



Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia Imunologia e Parasitologia
Laboratório de Imunologia Aplicada

**Avaliação da ativação da via UPR e do perfil de
citocinas séricas em indivíduos HIV
soropositivos**

Yuri Tonello

Florianópolis
2012

Yuri Tonello

**Avaliação da ativação da via UPR e do perfil de
citocinas séricas em indivíduos HIV
soropositivos**

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

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo R. Pinto

Co-orientador: Prof. M. Sc. Mariana Borsa

Florianópolis

2012

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Jaime Tonello e Sandra Martins Tonello, pela honra de ser seu filho, por todo apoio, amor e carinho, minha eterna gratidão. Amo vocês.

À minha namorada Kamille Duarte Uggioni, pela maravilhosa companhia, surpresas, brincadeiras, abraços, beijos, por seu amor incondicional. Te amo paixão.

À galera do curso de Ciências Biológicas, pelas festas, churrascos, cervejadas, congressos e todas as loucuras que fizemos por aí. Valeu raça.

Ao Dr. Aguinaldo Roberto Pinto, por ter me orientado e proporcionado a oportunidade de desenvolver este trabalho.

À M.Sc. Mariana Borsa, pelos conselhos e por toda ajuda nos últimos meses.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Aplicada, PROTO, LVA e LIDI, pela agradável convivência.

À Universidade Federal de Santa Catarina, por ter me recebido e permitido realizar minha graduação.

A todos que colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho, muito obrigado.

RESUMO

A via UPR (do inglês *Unfolded Protein Response*) é uma resposta celular ao estresse causado pelo acúmulo de proteínas desenoveladas no retículo endoplasmático. Essa resposta busca restabelecer a homeostase celular e é regulada pelas proteínas PERK, ATF6 e IRE1. Diversos fatores podem causar estresse celular, dentre os quais se destacam as infecções virais. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ativação da via UPR em linfócitos T CD4⁺ de indivíduos HIV soropositivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos, bem como analisar o perfil de citocinas séricas dos mesmos. Amostras de sangue periférico dos voluntários foram submetidas à separação de subpopulações celulares de linfócitos T CD4⁺ e posterior extração de RNA total e síntese de cDNA. Os cDNAs obtidos foram então utilizados para análise da clivagem do mRNA codificante para a *X-box-binding-protein 1* (XBP1) através de RT-PCR, utilizando iniciadores específicos. O plasma dos voluntários foi utilizado no ensaio imunoenzimático ELISA a fim de quantificar os níveis séricos das citocinas IL-6, IL-10 e TNF- α . Os resultados obtidos indicam que a via UPR é ativada em níveis basais, mesmo em células “livres de estresse”, e sugerem que o HIV tem a capacidade de modular a ativação de IRE1, impedindo a clivagem do mRNA de XBP1. Não foram verificadas diferenças significativas no perfil de citocinas séricas em nenhum dos grupos estudados.

Palavras - chave: UPR, retículo endoplasmático, PERK, ATF6, IRE1, HIV, XBP1, citocinas, IL-6, IL-10, TNF- α .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ativação temporal da via UPR.....	16
Figura 2. Detecção do cDNA referente ao mRNA de XBP1....	35
Figura 3. Detecção do cDNA referente ao mRNA de GAPDH	36
Figura 4. Quantificação de citocinas séricas.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores utilizados para amplificação do cDNA referente a XBP1 e GAPDH.....	29
Tabela 2. Amplificação do cDNA de XBP1 entre os grupos avaliados.....	37
Tabela 3. Concentração sérica média \pm desvios padrão das citocinas IL-6, IL-10 e TNF α	40

SUMÁRIO

1. Introdução	15
1.1. Via UPR: Elementos de sinalização.....	16
1.2. Via UPR e infecções virais	19
1.3. HIV e via UPR.....	21
2. Objetivos	24
2.1. Objetivo geral.....	24
2.2. Objetivos específicos.....	24
3. Metodologia.....	25
3.1. Considerações éticas	25
3.2. Casuística.....	25
3.3. Separação das amostras.....	26
3.4. Extração de RNA e síntese de cDNA para análise da expressão gênica em linfócitos T CD4+ e monócitos.....	26
3.5. Amplificação das sequências gênicas codificantes para XBP1	28
3.6. Dosagem dos níveis séricos das citocinas IL-6, TNF- α e IL- 10.....	30
3.7. Análise estatística	32
4. Resultados e Discussão	33
4.1. Ativação da via UPR em linfócitos T CD4+	33
4.2. Quantificação dos níveis séricos de IL-6, IL-10 e TNF- α ...	39
5. Sumário de resultados	45
6. Conclusão	46
7. Referências Bibliográficas	47

1. Introdução

A capacidade que as células têm de responder a estímulos e eventuais estresses é fundamental para a manutenção de sua homeostase. Diversas causas, de origem endógena ou exógena, podem estar associadas ao estresse celular tais como, carência de nutrientes, injúrias químicas, diferenciação celular, bem como infecções por agentes patogênicos, dando-se ênfase às infecções virais (RUTKOWSKI; KAUFMAN, 2004). O processo de dobramento de proteínas é particularmente afetado por essas perturbações sendo necessário que os compartimentos celulares responsáveis por essa função sejam capazes de detectar e corrigir erros nesse processo (RUTKOWSKI; KAUFMAN, 2004).

O retículo endoplasmático é uma extensa rede de membranas fundamental para garantir um ambiente propício para a síntese, dobramento e modificações nas proteínas. Quando há acúmulo de proteínas desenoveladas no lúmen desta organela, um típico sinal de estresse celular, é ativada uma cascata de sinalização denominada via UPR (do inglês *Unfolded Protein Response*) (MALHOTRA; KAUFMAN, 2007). A ativação da via UPR resulta na diminuição da entrada de proteínas no lúmen do retículo endoplasmático, causada pela redução da transcrição de genes envolvidos na síntese de proteínas secretórias, na atenuação da tradução e no aumento da capacidade de degradação de proteínas mal dobradas através de um mecanismo conhecido como ERAD (do inglês, *ER-associated degradation*). A ativação dessa via também incrementa a capacidade de dobramento protéico pelo retículo endoplasmático através de um aumento na síntese de chaperonas e foldases, bem como leva a um aumento do tamanho da organela no intuito de diminuir a concentração de proteínas desenoveladas no seu lúmen (SCHRÖDER; KAUFMAN, 2005). Não sendo restabelecida a homeostase no retículo endoplasmático, a ativação crônica da via UPR culmina no processo de apoptose (KAUFMAN et al., 2010).

1.1. Via UPR: elementos de sinalização

A via UPR é ativada quando o processo de dobramento de proteínas encontra-se comprometido. Essa ativação pode ser causada por diferentes condições fisiológicas tais como a diferenciação e desenvolvimento de células secretoras profissionais, como plasmócitos e células pancreáticas, carência de glicose, mutações em genes que codificam proteínas secretórias, além de infecções por diversos patógenos, destacando-se os vírus (RUTKOWSKI; KAUFMAN, 2004).

Existem três proteínas transmembrana localizadas no retículo endoplasmático que são responsáveis pela ativação da via UPR: as quinases IRE1 e PERK e o fator de transcrição ATF6 (Figura 1).

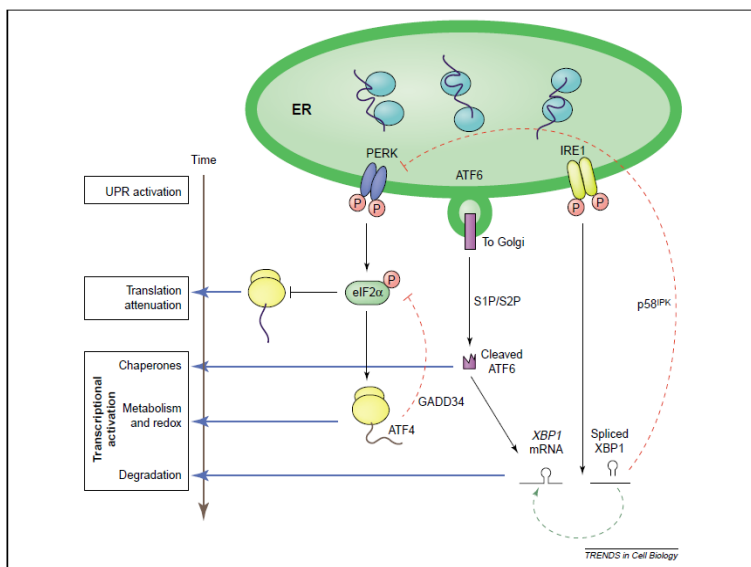


Figura 1. Ativação temporal da via UPR. Os diferentes braços da via UPR desempenham suas funções ao longo do tempo. A resposta ocorre inicialmente com a ativação de PERK, seguida por ATF6 e IRE1, respectivamente (vide texto). Adaptado de Rutkowski e Kaufman (2004).

