utilizando o *Kit SuperScript III First-Strand* (Invitrogen™, Applied Biosystems) e o termociclador (Mastercycle® Gradient, Eppendorf). Desta forma, o cDNA das amostras obtidas foram adicionados 30 µl de água *DNase/RNase free* (Invitrogen™, Applied Biosystem) e foram armazenados no freezer -20°C para a realização da qPCR.

### 3.2 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

A avaliação da quantidade dos transcritos gênicos em células Jurkat estimuladas com a proteína Tat foi feita através da técnica de qPCR, em triplicata, utilizando o *kit SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), as reações foram otimizadas para serem realizadas em um volume final de 15 µl por poço, sendo 5 µl de cDNA diluído 1:5. No aparelho *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems), com placas de 96 poços *MicroAmp® Optical* (Applied Biosystems) a amplificação ocorreu a 95°C por 10 segundos para ativação da enzima, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos para desnaturação das fitas de cDNA e 60°C por 1 minuto para anelamento dos iniciadores e extensão das sequências. E as análises foram realizadas no software *StepOnePlus® Software v.2.3* (Applied Biosystems).

Para as reações de qPCR utilizou-se iniciadores específicos para os genes de referência B2M e TBP, sendo o principal critério de escolha a alta estabilidade desses genes em leucócitos, principalmente em linfócitos (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). E, para as moléculas de interesse TRIM5α e LEDGF/p75, os iniciadores utilizados encontram-se descritos no Quadro 1.

**Quadro 1 – Iniciadores utilizados nas reações de qPCR.**

ID Genebank	Iniciadores	Amplicon	Éxons	Eficiência	Temperatura de dissociação	Referências
<b>Genes de Referência</b>						
TBP	6908 Fw - GCCTCCCCACCCCTTCTTT Rv - GCCACACCTTGCAACTCAACATCC	106	8	99,3%	76,4°C	Steinau, Rajeevan & Unger, 2006
B2M	567 Fw - ATGAGTATGCCTGCCGTGTGA Rv - GGCATCTTCAAACCTCCATG	101	2 e 3	99,6%	79,2°C	Asioli et al, 2011
<b>Genes de Interesse</b>						
LEDGF/p75	11168 Fw - TCGACTTCAAAGGATACATGCTG Rv - GAGCTTGTTCATTGTGACCT	122	12 e 13	99,0%	76,4°C	Mous et al, 2011
TRIM5a	85363 Fw - TGCTGGCTTCCAACCTGAT Rv - ACAGAGAGGGGGCACAATGAA	165	8	97,9%	76,6°C	Mous et al, 2011

O resultado obtido, expresso em Cq, é definido como o número de ciclos necessários para que o sinal de fluorescência atinja um limiar de detecção específico e apresente uma relação inversamente proporcional à quantidade inicial de RNA da amostra. Com as amostras analisadas em triplicata a expressão relativa dos genes foi determinada pelo método  $\Delta\Delta Cq$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) através da variação do Cq da amostra de interesse, em relação ao gene de referência.

### 3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A partir dos resultados obtidos e de que as amostras apresentam uma distribuição normal, a análise estatística utilizou o programa *GraphPad Prisma versão 6* e foi embasada no teste paramétrico *ANOVA one-way*, um teste de análise de variância entre amostras independentes que indica se há diferenças significativas ou não, com o pós-teste de Bonferroni, de forma a manter o nível de significância do teste em 5%.



## 4 RESULTADOS

Esse projeto buscou avaliar a expressão de APOBEC3G, TRIM5 $\alpha$ , BST-2, SAMDH1, CFLAR e LEDGF/p75 em células Jurkat estimuladas com a proteína recombinante Tat do HIV-1 subtipo C, através da técnica de qPCR. Entretanto somente as moléculas TRIM5 $\alpha$  e LEDGF/p75 apresentaram resultados confiáveis que serão aqui apresentados (Figura 3).

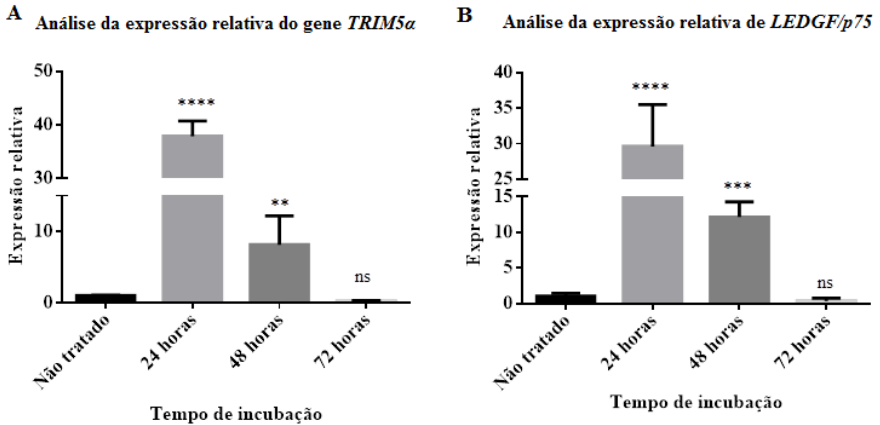
Utilizando as amostras de células Jurkat estimuladas com a proteína Tat observou-se uma curva de amplificação próxima da esperada, em que a curva atinge um platô (fase em que a não há aumento no número de produtos de amplificação) nos genes de referência *TBP* e *B2M* e no gene de interesse *TRIM5 $\alpha$* , o que indica que o gene está sendo bem expresso nessas células, visto que o Cq apresenta uma relação com a expressão gênica. Os genes *APOBEC3G*, *BST-2* e *LEDGF/p75* apresentaram uma amplificação tardia em que o seu platô não pode ser observado em 40 ciclos. Uma possível explicação para este fenômeno pode estar relacionado com uma menor expressão desses genes nas células.

