

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS**

**Avaliação da ativação da via UPR (*Unfolded Protein Response*) em
células de indivíduos HIV positivos sob diferentes esquemas
terapêuticos**

MARIANA BORSA

Florianópolis

2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS**

Mariana Borsa

**Avaliação da ativação da via UPR (*Unfolded Protein Response*) em
células de indivíduos HIV positivos sob diferentes esquemas
terapêuticos**

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

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto

Florianópolis
2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

B738a Borsa, Mariana

Avaliação da ativação da via UPR (Unfolded Protein Response) em células de indivíduos HIV positivos sob diferentes esquemas terapêuticos [dissertação] / Mariana Borsa ; orientador, Aguinaldo Roberto Pinto. - Florianópolis, SC, 2012.

116 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Biotecnologia. 2. HIV (Virus). 3. Imunoensaio. I. Pinto, Aguinaldo Roberto. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

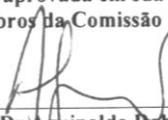
CDU 577.23

“Avaliação da ativação da via UPR (Unfolded Protein Response) em células de indivíduos HIV positivos sob diferentes esquemas terapêuticos”
POR

MARIANA BORSA

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Comissão Examinadora.

Orientador:



Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto
MIP/CCB/UFSC

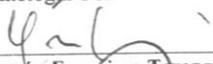
Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Daniel Santos Mansur
MIP/CCB/UFSC



Profa. Dra. Maristela Martins de Camargo
Depto. de Imunologia/USP



Prof. Dr. Hernán Francisco Terenzi
BQA/CCB/UFSC



Profa. Dra. Thais Cristine Marques Sincero
ACL/CCS/UFSC



Prof. Dr. Cláudia Maria Oliveira Simões – CIF/CCS/UFSC
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências/CCB/UFSC
Florianópolis, Fevereiro de 2012.

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

AGRADECIMENTOS

“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes.”

(Isaac Newton)

Acredito que somos um pouco de cada um passou em nossas vidas. Sendo assim, não posso deixar de agradecer a todos que participaram na construção da pessoa e profissional que sou hoje e que estão sempre presentes nos meus pensamentos. Em especial, gostaria de agradecer:

Ao meu orientador Aguinaldo Roberto Pinto, pelos conselhos, pela amizade e pela grande confiança em mim depositadas. Por me dar apoio, orientação e instrumentos para concluir esta importante etapa sem deixar para trás oportunidades que surgiram ao longo do caminho.

Ao professor Carlos Roberto Zanetti, que nos faz ver além do óbvio e ao mesmo tempo nos lembra de enxergar o que há de mais simples.

À Prof. Dr. Maristela M. Camargo pelos esclarecimentos e auxílio científico em relação à via UPR.

Aos médicos Luiz G. E. Ferreira e Isabella A. K. Meirelles pela imensa ajuda no recrutamento dos pacientes e pelo esforço dedicado a esta atividade. Gostaria ainda de agradecer às enfermeiras e demais funcionários do Centro de Testagem e Aconselhamento (CTA) de São José-SC e do Hospital Regional de São José-SC, que foram essenciais para coleta de amostras dos pacientes e sem os quais este trabalho não poderia ser realizado.

À Andrea Petry, responsável pelo setor de Sorologia do HEMOSC, e às enfermeiras do setor de doação de plaquetas da mesma instituição, pela

solicitude, paciência e grande ajuda no recrutamento de voluntários para este estudo.

A todos os integrantes do laboratório de Análises Clínicas CD4/CD8 do Hospital Universitário da UFSC pelo recebimento das amostras de pacientes provenientes do CTA de São José.

Aos meus colegas de turma na Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências pelas discussões científicas, pelo bom convívio e por muitas vezes termos conseguido fazer do limão uma limonada.

Aos meus vizinhos e amigos de corredor, integrantes do LIDI, LVA e PROTO, pela disponibilidade no uso de equipamentos, empréstimo de reagentes e compartilhamento de ideias nos momentos de aperto.