Normalmente, a porção luminal dessas proteínas permanece ligada à chaperona BiP; entretanto, havendo um acúmulo de proteínas mal dobradas no retículo endoplasmático essa chaperona se desliga das três proteínas sinalizadoras permitindo a ativação da via UPR. A atuação conjunta dessas moléculas, além de inibir a síntese protéica, leva à ativação de genes envolvidos no dobramento de proteínas, como chaperonas, e de proteínas responsáveis pelo mecanismo ERAD (RUTKOWSKI; KAUFMAN, 2004).

A resposta mais imediata diante de estresse no retículo endoplasmático é a atenuação da tradução de mRNAs, prevenindo a entrada de novos polipeptídios no lúmen da organela, sendo este mecanismo mediado através da fosforilação da proteína eIF2 α pela quinase PERK. A fosforilação de eIF2 α impede a interação das duas subunidades ribossomais, causando uma generalizada diminuição da síntese protéica. Esse processo, contudo, é necessário para que ocorra a tradução seletiva de determinados mRNAs como, por exemplo, o do fator de transcrição ATF4 (MALHOTRA; KAUFMAN, 2007). ATF4 é uma proteína que induz a expressão de genes que codificam chaperonas, atua no metabolismo de aminoácidos, na redução de estresse oxidativo e apoptose, contribuindo para o restabelecimento da homeostase celular (KAUFMAN et al., 2010).

Após essa primeira fase de controle traducional, a via UPR também é capaz de iniciar um controle de expressão de genes relacionados a mecanismos de dobramento de proteínas. Em resposta ao estresse, a proteína ATF6 se desliga da chaperona BiP e migra para o complexo de Golgi, onde as proteases S1P e S2P irão clivar a porção protéica ligada a membrana resultando no fragmento solúvel ATF6 p50. Esse fragmento é liberado no citoplasma e posteriormente endereçado ao núcleo, atuando na ativação de genes envolvidos no mecanismo ERAD e na síntese de chaperonas (SHEN; ZHANG; KAUFMAN, 2004). ATF6 também é capaz de induzir a expressão de genes relacionados ao estresse do retículo endoplasmático, incluindo a chaperona BiP,

aumentando assim a capacidade de dobramento de proteínas. Além disso, ATF6 está envolvido na transcrição do mRNA que codifica *X-box-binding-protein 1* ou XBP1, alvo de ativação do braço IRE1 da via UPR (RUTKOWSKI; KAUFMAN, 2004).

IRE1 é uma proteína quinase com atividade endorribonuclease que, quando ativada, catalisa a remoção de um intron de 26 nucleotídeos do mRNA que codifica para a proteína XBP1, tornando-o competente para a tradução (MALHOTRA; KAUFMAN, 2007). O resultado dessa tradução é uma proteína que atua como ativador transcricional de diversos genes envolvidos na via UPR, incluindo chaperonas da família Hsp40, chaperonas residentes no retículo endoplasmático e a própria XBP1. IRE1 também é capaz de causar a degradação de mRNAs que codificam proteínas secretórias, diminuindo os níveis de proteínas a serem dobradas e atenuando o estresse nesta organela (HOLLIEN; WEISSMAN, 2006).

Não sendo capaz de restaurar a homeostase celular através dos controles traducionais e transcricionais descritos, a ativação crônica da via UPR leva à apoptose mediada por CHOP. CHOP é um fator de transcrição que tem sua expressão induzida principalmente através de PERK e ATF6 que ativa a transcrição de muitos genes que podem levar a apoptose, como GADD34, capaz de induzir a desfosforilação de eIF2 α , levando a um aumento do estresse no retículo endoplasmático através do incremento da síntese protéica (MALHOTRA; KAUFMAN, 2007).

Sendo assim, a via UPR pode ser vista como um mecanismo que atua em diversas frentes com o objetivo de restabelecer as funções celulares e, não obtendo êxito, acaba por levar a célula ao processo de apoptose.

1.2. Via UPR e infecções virais

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios que utilizam os recursos das células hospedeiras em seu proveito de modo a produzir novas partículas virais. A acentuada síntese de partículas virais resulta no acúmulo de proteínas a serem dobradas no lúmen do retículo endoplasmático, gerando uma situação de estresse que resulta na ativação da via UPR (HE, 2006). A fim de garantir que a ativação da via UPR não impeça a produção de novas cópias de material viral, os vírus podem ser capazes de modular essa via, interferindo no processo de sinalização da mesma (LEE; LEE; SUGDEN, 2009). Atualmente alguns vírus possuem suas habilidades de manipular a via UPR bem descritas, dentre os quais destacam-se: herpes simplex tipo 1 (HSV-1), citomegalovírus humano (HCMV), Epstein-Barr (EBV), vírus da hepatite C (HCV) e o vírus da dengue (DENV).

HSV é capaz de interferir na via UPR mantendo inativas as vias PERK e IRE1. A glicoproteína B deste vírus se liga a molécula PERK e assim impede sua ativação, bem como a fosforilação de eIF2 α , controlando dessa forma a concentração de proteínas virais na célula infectada através de um impedimento de atenuação traducional. Como resposta à infecção, a célula pode induzir a fosforilação de eIF2 α através da quinase PKR. Entretanto o HSV possui genes que codificam para duas proteínas que impedem a ativação deste mecanismo alternativo, a proteína PP1 α , que induz a defosforilação de eIF2 α , e US11, que se liga a PKR inibindo a fosforilação de eIF2 α . A inibição de PERK também garante ao vírus a vantagem de inibir a produção do fator apoptótico CHOP (LEE; LEE; SUGDEN, 2009).

HCMV promove a fosforilação de PERK e de eIF2 α , aumenta a produção de XBP1 em sua forma ativa e também é capaz de promover o acúmulo da chaperona BiP no retículo endoplasmático. A proteína BiP, além de ser fundamental na montagem de novas proteínas virais, interage com as proteínas virais US2 e US11 mediando a degradação do MHC de classe 1 e

protegendo as células infectadas de um ataque por linfócitos TCD8 citotóxicos (LEE; LEE; SUGDEN, 2009).

EBV é capaz de regular a ativação da via UPR e o processo de autofagia a fim de promover a fase latente de seu ciclo celular. A proteína viral LMP-1 modula a via UPR de maneira dose dependente, principalmente através de PERK, que fosforila eIF2 α , reduzindo assim a síntese protéica e proliferação celular, além de estimular a tradução de ATF4 que ativa a transcrição de LMP-1, contribuindo para o acúmulo dessa proteína no interior da célula (LEE; LEE; SUGDEN, 2009). A ativação prolongada de PERK poderia induzir a célula ao processo de apoptose, desvantajoso para o vírus; entretanto LMP-1 também é capaz de ativar mecanismos autofágicos, controlando seus níveis protéicos na célula e atenuando a ativação de PERK (LEE; SUGDEN, 2008).

HCV apresenta duas proteínas no envelope viral, E1 e E2, que são responsáveis por ativar a via UPR ao se acumularem no retículo endoplasmático, provocando assim uma situação de estresse. Essas duas proteínas promovem nas células infectadas pelo HCV a inibição da fosforilação de eIF2 α por PERK, resultando numa elevada síntese de proteínas virais, bem como a ativação de ATF6, promovendo a transcrição do gene que codifica a chaperona BiP e conseqüente incremento da capacidade de dobramento de novas proteínas (ASSELAH et al., 2010).

DENV provoca a ativação dos três braços da via UPR promovendo um aumento na fosforilação de eIF2 α e na síntese da forma clivada do mRNA de XBP1 durante a replicação viral. Entretanto, em estágios mais avançados da infecção, o vírus da dengue é capaz de inibir a ativação dos braços PERK e IRE1 e continua a se replicar no interior da célula infectada (PEÑA; HARRIS, 2011).

1.3. HIV e via UPR

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um lentivírus pertencente à família *Retroviridae* responsável pela pandemia de AIDS no mundo, infectando mais de 30 milhões de pessoas. Cada partícula viral tem aproximadamente 100-120nm de diâmetro e abriga um genoma que consiste de duas fitas simples idênticas de RNA com aproximadamente 9.800 nucleotídeos. Os três principais genes, *gag*, *pol* e *env*, são comuns a todos os retrovírus e codificam respectivamente para as proteínas do capsídeo, enzimas virais e proteínas do envelope (COSTIN, 2007). O HIV é capaz de infectar células que possuem o receptor CD4, tais como fagócitos mononucleares e linfócitos TCD4+, através de uma interação entre esse receptor e a glicoproteína gp120 presente no envelope viral (SIERRA; KUPFER; KAISER, 2005).