Em relação ao gene *CFLAR* não foi observada amplificação nos ensaios realizados, sendo necessário uma maior concentração da amostra para se obter uma amplificação tardia, além do que a *melting* apresentou oscilações e picos inespecíficos, não representando resultados confiáveis. A respeito do gene *SAMHD1*, poucas amostras apresentaram amplificação tardia, porém as triplicatas apresentaram divergências, tornando os resultados obtidos pouco confiáveis. Por fim, o gene de referência *RPL13A* não apresentou a fase platô na sua curva de amplificação, a triplicata apresentou resultados pouco confiáveis e ao analisar esses resultados, a variação entre os Cq obtidos para os genes de referências foi alta, o que reduz o *fold* de expressão dos genes de interesse trazendo um resultado não significativo em células Jurkat estimuladas com Tat.

Diante do exposto acima, os resultados foram obtidos pelo método  $\Delta\Delta Cq$ , utilizando a expressão relativa somente dos genes de interesse *TRIM5 $\alpha$*  e *LEDGF/p75* comparada com a expressão relativa dos genes de referência *TBP* e *B2M*. Na análise do método  $\Delta\Delta Cq$  o *fold* do grupo não tratado em todos os tempos de incubação variou muito pouco para cada gene, portanto optou-se por deixar a média dos três tempos. Subsequentemente utilizou-se o programa *GraphPad Prisma versão 6* para a análise de ANOVA *one-way* com pós teste Bonferroni.

Pode se observar um aumento significativo na expressão do gene *TRIM5α* após 24 horas de incubação ( $p < 0,0001$ ) (Figura 3A), tendo redução brusca com 48 horas de incubação ( $p < 0,01$ ), até retornar aos níveis basais com 72 horas. A respeito do gene *LEDGF/p75* (Figura 3 B) observou-se um aumento significativo na expressão relativa desse gene com 24 horas de incubação ( $p < 0,0001$ ), tendo uma redução com 48 horas de incubação ( $p < 0,001$ ), retornando aos níveis basais com 72 horas.

### Figura 3 – Expressão relativa dos genes de interesse ao longo do período de incubação



Expressão relativa dos genes de interesse adquirida no programa *GraphPad Prism versão 6* pela análise estatística *ANOVA one-way* com pós teste Bonferroni. **A.** Análise da expressão relativa do gene *TRIM5α*. **B.** Análise da expressão relativa do gene *LEDGF/p75*. \*\*  $p < 0,01$ . \*\*\*  $p < 0,001$ . \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . ns – não significativo.



## 5 DISCUSSÃO

A indução da apoptose pelo efeito *bystander* da proteína Tat tem sido bem retratado pela literatura e o papel da proteína Tat na patogênese do HIV vai além da sua função na transcrição viral. Todavia, células infectadas com o HIV-1 apresentam mecanismos envolvidos no retardo da apoptose de forma a estender a vida celular e a persistência viral. Acredita-se que esse papel anti-apoptótico seja atribuído ao TAR, em que ao utilizar um RNA de interferência da região TAR, tem-se uma regulação negativa de genes envolvidos na indução da apoptose por danos ao DNA (KLASE *et al.*, 2009).

Entretanto, a apoptose é um processo ordenado de morte celular programada em que pode ser desencadeada, bem como, acelerada pela proteína Tat por intermédio da via extrínseca mediada por receptores de morte (DABROWSKA; KIM; ALDOVINI, 2008) ou da via intrínseca mediada pela mitocôndria ou pelo estresse do retículo, com a ativação da via UPR (do inglês *unfolded protein response*) (DANIAL; KORSMEYER, 2004; WALTER; RON, 2011). Através da sua atividade transativadora, a proteína Tat é capaz de estimular células não infectadas através do efeito *bystander* e induzir a apoptose em linfócitos de forma tempo e dose-dependente demonstrado no estudo de Campestrini (2017) em que células Jurkat foram incubadas com a proteína Tat nas concentrações 50 nM, 100 nM e 200 nM por períodos de 24, 48 e 72 horas, além disso, após 72 horas do estímulo da proteína Tat na concentração de 200 nM observou-se uma taxa de morte celular de aproximadamente 12% e uma despolarização da membrana mitocondrial em 70% das células, o que corrobora ao fato da proteína Tat induzir a apoptose após 72 horas do estímulo.