A todos integrantes e ex-integrantes do LIA, pela amizade, companheirismo, compartilhamento de músicas de extremo bom gosto e risadas compartilhadas em frente ao 9GAG: Camila, Carol, Eduarda, Eduardo, Elis, Guilda, Kamille, Luan, Thais, Victor e Yuri. Agradeço especialmente ao Eduardo e ao Yuri, que me auxiliaram no processamento de amostras e realização de experimentos que fizeram parte deste trabalho, além de serem meus companheiros de troca de figurinhas sobre a via UPR. Um agradecimento também especial à Elis, minha amiga e companheira nas dificuldades: as pedras serviram para tornar o percurso mais emocionante.

Às minhas irmãs ‘não-biológicas’ de Biologia – Dai, Lu, Pri e Su – pela amizade incondicional e por sempre falarem comigo como se tivéssemos nos visto ontem, mesmo que tenham se passado semanas ou meses. Sei que sempre poderei contar com vocês.

Aos meus colegas de vida ‘professoral’ no Colégio de Aplicação pela amizade, pelo delicioso convívio, pela paciência ao longo deste último ano e por muitas vezes compreenderem minha ausência e distância necessárias para conclusão deste trabalho.

Aos meus queridos pupilos, pela confiança, pela amizade, pelas fotografias/serigrafias e por este incrível primeiro ano. Certamente sou uma

professora e uma pessoa melhor por causa de vocês. Um agradecimento especial aos meus alunos PIBIC que compreenderam minha limitada disponibilidade de horários para atendê-los e me ajudaram a entender um pouquinho do que é ser orientadora.

À minha família, meus pais e meus irmãos, pelo amor, pelo suporte e pelo incentivo. Por estarem sempre presentes, mesmo que à distância. Sempre há um pouquinho de vocês em tudo que faço.

Ao meu amor, meu melhor amigo... Por me fazer sentir que o amor é o lar. Minhas conquistas sempre trazem muito de ti.

“- Podes dizer-me, por favor, que caminho devo seguir para sair daqui? – perguntou Alice.

- Isso depende muito de para onde queres ir – respondeu o gato.”

(Lewis Carroll)

Mestre não é quem sempre ensina, mas
quem de repente aprende.

(João Guimarães Rosa)

RESUMO

A via UPR (do inglês *Unfolded Protein Response*) é uma resposta celular ao acúmulo de proteínas desenoveladas no lúmen do retículo endoplasmático, possuindo três braços (PERK, IRE1 e ATF6) que atuam sinergicamente em controles traducionais e transcricionais com o objetivo de restabelecer a homeostase celular. Os vírus, ao induzirem a célula a produzir proteínas virais, aumentam a carga de proteínas que devem ser dobradas no retículo endoplasmático, frequentemente causando a ativação da via UPR. O presente trabalho teve como objetivo estudar o impacto da infecção do HIV sobre a via UPR em células de indivíduos HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos. Lisados proteicos provenientes de linfócitos B, linfócitos T CD4+ e monócitos de indivíduos saudáveis e de pacientes HIV positivos virgens de tratamento, sob tratamento antirretroviral sem inibidor de protease ou com inibidor de protease foram avaliados quanto à presença de proteínas relacionadas à via UPR através de Western Blot. BiP teve expressão significativamente maior em linfócitos B de indivíduos HIV positivos. O fator eIF2 α , relacionado ao braço PERK, foi detectado em pacientes HIV positivos sob terapia antirretroviral; na sua forma não-fosforilada foi encontrado em monócitos enquanto na sua forma fosforilada e inativada, em linfócitos B e linfócitos T CD4+. P-IRE1 foi expresso em linfócitos B e linfócitos T CD4+ de indivíduos HIV negativos e pacientes HIV positivos, porém esta expressão mostrou-se significativamente maior em células de indivíduos sob tratamento antirretroviral. Células de indivíduos HIV positivos apresentaram ainda níveis de clivagem e ativação de ATF6 significativamente maiores quando comparados a indivíduos saudáveis. O perfil de ativação da via UPR mostrou-se diferente para indivíduos HIV negativos e HIV positivos e dentre os últimos, indivíduos virgens de tratamento ativaram apenas o braço ATF6 da via UPR, enquanto pacientes sob terapia antirretroviral ativaram os três braços. Os diferentes perfis fenotípicos de expressão de proteínas relacionadas à via UPR parecem estar relacionados à infecção pelo HIV e às cargas virais apresentadas pelos indivíduos HIV positivos, estando estas últimas vinculadas à presença ou não de terapia antirretroviral.