A progressão da infecção causada pelo HIV leva à depleção exacerbada de linfócitos TCD4+ e uma ativação desregulada do sistema imune do hospedeiro, proporcionando a infecção por patógenos oportunistas, normalmente controlada em indivíduos saudáveis (GOUGEON; CHIODI, 2010). O controle da infecção e replicação do HIV está diretamente relacionado ao bom funcionamento do sistema imune e, nesse contexto, o papel das citocinas é muito importante uma vez que as mesmas são produzidas em grande parte por células infectadas pelo HIV e podem ter efeitos estimulantes ou inibitórios sobre a replicação viral (KEDZIERSKA et al., 2003). Além disso, altas concentrações de citocinas como IL-6, IL-10 e TNF- α estão relacionadas ao desenvolvimento de outras doenças decorrentes da progressão da AIDS, como o sarcoma de Kaposi, linfoma de linfócitos B, podendo ser também neurotóxicas (LI; YIM; LAU, 2010).

Estudos relacionando a infecção pelo HIV com a via UPR ainda são bastante escassos e baseiam-se principalmente nos efeitos adversos causados pelo tratamento com inibidores de proteases. Esses fármacos podem gerar perturbações no

metabolismo de lipídios, levando a um aumento do colesterol livre nas células, podendo ser uma causa de estresse no retículo endoplasmático, com consequente ativação da via UPR (ZHOU; PANDAK; HYLEMON, 2006). A ativação da via UPR devido ao uso de inibidores de protease leva ainda a uma menor produção de bile pelos hepatócitos (ZHOU et al., 2006) e alterações na permeabilidade celular em células do epitélio intestinal (WU et al., 2010)

Os inibidores de protease utilizados na terapia antirretroviral de indivíduos HIV soropositivos também estão relacionados com o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, podendo levar ao desenvolvimento de aterosclerose e outros problemas cardíacos (CHEN et al., 2009). A maior produção destas citocinas está ligada a proteína CHOP, um produto da ativação da via UPR e considerado um marcador de apoptose, responsável por desencadear uma cascata de sinalização celular que irá culminar na produção de IL-6 e TNF- α .

A infecção pelo HIV está relacionada com um desequilíbrio nos níveis de produção de citocinas, sendo verificada uma diminuição nos níveis de produção de IL-2 e interferon- γ e um aumento na síntese de IL-4 e IL-10 além de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α . O aumento nos níveis de IL-6 e TNF- α está associado com a persistência da infecção pelo HIV e progressão para AIDS sendo estas citocinas responsáveis por estimular a replicação do vírus em macrófagos e linfócitos T CD4+. Por outro lado, o aumento da produção de IL-10 tem efeito inibitório sobre a replicação do HIV uma vez que é capaz de diminuir a síntese de IL-6 e TNF- α (KEDZIERSKA; CROWE, 2001).

A ativação da via UPR foi recentemente descrita em macrófagos infectados pelo HIV. Quando há elevada carga viral, como nos estágios iniciais da infecção pelo vírus, detecta-se um aumento dos níveis de eIF2 α fosforilado. Porém, a replicação do vírus permanece acentuada mesmo com a ativação desse braço da via UPR, que age atenuando os níveis traducionais na célula

como um todo. Essa descoberta sugere que o HIV é capaz de escapar da inibição da tradução usualmente desempenhada pela ativação do braço PERK da via UPR (CROSS et al., 2010).

Recentemente outro trabalho também sugeriu que o HIV é capaz de modular a ativação da via UPR induzindo um aumento na transcrição e tradução de ATF4. O HIV promove o acúmulo de ATF4 em linfócitos T CD4+ durante a fase aguda da infecção, sendo esta proteína importante, de alguma forma, no processo de replicação viral. Além disso, em células pró-monocíticas, o aumento na expressão de ATF4 pode contribuir para a reativação do HIV que se encontrava em sua forma latente (CASELLI et al., 2012).

Assim sendo, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos de interação entre HIV e a ativação da via UPR. Estes estudos poderão promover a identificação de novos alvos terapêuticos que poderão impedir a proliferação do vírus em células infectadas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a ativação da via UPR e o perfil de citocinas séricas em indivíduos HIV soropositivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos.

2.2. Objetivos específicos

a) Padronizar a amplificação do cDNA referente ao mRNA codificante para XBP1, obtido de linfócitos T CD4+, através da reação em cadeia da polimerase (PCR);

b) Identificar a ativação da via UPR através da avaliação da expressão gênica de XBP1 em linfócitos T CD4+;

c) Padronizar a técnica de ELISA para a dosagem de citocinas séricas humanas;

d) Dosar os níveis séricos das citocinas IL-6, TNF- α e IL-10 de indivíduos HIV soropositivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos.

3. Metodologia

3.1. Considerações éticas

Este trabalho foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC (processo 1056/2010). Os voluntários foram esclarecidos quanto aos objetivos da pesquisa e os que demonstraram interesse em participar do estudo, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

3.2. Casuística

Trata-se de um estudo onde os indivíduos elegíveis foram recrutados no Hospital Regional Dr. Homero de Miranda Gomes (São José, SC), no Centro de Testagem e Aconselhamento de São José (São José, SC) e no Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC, Florianópolis, SC). Os voluntários têm idade superior a 18 anos e, de acordo com os critérios de inclusão, os mesmos foram separados em quatro grupos: I- sete indivíduos HIV positivos virgens de tratamento antirretroviral (ST); II- nove indivíduos HIV positivos submetidos à terapia antirretroviral com emprego de inibidores de protease (TCI); III- nove indivíduos HIV positivos submetidos à terapia antirretroviral sem o uso de inibidores de protease (TSI); IV- dez indivíduos HIV negativos, doadores de sangue (C), totalizando 35 voluntários. Foi utilizada como critério de exclusão a infecção por EBV, HCV, HSV-1 ou CMV.

3.3. Separação das amostras

Foram coletados 10ml de sangue periférico de cada voluntário, onde se obteve linfócitos T CD4+ através do uso do *kit RosetteSeP Human CD4+ T Cell Enrichment Cocktail*, (StemCell Technologies). Após leve homogeneização das amostras de sangue periférico com 50µl/ml da solução do respectivo kit, as mesmas permaneceram a temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida foram adicionados às amostras 10ml de uma solução de PBS contendo 2% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab®) e subsequentemente divididos em 3 tubos que continham 4ml de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare®). Os tubos foram então centrifugados por 20 minutos a 1200 x g a 25°C, com a frenagem da centrífuga desativada, permitindo a formação de um gradiente de separação contendo, respectivamente, plasma, linfócitos T CD4+, Ficoll e eritrócitos e outras células. Após este procedimento, foram coletados 4ml de plasma, os quais foram estocados a -80°C até o momento de sua utilização.

As células presentes na interface entre Ficoll e plasma foram coletadas e transferidas para um novo tubo no qual foi adicionado PBS + 2% SBF e centrifugadas por 5 minutos a 500 x g a 25°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi suspenso em 1ml de PBS para que fosse mensurado o número de células viáveis através de contagem em câmara de Neubauer e teste de exclusão com Azul de Tripán. Em seguida as células foram novamente centrifugadas por 5 minutos a 500 x g a 25°C, na presença de PBS antes de serem utilizadas para extração de RNA.

3.4. Extração de RNA e síntese de cDNA para análise da expressão gênica em linfócitos T CD4+ e monócitos

Com o objetivo de obter o RNA total das células avaliadas foi utilizado o *kit PARIS (Protein and RNA Isolation System - Ambion®)*, de acordo com as instruções do fabricante. Após as

lavagens no processo de separação de linfócitos T CD4+, foi adicionado um volume que variou entre 300 a 500µl, de acordo com o número de células, de *Cell Disruption Buffer* gelado, sendo, em seguida, homogeneizadas. Foram coletados 80µl dessas amostras para a extração de RNA e o restante do lisado celular foi estocado a -20°C para serem utilizados em futuras análises protéicas.

Acrescentaram-se 80µl de 2x *Lysis/Binding solution* aos 80µl de lisado celular que teria seu RNA extraído e em seguida a mistura foi homogeneizada. A seguir, foram adicionados 80µl de etanol 100% gelado, seguido de nova homogeneização. A mistura foi adicionada a uma coluna com filtro e centrifugada por um minuto a 11000 x g, sendo o eluato descartado e a coluna reutilizada para os próximos passos. Foram adicionados 700µl de *Wash Solution 1* na coluna com filtro e a mesma foi centrifugada por um minuto a 11000 x g, descartando-se novamente o eluato. Foram adicionados 500µl da *Wash Solution 2/3* à coluna com filtro sendo a mesma, novamente, centrifugada por um minuto a 11000 x g. Este último passo foi realizado duas vezes.

A seguir, a coluna foi transferida para um novo tubo de coleta e adicionaram-se 50µl da *Elution Solution* pré-aquecida a 95°C. O tubo foi centrifugado por 30 segundos a 11000 x g e em seguida foram adicionados mais 10µl da mesma solução pré-aquecida. O tubo foi centrifugado novamente por 30 segundos a 11000 x g e todo o eluato foi coletado e diretamente estocado a -80°C.