A indução da apoptose é mediada por diversos mecanismos que atuarão em ambas as vias, resultando, em sua maioria, na ativação de caspases. Caspases são proteases com papel central na indução da apoptose, por isso a célula apresenta um ajuste fino quanto a elas, sendo produzidas e liberadas na sua forma inativa e são ativadas por um processo proteolítico, na indução de uma cascata bioquímica (DICKENS *et al.*, 2012). A via extrínseca é mediada por receptores de morte, sendo o mais conhecido o Fas/CD95, que ao interagir com o seu ligante (FasL) é capaz de clivar a caspase-8, considerada uma protease pró-apoptótica na ativação de genes como o NF- $\kappa$ B, e também apresenta uma função proteolítica na clivagem da caspase-3, que por sua vez continuará a cascata resultando na apoptose (DABROWSKA; KIM; ALDOVINI, 2008). Em células Jurkat estimuladas com a proteína Tat, a via extrínseca

não é proeminente, pois há uma redução significativa na atividade da caspase-8 observado por Campestrini (2017), mesmo que a proteína Tat internalizada aumente a expressão de receptores de morte Fas (DABROWSKA; KIM; ALDOVINI, 2008).

Com isso, células Jurkat estimuladas com a proteína Tat tem a apoptose induzida pela via intrínseca, mediada ou não pela mitocôndria. Na via intrínseca mediada pela mitocôndria, a ativação das caspases é desencadeada pelo citocromo *c*, uma proteína mitocondrial liberada com o rompimento da membrana dessa organela e regulada pela expressão da molécula apoptótica Bim (revisado por DANIAL; KORSMEYER, 2004), responsável pela formação o apoptossoma ao recrutar e clivar a caspase-9, uma caspase iniciadora capaz de ativar caspases efetoras, como a caspase-3 levando a morte celular (BUDIHARDJO *et al.*, 1999; DABROWSKA; KIM; ALDOVINI, 2008). Campestrini (2017) avaliou o perfil de polarização da membrana mitocondrial e observou que após 72 horas do estímulo com a proteína Tat, a despolarização da membrana mitocondrial foi de aproximadamente 6 vezes mais que a despolarização de células não estimuladas.

Outro mecanismo que envolve a indução da apoptose pela via mitocondrial está relacionado à polimerização dos microtúbulos (CHEN *et al.*, 2002). A dinâmica dos microtúbulos é crucial para muitas funções celulares na manutenção da sua estrutura, na distribuição intracelular de organelas, na migração dos cromossomos na mitose. Porém, alterações nessa dinâmica levam a célula à morte por apoptose devido a interação da proteína Tat com tubulinas *in vitro*, de forma acelerar a polimerização de microtúbulos o que acaba produzindo microtúbulos anormais (de MAREUIL *et al.*, 2005). Huo e colaboradores (2010) encontraram que a acetilação, pós-traducional da proteína Tat em uma lisina na posição 28 (K28) promovia a atividade da proteína Tat em induz a apoptose em linfócitos T através da alteração na dinâmica dos microtúbulos, além de observarem um aumento na expressão de Bim, um “sensor” que reflete a integridade do microtúbulo, e quando translocado para a mitocôndria, atua como um transdutor de sinal na indução da apoptose pela via intrínseca.

Além de ser dependente da via mitocondrial com a liberação do citocromo *c*, a via intrínseca também pode ser independente dela, sendo ativada em resposta a um estresse prolongado no retículo endoplasmático, com a caspase-12 crucial para levar a célula à morte celular (NAKAGAWA *et al.*, 2000). O retículo endoplasmático responde ao estresse reticular, devido ao acúmulo de proteínas dobradas incorretamente que seriam levadas à superfície celular, ativando um

conjunto de genes, conhecidos como a via UPR que irão coordenar a apoptose celular. A via UPR é uma via de sinalização que regula a expressão de genes na manutenção da homeostase no lúmen do retículo e, caso a homeostase não possa ser reestabelecida, genes pró-apoptóticos relacionados a essa via são ativados e induzirão a apoptose (WALTER; RON, 2011).

Alguns vírus envelopados exploram a via UPR, no aumento da capacidade do retículo em liberar proteínas virais de envelope na membrana celular de forma a assegurar a replicação viral (LI *et al.*, 2006<sup>a</sup>). O HIV também possui influência sobre a ativação da via UPR, observado em pacientes soropositivos que apresentam um perfil de expressão de proteínas diferentes entre si, de acordo com a carga viral (BORSA *et al.*, 2012). Ademais, no estudo de Campestini (2017), utilizou-se células Jurkat para identificar o papel *bystander* da proteína Tat no estresse de retículo e na ativação da via UPR, através do aumento na expressão de genes relacionados a apoptose mediada pela via UPR em resposta ao estresse de retículo, com destaque aos genes PERK, ATF6, IRE1 e CHOP, além da diminuição do fator anti-apoptótico Bcl-2.