ABSTRACT

The Unfolded Protein Response (UPR) is a mechanism initiated whenever protein folding in the endoplasmic reticulum (ER) is compromised. The UPR pathway has three sensors of ER stress (PERK, IRE1, and ATF6), which promotes the cell metabolism back to homeostasis through transcriptional and translational controls. Virus leads infected cells to produce a great amount of new proteins, which increases the number of unfolded proteins in the ER lumen and activates the UPR signal pathways. The aim of this study was to analyze the HIV infection impact in the UPR activation in cells from HIV-positive individuals under different antiretroviral therapy. Protein lysates from B lymphocytes, T CD4+ lymphocytes and monocytes from healthy individuals, treatment-naive HIV-positive patients, and HIV-positive patients under antiretroviral therapy with or without protease inhibitors were evaluated about their expression of UPR related proteins. Amounts of BiP were significantly higher in B lymphocytes from HIV-positive individuals when compared to healthy individuals. The eIF2 α factor, related to the ER stress PERK sensor, was detected in cells from HIV-positive individuals under antiretroviral therapy; non-phosphorylated eIF2 α was found in monocytes whereas its phosphorylated form was expressed in B lymphocytes and T CD4+ lymphocytes. P-IRE1 was expressed in B lymphocytes and T CD4+ lymphocytes from HIV-negative and HIV-positive individuals, however this expression was significantly higher in cells from treated HIV-positive individuals. Cells from HIV-positive patients also showed higher levels of ATF6 cleavage and activation in relation to healthy individuals. The expression profile of UPR related proteins showed to be different in HIV-negative and HIV-positive individuals. Differences were also detected between the expression protein profiles from treatment-naive and treated HIV-positive individuals. In treatment-naive patients only the ATF6 pathway was activated while in HIV-positive patients under antiretroviral treatment all the three ER stress sensors were activated. These non-equal phenotypes of UPR activation seem to be related to the HIV infection and the viral loads presented by the HIV-positive patients, being the number of infective particles in their plasmas connected to the presence of antiretroviral therapy.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Ativação da via UPR **03**
- FIGURA 2:** Sequência temporal da ativação da via UPR **07**
- FIGURA 3:** Papel da chaperona BiP na ativação dos componentes da via UPR **08**
- FIGURA 4:** Contagem de linfócitos T CD4+ no sangue periférico de pacientes HIV positivos **33**
- FIGURA 5:** Razão quantitativa entre linfócitos T CD4+ e T CD8+ nos pacientes HIV positivos **34**
- FIGURA 6:** Quantificação das subpopulações de linfócitos B, linfócitos T CD4+ e monócitos após purificação **35**
- FIGURA 7:** Análise da frequência de linfócitos B, linfócitos T CD4+ e monócitos nas subpopulações celulares purificadas **36**
- FIGURA 8:** Perfil eletroforético dos lisados proteicos de monócitos, linfócitos B e linfócitos T CD4+ **37**
- FIGURA 9:** Avaliação da expressão da chaperona BiP em monócitos, linfócitos B e linfócitos T CD4+ provenientes de voluntários saudáveis e pacientes HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos. **39**
- FIGURA 10:** Análise comparativa da expressão de BiP em linfócitos B, linfócitos T CD4+ e monócitos provenientes de voluntários saudáveis e pacientes HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos. **40**
- FIGURA 11:** Avaliação da expressão da proteína eIF2 α em monócitos, linfócitos B e linfócitos T CD4+ provenientes de voluntários saudáveis e pacientes HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos. **42**

FIGURA 12: Análise comparativa da expressão de eIF2 α em linfócitos B, linfócitos T CD4⁺ e monócitos provenientes de voluntários sadios e pacientes HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos.