O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro através da leitura simultânea da densidade ótica (D.O.) nos comprimentos de onda 260 e 280 nm, de modo a avaliar a concentração de RNA nas amostras, bem como sua pureza. A seguir, volumes contendo de 25 a 120ng de RNA de cada amostra foram tratados com a enzima DNase I (Invitrogen™) a fim de eliminar qualquer resíduo de DNA que pudesse estar presente nas mesmas. Adicionou-se a um volume de cada amostra contendo de 25 a 120ng de RNA, 1µl de 10x DNase I *Reaction*

Buffer, 1µl de DNase I e completou-se o volume da reação para 10µl com água tratada com DEPC. As amostras permaneceram 15 minutos a temperatura ambiente e depois, 1µl de EDTA 25mM foi adicionado à mistura. Em seguida as amostras foram aquecidas a 65°C por 10 minutos e a seguir estocadas para posterior síntese de cDNA.

Para a obtenção da primeira fita de cDNA, 25 a 120ng de RNA total foram reversamente transcritos utilizando-se o *kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen™), de acordo com as instruções do fabricante. Adicionou-se 1µl de oligoDT 50ng/µl e 1µl de *Annealing Buffer* às amostras de RNA e completou-se o volume da reação para 10µl com água tratada com DEPC. As amostras permaneceram a 65°C por cinco minutos e em seguida permaneceram em gelo por 2 minutos. A seguir, foram centrifugadas brevemente a 11000 x g e então foram adicionados às mesmas 10µl de *2x First-Strand Reaction Mix* e 2µl de *SuperScript III/RNaseOUT™ Enzyme Mix*. O material foi homogeneizado e centrifugado brevemente a 11000 x g. Em seguida as amostras foram submetidas a incubações de 50 minutos a 50°C e 5 minutos a 85°C, respectivamente. Após o término, as amostras foram estocadas a -20°C para posteriores ampliações gênicas por PCR.

3.5. Amplificação das sequências gênicas codificantes para XBP1

No intuito de verificar a ativação da via UPR em linfócitos TCD4+ presentes no sangue periférico de indivíduos infectados pelo HIV, submetidos a diferentes esquemas terapêuticos, foi utilizada a técnica de PCR para a amplificação de sequências gênicas codificantes para a proteína XBP1. Para isso, iniciadores específicos descritos por Hiramatsu et al. (2011) foram testados utilizando-se o programa Primer3 (SourceForge) e como conferiram com sequências disponíveis no GenBank para XBP1, mostraram-se aptos a serem utilizados nesse procedimento. A

amplificação de fragmentos de 283 e 257 pares de base correspondem, respectivamente, ao mRNA de XBP1 em sua forma nativa e clivada.

A reação de PCR foi realizada utilizando 10 μ M de cada iniciador específico, 1U de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen™), 200 μ M de cada dNTP, 1,5mM de MgCl₂ e amostras que variaram em concentração de 7,5ng a 36ng de cDNA. Foi realizada uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 58°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, concluindo com uma extensão final a 72°C durante 5 minutos, em termociclador Mastercycler Gradient® (Eppendorf™).

O controle da extração de RNA e da reação de RT-PCR foi realizado através da verificação da presença de um fragmento de 150 pares de bases correspondente à enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Para tal, iniciadores específicos descritos por Pombo-Suarez et al. (2008) (Tabela 1) foram analisados com o programa Primer3 e também mostraram-se aptos a serem utilizados.

Tabela 1. Iniciadores utilizados para amplificação do cDNA referente a XBP1 e GAPDH.

Molécula	Iniciadores
XBP1	F: TTACGAGAGAAAACATCATGGC R: GGGTCCAAGTTGTCCAGAATGC
GAPDH	F: GAGCCACATCGCTCAGACAC R: CATGTAGTTGAGGTCAATGAAGG

F - *Forward* (Senso). **R** - *Reverse* (Anti-senso).

Foram utilizados 10 μ M de cada iniciador específico, 1U de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen™), 200 μ M de cada dNTP, 2mM de MgCl₂ e amostras que variaram em concentração de 7,5ng a 36ng de cDNA. A reação se deu com

uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 34°C por 1 minuto, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, terminando a reação com uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

A amplificação das sequências correspondentes a XBP1 e GAPDH foi avaliada em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata.

3.6. Dosagem dos níveis séricos das citocinas IL-6, TNF- α e IL-10

A fim de quantificar os níveis das citocinas IL-6, TNF α e IL-10 no plasma de indivíduos HIV soropositivos foi empregado o ensaio imunoenzimático ELISA. Foi utilizado o *kit* ELISA MAX™ Deluxe (Biolengend®) para quantificação de IL-6 e *kits* ELISA Ready-SET-Go!® (eBioscience®) para dosagem de TNF- α e IL-10. Placas de 96 cavidades foram sensibilizadas com 100 μ l de anticorpos de captura, por poço, específicos para cada citocina a ser dosada e permaneceram sob incubação a 4°C *overnight*. Em seguida foram realizadas cinco lavagens com uma solução de PBS acrescida de 0,05% de Tween. Foi realizado o bloqueio de cada cavidade adicionando 200 μ l da solução *Assay Diluent 1x*, fornecida no próprio *kit*, seguido de incubação por 1 hora a 25°C.

Novamente foram realizadas 5 lavagens e a seguir 100 μ l das amostras de plasma foram adicionados em cada cavidade, permanecendo sob incubação por duas horas a 25°C. A placa foi novamente lavada 5 vezes e posteriormente foram adicionados em cada cavidade 100 μ l de anticorpos de detecção, conjugados com biotina, que permaneceram sob incubação por 1 hora a 25°C. Foram procedidas 5 lavagens e foram então adicionados 100 μ l de uma solução contendo avidina conjugada com peroxidase a cada poço, permanecendo sob incubação por 30 minutos a 25°C.

A placa foi então submetida a 7 lavagens com solução PBS 0,05% - Tween e então adicionou-se em cada cavidade 100 μ l da solução substrato tetrametilbenzidina (TMB) seguido de

incubação por 15 minutos no escuro a 25°C. Passado o período de incubação, foram acrescentados 50µl da solução de parada H₂SO₄ 2N em cada cavidade e foi realizada a leitura da densidade óptica no comprimento de onda de 450nm em espectrofotômetro (BioTek modelo ELx800). A análise de cada uma das amostras foi realizada com 3 repetições e em triplicata.

3.7. Análise estatística

Inicialmente foi realizado o teste de *Shapiro-Wilk* para verificar a normalidade dos valores obtidos para as diferentes citocinas nas amostras de plasma analisadas. Para avaliar se os valores médios das dosagens de citocinas séricas foram significativamente distintos entre os quatro grupos estudados, foi realizada uma Análise de Variância (ANOVA) *one-way* para os dados que seguiram uma distribuição normal e o teste de *Kruskal-Wallis* para os dados que seguiram uma distribuição não normal, respectivamente. Foram considerados valores de $p > 0,05$ para todos os testes

As análises estatísticas bem como a confecção dos gráficos foram realizados com o auxílio do programa GraphPad 5.01 (Prism®).

4. Resultados e Discussão

4.1. Ativação da via UPR em linfócitos T CD4+

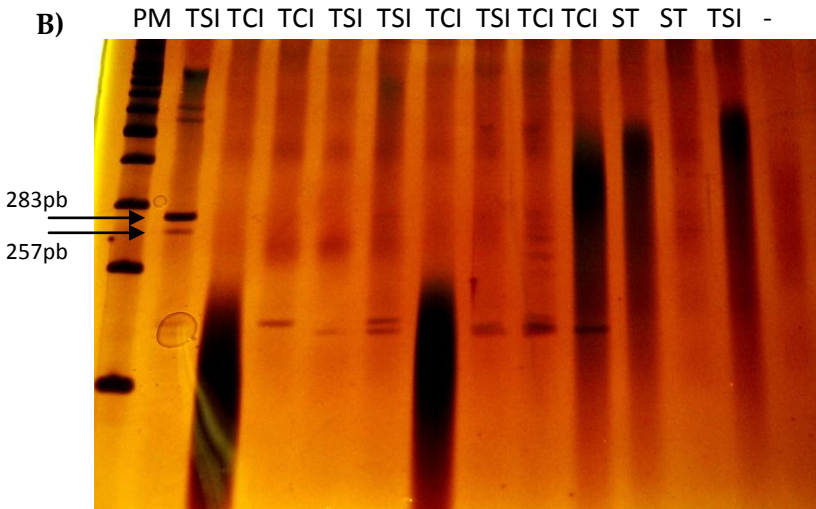
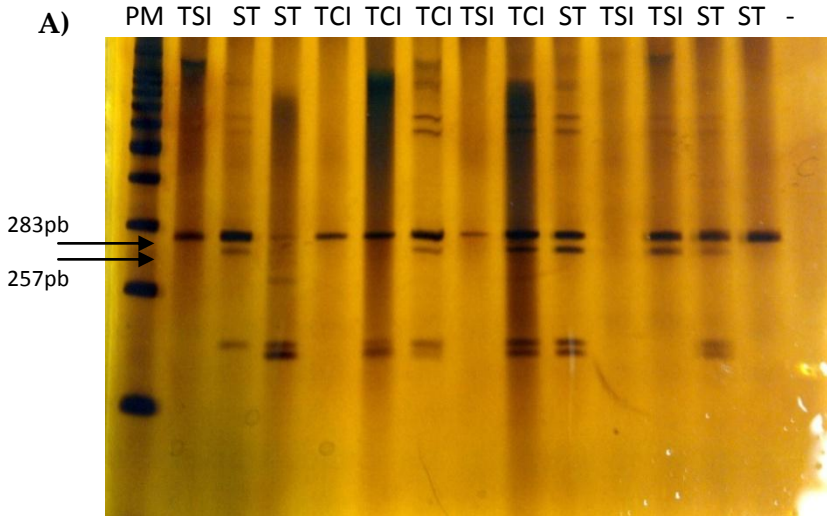
O desenvolvimento da técnica de PCR possibilitou, com grande sucesso, a amplificação de sequências de DNA oriundas de diferentes materiais biológicos. Devido a sua alta sensibilidade e especificidade, esta técnica passou a ser utilizada em diversas frentes, tais como análises de polimorfismos (SAIKI et al., 1985), diagnóstico de diversas doenças (KWOK et al., 1987; WEISS, 1995; MILLAR; XU; MOORE, 2007) e investigações forenses (HEDMAN et al., 2009).