Contudo, células Jurkat após 72 horas da estimulação com a proteína Tat na concentração de 200 nM induz a apoptose por intermédio da via intrínseca com uma maior proeminência da ativação da via UPR. Sabendo disso, parte-se do pressuposto que após 72 horas do estímulo com a Tat, a maioria das células entraram em apoptose. Com isso, aumento significativo dos transcritos gênicos de *TRIM5α* e *LEDGF/p75* observado nas primeiras 24 horas de incubação está atrelado aos efeitos que a Tat extracelular tem em células não infectadas de ativar a transcrição de genes responsivos a ela e, conseqüentemente, induzir efeitos secundários (revisado por ROMANI; ENGELBRECHT; GLASHOFF, 2010). O efeito da Tat em induzir a apoptose pode ser observado 72 horas após o estímulo, em que o aumento na transcrição de genes responsivos à ela é capaz de induzir a apoptose, resultando em uma expressão relativa não significativa quando comparado com o não tratado.

O gene *TRIM* codifica proteínas pouco solúveis envolvidas na sinalização e diferenciação celular, apoptose e modulação da resposta imune, tendo a proteína *TRIM5α* uma atividade antiviral contra alguns retrovírus. Esse gene apresenta três importantes domínios, o RING que possui função de interagir com a E3 ubiquitina ligase, responsável por reconhecer e marcar um conjunto de substratos específicos, os domínios *Bbox2* e *coiled-coil* (C-C) contribuem ou não para a atividade antiviral dependendo da multimerização da proteína *TRIM5α* (LI *et al.*, 2006<sup>b</sup>). Além desses domínios, a proteína *TRIM5α* apresenta um domínio C-

terminal adicional o B30.2(SPRY), selecionado positivamente, que reconhece e liga-se ao capsídeo viral recém descapsulado no citoplasma da célula hospedeira (revisado por LUKIC; CAMPBELL, 2012).

A proteína TRIM5 $\alpha$  apresenta um estado de maior entropia ao formar trímeros capazes de restringir a infecção viral, possibilitando que o domínio SRPY interaja com proteínas do capsídeo viral (LI *et al.*, 2006<sup>b</sup>) e a célula é capaz de acumular esses trímeros no citoplasma na formação de corpos citoplasmáticos que serão transportados pelos microtúbulos (CAMPBELL *et al.*, 2007), auxiliando na sua atividade antiviral. A forma com que a proteína TRIM5 $\alpha$  interage com os microtúbulos não está clara, o que se sabe é que ela não apresenta uma região capaz de ligar-se à tubulina (SHORT; COX, 2006). A proteína Tat, ao ser internalizada por células responsivas é capaz de alterar a dinâmica dos microtúbulos e desencadear a apoptose pela via mitocondrial, o que pode interferir diretamente na localização e distribuição desses corpos citoplasmáticos de TRIM5 $\alpha$  reduzindo sua atividade antiviral caso essa célula seja infectada.

Além disso, a proteína TRIM5 $\alpha$  apresenta uma meia-vida curta e por isso encontra-se associada em dímeros, trímeros ou à proteína p62 responsável por regular a expressão dessa molécula, visto que a proteína TRIM5 $\alpha$  é constitutivamente expressa pela célula (BLANCO-MELO; VENKATESH; BIENIASZ, 2012). Na ausência do capsídeo viral a proteína p62 é degradada, a proteína TRIM5 $\alpha$  sofre ubiquitinação e é direcionada para a via de degradação proteossômica (SEIBENHENER *et al.*, 2004). Além disso, estudos sugerem que a p62 pode atuar no processo de sobrevivência celular por intermédio da ativação de NF- $\kappa$ B (SANZ *et al.*, 2000) ou na apoptose pela via extrínseca na ativação da caspase-8 (JIN *et al.*, 2009).

O aumento significativo na expressão relativa de TRIM5 $\alpha$  em 24 horas reflete o papel transativador da proteína Tat em transcrever genes responsivos à ela. Porém, em 48 horas de incubação tem-se uma redução gradativa na transcrição desse gene pela ausência do capsídeo viral, como uma forma de regular da transcrição de TRIM5 $\alpha$  para os níveis basais, tendo a ação da proteína p62 que pode reforçar a indução da apoptose via ativação de caspases. Após 72 horas do estímulo da proteína Tat com a apoptose estabelecida na maioria das células, tem-se uma redução na expressão de TRIM5 $\alpha$  a valores não significativo quando comparado ao não tratado.

O gene *PSIP1* codifica duas proteínas por *splicing* alternativo com propriedades coativadoras. A proteína LEDGF/p75 regula a expressão gênica devido ao estresse em que sua porção N-terminal liga-

se a sítios ativos de transcrição na cromatina de forma a interagir com a RNA polimerase II. Já sua porção C-terminal serve de epítipo dos auto-anticorpos e pode ser utilizado para fechar diagnóstico em doenças reumáticas autoimunes (BASU; SANCHEZ; CASIANO, 2015) além de apresentar atividades de transcrição e de interação proteína-proteína. A respeito da proteína LEDGF/p52 produzida por *splicing*, ela apresenta a porção N-terminal igual a da LEDGF/p75, porém sua porção C-terminal não é alvo de auto-anticorpos, e sim atua como coativador na transcrição e no *splicing* de pré-mRNA. Em células tumorais, a variante p52 induz a apoptose e antagoniza a atividade transcricional de LEDGF/p75 (BASU *et al.*, 2016).