A utilização da transcrição reversa associada a PCR (RT-PCR) ampliou ainda mais as possibilidades de utilização desta técnica. A síntese de moléculas de cDNA a partir de moléculas de mRNA permitiu, dentre diversas aplicações, a detecção de mutações em genes transcricionalmente ativos, bem como a determinação de clivagens alternativas em mRNAs transcritos de um determinado gene (DOHERTY et al., 1989).

Diante de situações de estresse celular, o domínio RNase da proteína IRE1 é capaz de realizar a remoção de um íntron de 26 nucleotídeos do mRNA de XBP1, tornando-o competente para tradução. Esse processo resulta numa proteína que atua como um fator de transcrição de vários genes envolvidos na via UPR (MALHOTRA; KAUFMAN, 2007). Dessa forma, o monitoramento do estado do mRNA de XBP1 fornece um indicativo de ativação de IRE1 e, conseqüentemente, de ativação da via UPR.

A determinação da clivagem do mRNA de XBP1 em linfócitos T CD4+ de indivíduos HIV soropositivos foi realizada através de análise de cDNA por RT-PCR e pôde ser visualizada em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata, como representado na Figura 2. O controle da reação de RT-PCR foi realizado através da amplificação e visualização de um fragmento

de DNA correspondente ao mRNA de GAPDH e está representado na Figura 3.



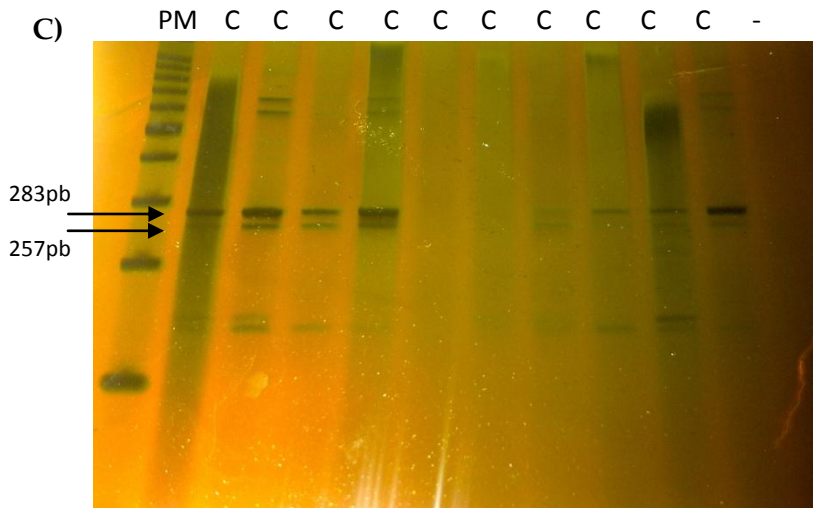


Figura 2. Detecção do cDNA referente ao mRNA de XBP1. Visualização dos produtos de RT-PCR em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. **A)** Colunas: 1 - Padrão de peso molecular; 2 a 14 - Indivíduos HIV + divididos entre os grupos avaliados; 15- Controle negativo. **B)** Colunas: 1 - Padrão de peso molecular; 2 a 13 - Indivíduos HIV + divididos entre os grupos avaliados; 14 - Controle negativo. **C)** Colunas: 1 - Padrão de peso molecular; 2 a 11 - Indivíduos controles, HIV -; 12 - Controle negativo. **ST** - sem tratamento; **TCI** - tratamento com inibidor de protease; **TSI** - tratamento sem inibidor de protease; **C** - Controle.

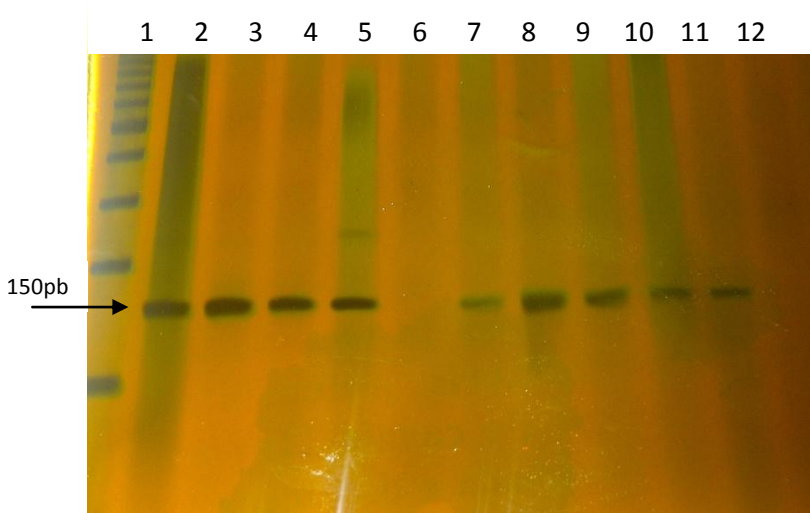


Figura 3. Detecção do cDNA referente ao mRNA de GAPDH. Visualização dos produtos de RT-PCR em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Figura representativa para todas as amostras. 1 - Padrão de peso molecular; 2 a 11 - Indivíduos controles 1 a 10; 12 - Controle negativo.

A amplificação do cDNA referente a GAPDH foi observada em 21 das 25 (84%) amostras de voluntários HIV soropositivos e em 9 de 10 (90%) amostras do grupo controle. Sendo assim, as amostras onde não foi possível observar essa amplificação foram desconsideradas para efeitos de cálculo. Dentre os 21 indivíduos HIV soropositivos analisados, somente em 13 (61%) foi possível verificar a amplificação do cDNA referente a XBP1, enquanto no grupo controle, essa amplificação pôde ser visualizada em 8 de 9 (88%) indivíduos. Em todas as amostras onde foi possível verificar a amplificação de XBP1 também foi possível visualizar a amplificação para GAPDH. A ausência de amplificação de cDNA tanto para XBP1 quanto para GAPDH pode ser consequência da baixa concentração de RNA

total obtido com o *kit* de extração de RNA utilizado no presente estudo.

No grupo controle foi observada a presença de mRNA referente a XBP1 em suas formas clivada nos indivíduos 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 e 10, enquanto nas amostras dos indivíduos 5 e 6 não foi possível observar a presença desse mRNA. Foi possível observar a presença de mRNA de GAPDH em todo o grupo controle com exceção da amostra 5.

No grupo de indivíduos HIV soropositivos foi verificada a presença de mRNA referente a XBP1 apenas em sua forma não clivada nas amostras 1, 4, 5, 7 e 13, indicando ausência de ativação da via UPR. Já nas amostras 2, 3, 6, 8, 9, 11, 12 e 14 do mesmo grupo foi verificada a presença do mRNA de XBP1 em suas formas clivada e não clivada. Nas amostras restantes não foi constatada a presença de mRNA relativo a XBP1. A divisão dessas amostras entre os grupos avaliados pode ser visualizada na Tabela 2. Com relação à GAPDH não foi observada a presença deste mRNA apenas nas amostras 10, 15, 19 e 22.

Tabela 2. Amplificação do cDNA de XBP1 entre os grupos avaliados.

	ST n (%)	TCI n (%)	TSI n (%)	Total n (%)
XBP1 Não Clivado	1 (20%)	2 (50%)	2 (50%)	5 (38%)
XBP1 Clivado	4 (80%)	2 (50%)	2 (50%)	8 (62%)
Total	5	4	4	13

Número de amostras onde foi possível observar amplificação do cDNA referente a XBP1 em cada grupo avaliado. **ST** - sem tratamento; **TCI** - tratamento com inibidor de protease; **TSI** - tratamento sem inibidor de protease.