O aumento do estresse oxidativo celular é capaz de ativar LEDGF/p75, que em resposta, aumenta a transcrição de genes protetivos, antioxidantes e inflamatórios (SHINOHARA; SINGH; FATMA, 2002) na promoção da sobrevivência celular. O estresse oxidativo pode desencadear a apoptose mediada por caspases fazendo com que a proteína LEDGF/p75 seja clivada em fragmentos capazes de aumentar ainda mais o estresse celular (WU *et al.*, 2002). Além de aumentar a morte celular induzida pelo estresse, essa proteína pode ser liberada por células e células epiteliais (SHINOHARA; SINGH; FATMA, 2002).

Além de ser capaz de responder ao estresse celular, a LEDGF/p75 é conhecida como uma molécula próviral essencial para a inserção do genoma do HIV-1 ao genoma de sua célula hospedeira. Sua região C-terminal apresenta um domínio capaz de complexar com a integrase viral e translocar o genoma do próviro para ancorá-lo na cromatina em sítios de transcrição ativa, de forma a proteger a integrase da ação proteolítica e estimular sua atividade catalítica na integração do genoma tanto *in vitro* quanto *in vivo* (CHEREPANOV *et al.*, 2003). Basu, Sanchez e Casiano (2015) hipotetizaram que a retirada de LEDGF/p75 circulante por intermédio de autoanticorpos em pacientes com câncer ou soropositivos pode conferir vantagens protetivas de forma a inibir a função da integrase viral, por exemplo, de forma que a interação da proteína LEDGF/p75 com a integrase viral possa ser um possível alvo para a terapia anti-HIV (CHRIST *et al.*, 2010).

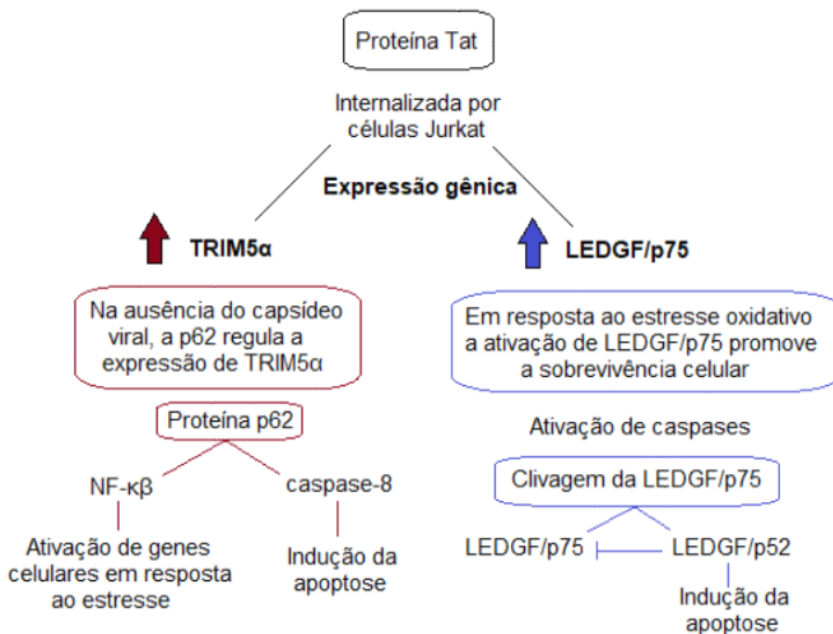
O aumento significativo na expressão relativa de LEDGF/p75 nas primeiras 24 horas está atrelado ao aumento na transcrição gênica resultado de um ambiente de estresse para a célula, como também ao fato da Tat induzir a ativação de um gene promotor de *PSIPI* (ROMANI; ENGELBRECHT; GLASHOFF, 2010; SHINOHARA; SINGH; FATMA, 2002). Após 48 horas de incubação tem-se uma redução gradativa na transcrição desse gene, pois durante a apoptose mediada por

caspsases ocorre a clivagem de LEDGF/p75 em vários fragmentos que aumentam a indução da morte celular por estresse (WU *et al.*, 2002; BASU *et al.*, 2016), atrelado ao fato de que sua variante p52 é formada com a clivagem mediada por caspase e o fragmento gerado antagoniza LEDGF/p75 (BASU *et al.*, 2016) e reforça a indução da apoptose via LEDGF/p52. Porém, após 72 horas do estímulo da proteína Tat a apoptose já está estabelecida na maioria das células o que leva a uma redução na expressão de LEDGF/p75 a valores não significativo quando comparado ao não tratado.

Desta maneira, propõe-se um panorama geral a cerca do papel da proteína Tat na expressão relativa da molécula antiviral TRIM5 $\alpha$  e da molécula próviral LEDGF/p75 (Figura 4). O aumento significativo da expressão gênica observado após 24 horas do estímulo com a proteína Tat leva a célula a um ambiente de estresse pela alta demanda de síntese e dobramento proteico, devido ao papel transativador da Tat e a indução da apoptose nessas células relaciona-se a outros mecanismos, não convencionais, na tentativa de reestabelecer a homeostase. A respeito da molécula antiviral, a ausência do capsídeo viral faz com que ela tenha sua expressão regulada pela p62, uma proteína capaz de ativar o NF- $\kappa$ B na transcrição de genes em resposta ao estresse celular, ou acabar reforçando a indução da apoptose pela ativação de caspase-8. Em relação a molécula próviral, esperava-se que sua transcrição continuasse elevada, visto que em células não infectadas a proteína LEDGF/p75 atua como fator de transcrição na ativação de genes em resposta ao estresse, mas como a homeostase não é reestabelecida, a indução da apoptose quando desencadeada por caspsases pode refletir na clivagem da LEDGF/p75 em sua variante p52 capaz de reforçar essa indução.