Diversos estudos *in vitro* utilizam a técnica de RT-PCR para avaliar a clivagem do mRNA de XBP1 *in vitro*. Culturas celulares submetidas ao estímulo com fármacos que sabidamente

são ativadores da via UPR apresentam mRNA de XBP1 em suas formas clivada e não clivada, enquanto culturas livres de qualquer estímulo apresentam-no somente em sua forma não clivada (HIRAMATSU, JOSEPH, LIN., 2011; SHANG, 2011; CAWLEY et al., 2011). Estes trabalhos sugerem que IRE1 somente é ativada em células submetidas a algum tipo de estresse, divergindo dos dados apresentados no presente estudo, no qual as análises foram feitas *in vivo*.

Inicialmente, tentou-se estabelecer uma relação entre o tipo de tratamento antirretroviral utilizado por cada indivíduo e a ativação da via UPR. Esperava-se que fosse encontrado mRNA de XBP1 na forma clivada apenas nos linfócitos T CD4+ de indivíduos HIV soropositivos, especialmente naqueles tratados com inibidores de protease, fármacos capazes de ativar os sensores da via UPR. Contudo, foi observada a presença de mRNA de XBP1 em sua forma clivada não só em indivíduos HIV soropositivos tratados com antirretrovirais inibidores de protease, mas também em indivíduos virgens de tratamento ou naqueles tratados com outra classe de antirretroviral. Este resultado poderia sugerir que a administração de antirretrovirais, inibidores de protease ou não, e a própria infecção pelo HIV poderiam ser capazes de ativarem a via UPR. Tal hipótese logo foi descartada devido a presença de mRNA de XBP1 em sua forma clivada em oito amostras do grupo controle.

A presença de mRNA referente a XBP1 em sua forma clivada em linfócitos T CD4 + no grupo controle é um resultado que pode ser explicado com os trabalhos de Schröder e Kaufman (2005) e Rutkowski e Hegde (2010). Estes estudos indicam que é muito improvável existir uma célula completamente livre de estresse e que a via UPR pode ser ativada em níveis basais, independente da presença de agentes estressores como químicos ou infecções virais, contribuindo, não só para o correto processo de dobramento de proteínas, mas também para a manutenção de funções metabólicas essenciais para a sobrevivência da célula.

O fato de haver mRNA referente a XBP1 clivado em linfócitos T CD4 + nas amostras do grupo controle, bem como a presença de formas unicamente não clivadas do mesmo mRNA em amostras de indivíduos HIV soropositivos permite levantar a hipótese de que o HIV talvez seja capaz de modular a ativação via UPR. Assim como há vários vírus capazes de interferir em pontos específicos dessa via, é possível que o HIV seja capaz de modular a atividade da proteína IRE1, impedindo a clivagem do mRNA de XBP1 e fazendo com que a via UPR não seja ativada por completo. Esta ação poderia ser benéfica ao vírus, uma vez que diminuiria as chances de que a ativação prolongada da via UPR acabe culminando no processo de apoptose celular. Entretanto, estudos complementares são necessários antes de se poder fazer tal afirmação.

Conclui-se que a utilização de RT-PCR qualitativo não é uma metodologia suficientemente satisfatória para a avaliação da ativação de IRE1 e que estudos utilizando esta técnica para avaliar a clivagem de XBP1 *in vitro* não refletem perfeitamente o que acontece em um ser vivo. Uma estratégia mais apropriada para esse tipo de estudo seria empregar a técnica de PCR em tempo real (qPCR) que possibilitaria, além de maior sensibilidade, determinar o número de cópias de mRNA de XBP1, clivadas ou não, presentes em linfócitos T CD4 + de cada indivíduo estudado. Tal abordagem resultaria numa análise mais precisa e permitiria avaliar até que ponto a via UPR é ativada em níveis basais, em quais indivíduos há uma ativação mais elevada da via UPR e se o HIV realmente é capaz de modular a atividade de IRE1 impedindo a clivagem do mRNA de XBP1.

4.2. Quantificação dos níveis séricos de IL-6, IL-10 e TNF- α

Devido a sua alta sensibilidade e especificidade, os ensaios imunológicos passaram a ser constantemente utilizados em laboratórios como ferramentas para a rápida detecção de diversos antígenos com a utilização de anticorpos. Desenvolvido

por Engval e Perlmann (1971) o ensaio imunoenzimático ELISA possibilitou, dentre outras aplicações, a detecção de doenças infecciosas (MATHESON; CHISHOLM; HO-YEN, 1990; SELVARAJAH et al., 2012) e autoimunes (IHN et al., 1996), quantificação de hormônios (ELDER et al., 1986) e citocinas plasmáticas (LEE et al., 1997; MARTIN et al., 2006; STOWE et al., 2010).

A infecção pelo HIV está relacionada a um desequilíbrio nos níveis séricos de diversas citocinas, tais como IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α (KEDZIERSKA; CROWE, 2001). O aumento na produção das citocinas inflamatórias IL-6 e IL-10 também pode estar associado à utilização de fármacos antirretrovirais inibidores de protease, que são ativadores da via UPR (CHEN et al., 2009). Sendo assim, a quantificação dos níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias pode fornecer dados que permitam estabelecer correlações entre a concentração dessas proteínas, ativação da via UPR e o tipo de tratamento utilizado no combate ao HIV.

A determinação das concentrações séricas de IL-6, IL-10 e TNF- α , em indivíduos HIV soropositivos submetidos a diferentes tratamentos antirretrovirais foi realizada empregando-se a técnica de ELISA do tipo “sanduíche”, uma das metodologias mais utilizadas para a detecção de antígenos solúveis (HORNBECK, WINSTON, FULLER, 2001). Os resultados obtidos estão representados na Figura 4 e Tabela 3.

Tabela 3. Concentração sérica média \pm desvios padrão das citocinas IL-6, IL-10 e TNF α .

	IL-6	IL-10	TNF- α
ST	14,98 \pm 37,81	15,26 \pm 12,47	15,32 \pm 15,07
TCI	13,07 \pm 28,01	19,86 \pm 19,8	10,64 \pm 12,42
TSI	4,33 \pm 6,59	19,91 \pm 18,52	22,99 \pm 40,76
C	8,81 \pm 11,21	16,14 \pm 16,69	118,1 \pm 158,7

ST - sem tratamento; TCI - tratamento com inibidor de protease; TSI - tratamento sem inibidor de protease; C - controle.

Roberts et al. (2010) encontraram concentrações significativamente mais elevadas de diversas citocinas, incluindo as analisadas neste trabalho, em indivíduos HIV positivos, durante a fase aguda da infecção. Foi constatado também que a elevação dos níveis séricos de IL-10 e TNF- α está associada à elevada carga viral nos indivíduos analisados. Este estudo pode explicar o fato de não se ter verificado diferenças significativas no perfil de citocinas séricas entre os diferentes grupos, uma vez que todos os participantes do presente trabalho se encontram na fase crônica da infecção pelo HIV e somente os indivíduos virgens de tratamento apresentaram carga viral detectável, apesar de controlada.

Outra possível explicação pode se dever a problemas inerentes a metodologia do ELISA que podem resultar numa subestimação das concentrações das moléculas dosadas. Algumas vezes as citocinas recombinantes utilizadas para o estabelecimento da curva padrão não são idênticas às citocinas plasmáticas e a presença de uma citocina em uma isoforma diferente, mesmo que biologicamente ativa, pode ser suficiente para que determinado anticorpo não seja capaz de se ligar à molécula alvo. Além disso, em amostras de plasma, receptores solúveis, bem como inibidores como a α 2-macroglobulina, podem se ligar a determinadas citocinas impedindo que as mesmas sejam reconhecidas por anticorpos (CHARLOTTE; SYLVIE, 1999).

O presente estudo corrobora o estudo de Homann et al. (2011) no qual foi observado níveis muito reduzidos de IL-6 e TNF- α séricas em indivíduos HIV soropositivos em estágios agudos ou crônicos da infecção. O autor observou que em apenas um indivíduo que se encontrava em fase aguda da infecção foi verificado um aumento na concentração de IL-6 (35,4pg/ml). Em todas as outras amostras avaliadas foram observados níveis

praticamente indetectáveis de IL-6 e TNF- α , até mesmo em indivíduos que utilizam fármacos antirretrovirais, sugerindo que a concentração sérica dessas citocinas seja realmente reduzida.

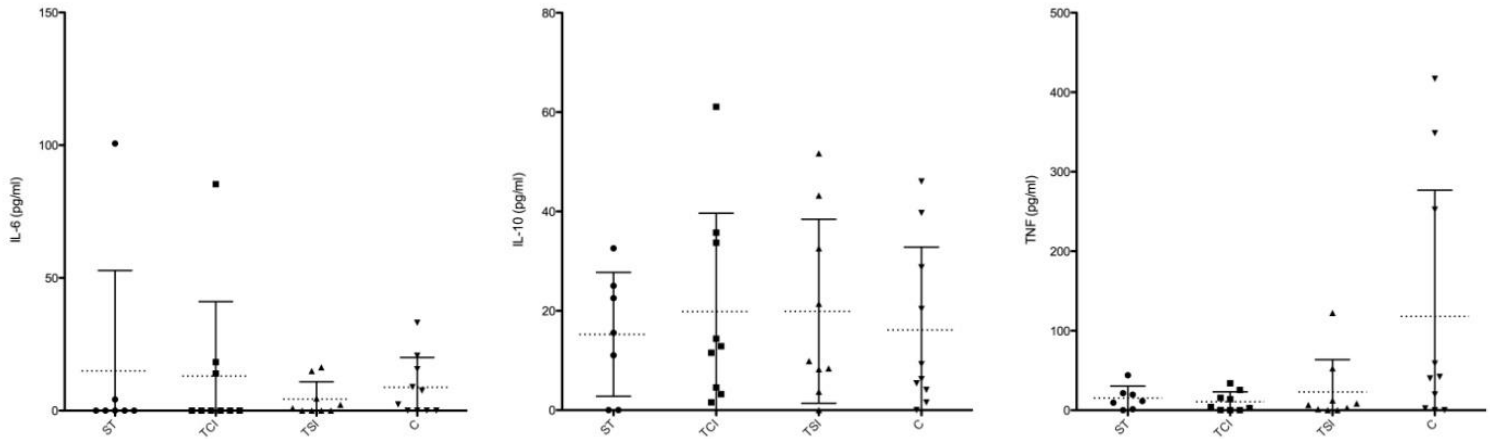


Figura 4. Quantificação de citocinas séricas. A concentração das citocinas IL-6, IL-10 e TNF- α foi quantificada no plasma proveniente de indivíduos HIV soropositivos virgens de tratamento (ST), tratados com inibidores de protease (TCI), tratados sem inibidores de protease (TSI) e de um grupo de indivíduos controle (C), através de um ensaio de ELISA. Os pontos ilustrados nos gráficos demonstram a concentração das citocinas em cada indivíduo analisado, a marcação em pontilhado horizontal denota a média e a marcação em traço vertical demonstra o desvio padrão em cada grupo. O resultado mostrado é representativo de três experimentos independentes.

Foram encontradas, em três voluntários do grupo controle, concentrações de TNF- α muito mais elevadas do que nos outros grupos, resultando numa elevação considerável da concentração média da mesma. Não se sabe ao certo qual a razão desse aumento tão exacerbado, porém existe a possibilidade de mesmo ser decorrente de respostas alérgicas (INCORVAIA et al., 2008; FRISCHMEYER-GUERRERIO et al., 2011).

O aumento do número amostral seria muito importante para diminuir os grandes desvios padrões observados e ainda aumentar a confiabilidade das análises estatísticas, porém houve uma grande dificuldade no recrutamento de pacientes e coleta de material biológico, o que tornou inviável expandir o número de participantes deste estudo. Ainda assim, no presente trabalho, os valores encontrados das citocinas analisadas não se mostraram tão divergentes dos obtidos por Roberts et al. (2010) onde se verificou, em indivíduos HIV soropositivos, um mínimo de 2,43 e máximo de 10,93 pg/ml; 4,86 e 8,3pg/ml; 10,78 e 35,46 pg/ml para IL-6, TNF- α e IL-10, respectivamente. Para o grupo controle foram encontrados valores que variaram de 1,42 a 6,15pg/ml; 1,66 a 3,41pg/ml; 1,66 a 9,17pg/ml para IL-6, TNF- α e IL-10, respectivamente.

Esperava-se encontrar níveis mais elevados das citocinas analisadas nos indivíduos HIV soropositivos, especialmente no grupo ST, e mais baixos no grupo controle, contudo não foi verificada diferença significativa nas concentrações de nenhuma das citocinas dosadas em nenhum dos grupos estudados. Este resultado sugere que a infecção crônica pelo HIV, bem como a administração de antirretrovirais inibidores de protease ou não, não resulta em alterações significativas no perfil de citocinas séricas nos indivíduos HIV soropositivos que participaram deste estudo.

5. Sumário de resultados

- Foi possível observar a amplificação do mRNA codificante para GAPDH em 9 de 10 (90%) amostras do grupo controle, e em 21 de 25 (84%) amostras do grupo HIV soropositivos.
- Foi possível observar amplificação do mRNA codificante para XBP1 em 8 de 9 (88%) amostras do grupo controle, e em 13 de 21 (61%) amostras do grupo HIV soropositivos.
- Todas as amostras do grupo controle em que houve amplificação apresentaram mRNA de XBP1 em suas formas clivada e não clivada.
- De um total de 13, em cinco amostras (38%) de indivíduos HIV soropositivos foi possível verificar a presença de mRNA de XBP1 somente em sua forma não clivada.
- De um total de 13, em oito amostras (62%) de indivíduos HIV soropositivos foi possível observar a presença de mRNA de XBP1 em suas formas clivada e não clivada.
- A metodologia de RT-PCR não é a mais indicada para avaliar a ativação do braço IRE1 da via UPR.
- Não houve diferença significativa na concentração de IL-6, IL-10 e TNF- α entre o grupo controle e os indivíduos HIV soropositivos avaliados, independente do tratamento.

6. Conclusão

A metodologia utilizada no presente trabalho não foi a mais adequada para responder as questões que motivaram seu desenvolvimento. Entretanto, ainda assim foi possível hipotetizar que o HIV seja capaz de modular o braço IRE1 da via UPR, impedindo a clivagem do mRNA de XBP1. Este resultado abre caminho para que estudos futuros sejam realizados em busca de se entender a complexidade da relação entre a infecção pelo HIV e a ativação da via UPR, bem como as consequências deste processo para o organismo como um todo. Além disso, sugere-se que a infecção crônica pelo HIV não resulta em grandes alterações no perfil de citocinas séricas nos indivíduos infectados e talvez esse padrão se altere apenas durante a fase aguda da infecção.

7. Referências Bibliográficas

ASSELAH, T.; BIÈCHE, I.; MANSOURI, A.; LAURENDEAU, I.; CAZALS-HATEM, D.; FELDMANN, G.; BEDOSSA, P.; PARADIS, V.; MARTINOT-PEIGNOUX, M.; LEBREC, D.; GUICHARD, C.; OGIER-DENIS, E.; VIDAUD, M.; TELLIER, Z.; SOUMELIS, V.; MARCELLIN, P.; MOREAU, R. In vivo hepatic endoplasmic reticulum stress in patients with chronic hepatitis C. **Journal of Pathology**, v.221, p.264-274, 2010.

CASELLI, E.; BENEDETTI, S.; GENTILI, V.; GRIGOLATO, J.; DI LUCA, D. Activating Transcription Factor 4 (ATF4) Promotes HIV Type 1 Activation. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 27, n. 00, 2012.

CAWLEY, K.; DEEGAN, S.; SAMALI, A.; GUPTA, S. Assays for Detecting the Unfolded Protein Response. **Methods in Enzymology**, v. 490, p. 31-51, 2011.

CHARLOTTE, D.; SYLVIE, C. Plasma cytokines: what we are measuring. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v.2, p.475-479, 1999.

CHEN, L.; JARUJARON, S.; WU, X.; SUN, L.; ZHA, W.; LIANG, G.; WANG, X.; GURLEY, E. C.; STUDER, E. J.; HYLEMON, P. B.; PANDAK, W. M. JR.; ZHANG, L.; WANG, G.; LI, X.; DENT, P.; ZHOU, H. HIV protease inhibitor lopinavir-induced TNF- α and IL-6 expression is coupled to the unfolded protein response and ERK signaling pathways in macrophages. **Biochemical Pharmacology**, v.78, p.70-77, 2009.

COSTIN, J. M. Cytopathic Mechanisms of HIV-1. **Virology Journal**, v.4, n.100, 2007.

CROSS, S; KOLSON, L; RUZBARSKY, J; VANCE, P; COOK, D; AKAY, C; JORDAN-SCIUTTO, K; KOLSON, D. Induction of the unfolded protein response attenuates HIV replication in macrophages. 2010. Trabalho apresentado na 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2010), San Francisco, California, 2010.

DOHERTY, P. J.; HUESCA-CONTRERAS, M.; DOSCH, H. M.; PAN, S. Rapid amplification of Complementary DNA from Small Amounts of Unfractionated RNA. **Analytical Biochemistry**, v.177, p. 7-10, 1989.

ELDER, P. A.; YEO, K. H. J.; LEWIS, J. G.; CLIFFORD, J. K. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for plasma progesterone: immobilised antigen approach. **Clinica Chimica Acta**, v. 162, p. 199-206, 1987.

ENGVALL, E.; PEARLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, p. 871-874, 1971.