Contudo, a indução da apoptose pelo efeito *bystander* da proteína Tat também depende de características da própria regulação gênica ou do ambiente celular e vai contra a ideia de utilizar a proteína LEDGF/p75 como um potencial alvo da terapria antirretroviral, por ser clivada na presença de caspsases.

**Figura 4 – Panorama proposto a partir dos resultados deste trabalho**



Panorama proposto a partir de células Jurkat estimuladas com a proteína viral Tat do subtipo C a uma concentração de 200 nM em que a seta representa o aumento significativo na expressão gênica após 24 horas do estímulo com a proteína Tat.





## 6 CONCLUSÕES

Sabendo-se que a proteína Tat do HIV-1 induz a apoptose em células Jurkat por efeito *bystander* e que a proteína Tat do subtipo C tem a ativação da via UPR, o papel da proteína Tat na expressão de *TRIM5α* e *LEDGF/p75* traz a ideia de que a indução da apoptose também está atrelada a características da própria regulação gênica ou do ambiente celular.



## REFERÊNCIAS

- ASIOLI, S. *et al.* Expression of p63 is the sole independent marker of aggressiveness in localised (stage I - II) Merkel cellcarcinomas. **Mod Pathol**, v. 24, n. 11, p. 1451-1461, nov. 2011.
- BASU, A. *et al.* LEDGF/p75 overexpression attenuates oxidative stress-induced necrosis and upregulates the oxidoreductase ERP57/PDIA3/GRP58 in prostate cancer. **PLoS One**, v. 11, n.1, p. 1-25, jan. 2016.
- BASU, A.; SANCHEZ, T. W.; CASIANO, C. A. DFS70/LEDGFp75: an enigmatic autoantigen at the interface between autoimmunity, AIDS, and cancer. **Front Immunol**, v. 6, n. 116, p. 1-5, mar. 2015.
- BELLO, G. *et al.* Origin and evolutionary history of HIV-1 subtype C in Brazil. **AIDS**, v. 22, n. 15, p. 1993-2000, out. 2008.
- BERKHOUT, B.; SILVERMAN, R. H.; JEANG, K. T. Tat *trans*-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. **Cell**, v. 59, n. 2, p. 273-282, out. 1989.
- BLANCO-MELO, D.; VENKATESH, S.; BIENIASZ, P. D. Intrinsic cellular defenses against human immunodeficiency viruses. **Immunity**, v. 37, n. 3, p. 399-411, set. 2012.
- BLISSENBACH, M. *et al.* Nuclear RNA export and packaging functions of HIV-1 Rev revisited. **J Virol**, v. 84, n. 13, p. 6598-6604, abr. 2010.
- BRASIL – Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico HIV/Aids 2016. v. 48, n. 01, 52p., 2017.
- BORSA, M. *et al.* HIV infection and antiretroviral therapy lead to unfolded protein response activation. **Virol J**, v. 12, p. 77-88, maio 2015.
- BUDIHardjo, I. *et al.* Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 15, p. 269-290, nov. 1999.
- CAMPBELL, E. M. *et al.* TRIM5alpha cytoplasmic bodies are highly dynamic structures. **Mol Biol Cell**, v. 18, n. 6, p. 2102-2111, jun. 2007.

CAMPESTRINI J. **Avaliação da ativação de mecanismos apoptóticos mediados pela via UPR (unfolded protein response) em células Jurkat estimuladas com a proteína Tat do HIV-1.** 2017. 141 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

Centers for Disease Control. ***Pneumocystis Pneumonia – Los Angeles.*** Epidemiologic notes and reports. MMWR (Morbidity and Mortality Weekly Report), v. 30, n. 21, p. 250-252, jun. 1981. Disponível em: <[https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/june\\_5.htm](https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/june_5.htm)>. Acesso em: 31 agosto 2017.

CHEN, D. *et al.* HIV-1 Tat targets microtubules to induce apoptosis, a process promoted by the proapoptotic Bcl-2 relative Bim. **EMBO J**, v. 21, n. 24, p. 6801-6810, dez. 2002.

CHEREPANOV, P. *et al.* HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. **J Biol Chem**, v. 278, n. 1, p. 372-381, jan. 2003.

CHRIST, F. *et al.* Rational design of small-molecule inhibitors of the LEDGF/p75-integrase interaction and HIV replication. **Nat Chem Biol**, v. 6, n. 6, p. 442-448, jun. 2010.

DABROWSKA, A.; KIM, N.; ALDOVINI, A. Tat-induced FOXO3a is a key mediator of apoptosis in HIV-1-infected human CD4+ T lymphocytes. **J Immunol**, v. 181, n. 12, p. 8460-8477, dez. 2008.