FRISCHMEYER-GUERRERIO, P. A.; GUERRERIO, A. L.; CHICHESTER, K. L.; BIENEMAN, A. P.; HAMILTON, R. A.; WOOD, R. A.; SCHROEDER, J. T. Dendritic Cell and T cell Responses in Children with Food Allergy. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 41, p. 61-71, 2011.

GOUGEON, M. L.; CHIODI, F. Impact of c-chain cytokines on T cell homeostasis in HIV-1infection: therapeutic implications. **Journal of Internal Medicine**, v.267, p.502-514, 2010.

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

HEDMAN, J.; NORDGAARD, A.; RASMUSSEN, B.; ANSELL, R.; RADSTRÖM, P. Improved forensic DNA analysis through the use of alternative DNA polymerases and statistical modeling of DNA profiles. **BioTechniques**, v.47, p. 951-958, 2009.

HIRAMATSU, N.; JOSEPH, V. T.; LIN, J. H. Monitoring and Manipulating Mammalian Unfolded Protein Response. **Methods in Enzymology**, v. 491, p. 183-198, 2011.

HOLLIEN, J.; WEISSMAN, J. S. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. **Science**, v.313, p.104-107, 2006.

HOMANN, S.; SMITH, D.; LITTLE, S. RICHMAN, D.; GUATELLI, J. Upregulation of BST-2/Tetherin by HIV Infection *In Vivo*. **Journal of Virology**, v. 85, n.20, p. 10659-10668, 2011.

HORNBECK, P.; WINSTON, S. E.; FULLER, S. A. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA). **Current Protocols in Molecular Biology**, c. 11, u. 11.2, 2001.

IHN, H.; SATO, S.; FUJIMOTO, M.; KIKUSHI, K.; IGARASHI, A.; SOMA, Y.; TAMAKI, K.; TAKEHARA, K. Measurement of anticardiolipin antibodies by ELISA using β 2-glycoprotein I (β 2-GPI) in systemic sclerosis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 105, p. 475-479, 1996.

INCORVAIA, C.; FRATI, F.; VERNA, N. ALÒ, S. D.; MOTOLESE, A.; PUCCI, S. Allergy and the skin. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 153, p. 27-29, 2008.

KAUFMAN, R. J.; BACK, S. H.; SONG, B.; HAN, J.; HASSLER, J. The unfolded protein response is required to maintain the integrity of the endoplasmic reticulum, prevent oxidative stress

and preserve differentiation in β -cells. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.12, p.99-107, 2010.

KEDZIERSKA, K.; CROWE, S. M. Cytokines and HIV-1: interactions and clinical Implications. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**, v.12, p.133-150, 2001.

KEDZIERSKA, K.; CROWE, S. M.; TURVILLE, S.; CUNNINGHAM, A. L. The influence of cytokines, chemokines and their receptors on HIV-1 replication in monocytes and macrophages. **Reviews in Medical Virology**, v.13, p.39-56, 2003.

KWOK, S.; MACK, D. H.; MULLIS, K. B.; POIESZ, B.; EHRLICH, G.; BLAIR, D.; FRIDMAN-KIEN, A.; SNINSKY, J. J. Identification of human immunodeficiency virus sequences by using in vitro enzymatic amplification and oligomer cleavage detection. **Journal of Virology**, v. 61, n. 5, p. 1690-1694, 1987.

LEE, B.; ORDONEZ, N.; POPEK, E. J.; LU, J.; HELFGOTT, A.; ERIKSEN, N.; HAMMILL, H.; KOZINETZ, C.; DOYLE, M.; KLINE, M.; LANGSTON, C.; SHEARER, W. T.; REUBEN, J. M. Inflammatory Cytokine Expression Is Correlated with the Level of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Transcripts in HIV-Infected Placental Trophoblastic Cells. **Journal of Virology**, v. 71, n. 5, p. 3628-3635, 1997.

LEE, D. Y.; SUGDEN, B. The LMP1 oncogene of EBV activates PERK and the unfolded protein response to drive its own synthesis. **Blood**, v.111, p.2280-2289, 2008.

LEE, D. Y.; LEE, J.; SUGDEN, B. The unfolded protein response and autophagy: herpesviruses rule! **Journal of Virology**, v.83, n.3, p.1168-1172, 2009.

LI, J. C.; YIM, H. C.; LAU, A. S. Y. Role of HIV-1 Tat in AIDS pathogenesis: its effects on cytokine dysregulation and contributions to the pathogenesis of opportunistic infection. **AIDS**, v.24, n.11, p.1609-1623, 2010.

MALHOTRA, J. D.; KAUFMAN, R.J. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.18, p.716-731, 2007.

MARTIN, K.; VIERA, K.; PETR, C.; MARIE, N.; EVA, T. Simultaneous Analysis of Cytokines and Costimulatory Molecules Concentrations by ELISA Technique and of Probabilities of Measurable Concentrations of Interleukins IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, CXCL8 (IL-8), IL-10, IL-13 Occurring in Plasma of Healthy Blood Donors. **Mediators of Inflammation**, v. 2006, p. 1-7, 2006.

MATHESON, B. A.; CHISHOLM, S. M.; HO-YEN, D. O. Assessment of a rapid ELISA test for detection of Epstein-Barr virus infection. **Journal of Clinical Pathology**, v. 43, 691-693, 1990.

MILLAR, B. C.; XU, JIRU.; MOORE, J.E. Molecular Diagnostics of Medically Important Bacterial Infections. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 9, p. 21-39, 2007.

PEÑA, J.; HARRIS, V. Dengue virus modulates the unfolded protein response in a time-dependent manner. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 14226-14236, 2011.

POMBO-SUAREZ, M.; CALAZA, M.; GOMEZ-REINO, J. J.; GONZALEZ, A. Reference genes for normalization of gene expression studies in human osteoarthritic articular cartilage. **BMC Molecular Biology**, v. 9, p. 17, 2008.

ROBERTS, L.; PASSMORE, J. S.; WILLIAMSON, C.; LITTLE, F.; BEBELL, L. M.; MLISANA, K.; BURGERS, W. A.; VAN LOGGERENBERG, F.; WALZL, G.; DJOBA SIAWAYA, J. F.; ABDOOL KARIM, Q.; ABDOOL KARIM, S. S. Plasma cytokine levels during acute HIV-1 infection predict HIV disease progression. **AIDS**, v. 24, p. 819-831, 2010.

RUTKOWSKI, D. T.; HEGDE, R. S. Regulation of basal physiology by the homeostatic unfolded protein response. **The Journal of Cell Biology**, v. 189, n. 5, p. 783-794, 2010.

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

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

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

SCHRÖDER M.; KAUFMAN, R. J. The mammalian unfolded protein response. **Annual Review of Biochemistry**, v.74, p.739-789, 2005.

SELVARAJAH, S.; CHATTERJI, E.; KUHN, R.; KINNEY, R.; VASUDEVAN, S. G. GALLAY, P. Development and Evaluation of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Dengue Capsid. **The Open Virology Journal**, v. 6, p. 29-37, 2012.

SHANG, J. Quantitative Measurement of Events in the Mammalian Unfolded Protein Response. **Methods in Enzymology**, v. 491, p. 293-308, 2011.

SHEN, X.; ZHANG, K.; KAUFMAN, R. J. The unfolded protein response - a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v.28, p.79-92, 2004.

SIERRA, S.; KUPFER, B.; KAISER, R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. **Journal of Clinical Virology**, v.34, p.233-244, 2005.

STOWE, R. P.; PEEK, M. K.; CUTCHIN, M. P.; GOODWIN, J. S. Plasma Cytokine Levels in a Population-Based Study: Relation to Age and Ethnicity. **Journal of Gerontology**, v. 65 A, n. 4, p. 429-433, 2010.

WEISS, J. B. DNA Probes and PCR for Diagnosis of Parasitic Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v.8, n.1, p.113-130, 1995.

WU, X.; SUN, L.; ZHA, W.; STUDER, E.; GURLEY, E.; CHEN, L.; WANG, X.; HYLEMON, P. B.; PANDAK Jr, W. M.; SANYAL, A. J.; ZHANG, L.; WANG, G.; CHEN, J.; WANG, J.; ZHOU, H. HIV protease inhibitors induce endoplasmic reticulum stress and disrupt barrier integrity in intestinal epithelial cells. **Gastroenterology**, v.138, n.1, p.197-209, 2010.

ZHOU, H.; GURLEY, E. C.; JARUJARON, S.; DING, H.; FANG, Y.; XU, Z.; PANDAK, W. M. JR; HYLEMON, P. B. HIV protease inhibitors activate the unfolded protein response and disrupt lipid metabolism in primary hepatocytes. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.291, p.1071-1080, 2006.

ZHOU, H.; PANDAK, W.; HYLEMON, P. Cellular mechanisms of lipodystrophy induction by HIV protease inhibitors. **Future Lipidology**, v.1, p.163–172, 2006.