Da COSTA, L. J. *et al.* Síndrome da imunodeficiência adquirida/AIDS. In: SANTOS, ROMANOS & WIGG. **Virologia humana**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. cap. 19, p. 498-553.

DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell death: critical control points. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 205-219, jan. 2004.

DEBAISIEUX, S. *et al.* The ins and outs of HIV-1 Tat. **Traffic**, v. 13, n. 3, p. 355-363, mar. 2012.

De MAREUIL, J. *et al.* HIV-1 Tat protein enhances Microtubule polymerization. **Retrovirology**, v. 2, n. 5, p. 1-11, fev. 2005.

DICKENS, L. S. *et al.* The 'complexities' of life and death: death receptor signalling platforms. **Exp Cell Res**, v. 318, n. 11, p. 1269-1277, jul. 2012.

FINKEL, T. H. *et al.* Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymphnodes. **Nat Med**, v. 1, n. 2, p. 129-134, fev. 1995.

FRANKEL, A. D.; YOUNG, J. A. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. **Annu Rev Biochem**, v. 67, p. 1-25, jul. 1998.

GALVANI, A.P.; NOVEMBRE, J. The evolutionary history of the CCR5- $\Delta$ 32 HIV-resistance mutation. **Microbes Infect**, v. 7, n. 2, p. 302-309, jan. 2005.

GAO, F. *et al.* Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. **Nature**, v. 397, n. 6718, p. 436-441, fev. 1999.

GRÄF, 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.170-178, jan. 2013.

GHEZZI, S. *et al.* Inhibition of CXCR4- dependent HIV-1 infection by extracellular HIV-1 Tat. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 270, n. 3, p. 992-996, abr. 2000.

HAHN, B. H. *et al.* AIDS as a zoonosis: Scientific and public health implications. **Science**, v. 287, n. 5453, p. 607-614, jan. 2000.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Shared principles in NF- $\kappa$ B signaling. **Cell**, v. 132, n. 3, p. 344-362, fev. 2008.

HEMELAAR, J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. **Trends Mol Med**, v. 18, n. 3, p. 182-192, mar. 2012.

HOWOROFT, T. K. *et al.* Repression of MHC class I gene promoter activity by two-exon Tat of HIV. **Science**, v. 260, n. 5112, p. 1320-1322, maio 1993.

HUO, L. *et al.* Tat acetylation regulates its actions on microtubule dynamics and apoptosis in T lymphocytes. **J Pathol**, v. 223, p. 28-36, set 2010.

JIN, Z. *et al.* Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. **Cell**, v. 137, n. 4, p. 721-735, maio 2009.

JOWETT, J. B. M. *et al.* The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G<sub>2</sub> + M phase of the cell cycle. **J Virol**, v. 69, n. 10, p. 6304-6313, out. 1995.

KERKAU, T. *et al.* The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpu protein interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. **J Exp Med**, v. 185, n. 7, p. 1295-1306, abr. 1997.

KLASE, Z. *et al.* HIV-1 TAR miRNA protects against apoptosis by altering cellular gene expression. **Retrovirology**, v. 6, n. 18, p. 1-17, fev. 2009.

<sup>a</sup>LI, B. *et al.* Hepatitis B virus X protein (HBx) activates ATF6 and IRE1-XBP1 pathways of unfolded protein response. **Virus Res**, v. 124, n. 1-2, p. 44-49, nov. 2006.

<sup>b</sup>LI, X. *et al.* Functional replacement of the RING, B-Box 2, and coiled-coil domains of Tripartite Motif 5 $\alpha$  (TRIM5 $\alpha$ ) by heterologous TRIM domains. **J Virol**, v. 80, n. 13, p. 6198-6206, jul. 2006.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)). **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, dez. 2001.

LUKIC, Z.; CAMPBELL, E. M. The cell biology of TRIM5 $\alpha$ . **Curr HIV/AIDS Rep**, v. 9, n.1, p. 73-80, mar. 2012.

LYNG, F. M.; SEYMOUR, C. B.; MOTHERSILL, C. Production of a signal by irradiated cells which leads to a response in unirradiated cells characteristic of initiation of apoptosis. **Br J Cancer**, v. 83, n. 9, p. 1223-1230, jun. 2000.

MELEKHOVETS, Y. *et al.* Tat-RNase H and its use in HIV gene therapy. **Gene Ther Mol Biol**, v. 6, p. 69-77, ago. 2001.

MOAREFI, I. *et al.* Activation of the Scr-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement. **Nature**, v. 385, n. 6617, p. 650-653, fev. 1997.

MOTHERSILL, C.; SEYMOUR, C. B. Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. **Int J Radiat Biol**, v. 71, n. 4, p. 421-427, abr. 1997.

MOTHERSILL, C.; SEYMOUR, C. B. Cell-cell contact during gamma irradiation is not required to induce a bystander effect in normal human keratinocytes: evidence for release during irradiation of a signal controlling survival into the medium. **Radiat Res**, v. 149, n. 3, p. 256-262, mar. 1998.

MOUS, K. *et al.* Intracellular detection of differential APOBEC3G, TRIM5alpha, and LEDGF/p75 protein expression in peripheral blood by flow cytometry. **J Immunol Methods**, v. 372, p. 52 – 64, set. 2011.

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. 1-9, mar. 2012.

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.

NICKEL, W.; RABOILLE, C. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 2, p. 148-155, fev. 2009.

PAXTON, W.; CONNOR, R. I.; LANDAU, N. R. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: Requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. **J Virol**, v. 67, n. 12, p. 7229-7237, dez. 1993.

PUGLIESE, A. *et al.* A review of HIV-1 Tat protein biological effects. **Cell Biochem Funct**, v. 23, n. 4, p. 223-227, jul./ago. 2005.

RAYNE, F. *et al.* Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate enables efficient secretion of HIV-1 Tat by infected T-cells. **EMBO J**, v. 29, n. 8, p. 1348-1362, abr. 2010.

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

RUIZ, A. P.; PRASAD, V. R. Measuring the uptake and transactivation function of HIV-1 Tat protein in a trans-cellular cocultivation setup. In: *Methods in Molecular Biology*. **HIV protocols**. Humana Press Inc., v. 1354, p. 353-366, 2016.

SANTOS, I. *et al.* Analysis of immunological, viral, genetic and environmental factors that might be associated with decreased susceptibility to HIV infection in serodiscordant couples in Florianópolis, southern Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 31, n. 11, p. 1116-1125, nov. 2015.

SANZ, L. *et al.* The atypical PKC-interacting protein p62 channels NF- $\kappa$ B activation by the IL-1-TRAF6 pathway. **EMBO J**, v. 19, n. 7, p. 1576-1586, abr. 2000.

SCHNEIDER, H.; HLOPHE, H.; RENSBURG, D. Community health workers and the response to HIV/AIDS in South Africa: tensions and prospects. **Health Policy Plan**, v. 23, n. 3, p. 179-187, maio 2008.

SEIBENHENER, M. L. *et al.* Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 18, p. 8055-8068, set. 2004.

SHIN, H. D. *et al.* Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL10. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 97, n. 26, p. 14467-14472, dez. 2000.

SHINOHARA, T.; SINGH, D. P.; FATMA N. LEDGF, a survival factor, activates stress-related genes. **Prog Retin Eye Res**, v. 21, n. 3, p. 341-358, maio 2002.



SHORT, K. M.; COX, T. C. Subclassification of the RBCC/TRIM superfamily reveals a novel motif necessary for microtubule binding. **J Biol Chem**, v. 281, n. 13, p. 8970-8980, jan. 2006.

SIMON, J. H. M.; MALIM, M. H. The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein modulates the postpenetration stability of viral nucleoprotein complexes. **J Virol**, v. 70, n. 8, p. 5297-5305, ago. 1996.

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. 113-118, fev. 2006.

STREBEL, K. Virus–host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev. **AIDS**, v. 17, n. 4, p. S25-S34, jan. 2003.

TURNER, B. G.; SUMMERS, M. F. Structural biology of HIV. **J Mol Biol**, v. 285, n. 1, p. 1-32, jan. 1999.

TURPIN, J. A. The next generation of HIV/AIDS drugs: novel and developmental anti-HIV drugs and targets. **Expert Rev Anti-infect Ther**, v. 1, n. 1, p. 97-128, 2003.

United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). **Fact Sheet**: Latest statistics on the status of the AIDS epidemic, 2016. 8 p.

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. 1-12, jun. 2002.

VENDEVILLE, A. *et al.* HIV-1 Tat enters T-cells using coated pits before translocating from acidified endosomes and eliciting biological responses. **Mol Biol Cell**, v. 15, n. 5, p. 2347-2360, maio 2004.

WALKER, B. D.; YU, X. G. Unravelling the mechanisms of durable control of HIV 1. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 7, p. 487-498, jul. 2013.

WALTER, P.; RON, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. **Science**, v. 334, n. 6059, p. 1081-1086, nov 2011.

WEISS A.; WISKOCIL, R.; STOBO, J. D. The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level. **J Immunol**, v. 133, p. 123-128, 1984.

WINKLER, C. *et al.* Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. **Science**, v. 279, n. 5349, p. 389-393, jan. 1998.

WU, X. *et al.* Caspase cleavage of the nuclear autoantigen LEDGF/p75 abrogates its pro-survival function: implications for autoimmunity in atopic disorders. **Cell Death Differ**, v. 9, n. 9, p. 915-925, mar. 2002.

YEDAVALLI, V. S.; BENKIRANE, M.; JEANG, K. T. Tat and transactivation-responsive (TAR) RNA-independent induction of HIV-1 long terminal repeat by human and murine cyclin T1 requires Sp1. **J Biol Chem**, v. 278, n. 8, p. 6404-6410, fev. 2003.

ZHENG, Y. H.; JEANG, K. T.; TOKUNAGA, K. Host restriction factors in retroviral infection: promises in virus-host interaction. **Retrovirology**, v. 9, n. 112, p. 1-28, dez. 2012.

ZHOU, M *et al.* The Tat/TAR-dependent phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain stimulates cotranscriptional capping of HIV-1 mRNA. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, n. 22, p. 12666-12671, set. 2003.