43

FIGURA 13: Avaliação da expressão de P-eIF2 α em monócitos, linfócitos B e linfócitos T CD4⁺ provenientes de voluntários sadios e pacientes HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos.

44

FIGURA 14: Análise comparativa da expressão de P-eiF2 α em linfócitos B, linfócitos T CD4⁺ e monócitos provenientes de voluntários sadios e pacientes HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos.

45

FIGURA 15: Avaliação da expressão de P-IRE1 em monócitos, linfócitos B e linfócitos T CD4⁺ provenientes de voluntários sadios e pacientes HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos.

47

FIGURA 16: Análise comparativa da expressão de P-IRE1 em linfócitos B, linfócitos T CD4⁺ e monócitos provenientes de voluntários sadios e pacientes HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos.

48

FIGURA 17: Avaliação da expressão da chaperona ATF6 em monócitos, linfócitos B e linfócitos T CD4⁺ provenientes de voluntários sadios e pacientes HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos.

50

FIGURA 18: Análise comparativa da expressão de ATF6 em sua forma não clivada (90kDa) em linfócitos B, linfócitos T CD4⁺ e monócitos provenientes de voluntários sadios e pacientes HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos.

51

FIGURA 19: Análise comparativa da expressão de ATF6 em sua forma clivada (50kDa) em linfócitos B, linfócitos T CD4⁺ e monócitos

provenientes de voluntários sadios e pacientes HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos. **52**

FIGURA 20: Perfil de ativação da via UPR em células provenientes de indivíduos HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos. **64**

LISTA DE TABELAS

TABELA 01: Informações clínicas e epidemiológicas dos pacientes HIV positivos recrutados

32

LISTA DE QUADROS

QUADRO 01: Anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo
25

QUADRO 02: Anticorpos utilizados no ensaio de Western Blot
28

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida
ATF4 – do inglês, *activating transcription factor 4*
ATF6 – do inglês, *activating transcription factor 6*
BiP – do inglês, *immunoglobulin binding protein*
CHOP – do inglês, *CCAAT/Enhancer-binding protein homologous protein*
CMV – citomegalovírus
DENV – vírus da dengue
EBV – vírus Epstein-Barr
EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético
eIF2 α - do inglês, *eukaryotic initiation factor 2*
ER – retículo endoplasmático
ERAD – do inglês, *ER associated degradation*
EV71 – enterovírus 71
HCV – vírus da hepatite C
HIV – vírus da imunodeficiência humana
HSV-1 – vírus herpes simplex-1
IFNAR1 – receptor de interferon cadeia alpha/beta
IRE1 – do inglês, *inositol requiring protein*
kDa – kilodalton
LCMV – vírus da coriomeningite linfocítica
LMP-1 – do inglês, *latent membrane protein 1*
MHC – do inglês, *major histocompatibility complex*
mM – milimolar
NF κ B – fator nuclear kappa beta
nm – nanômetros
PERK – do inglês, *PKR-like endoplasmic reticulum kinase*
PKR – do inglês, *RNA like endoplasmic reticulum kinase*
SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida
SFB – soro fetal bovino
TNF- α – fator de necrose tumoral alpha
 μ g – micrograma
 μ l – microlitro
UPR – do inglês, *unfolded protein response*
UV – ultravioleta
V – volt
WNV – vírus do oeste do Nilo
XBP-1 – do inglês, *X-box binding protein 1*
x g – força gravitacional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Identificação dos componentes sinalizadores da via UPR	02
1.2. Ativação da via UPR	06
1.3. Via UPR e infecções virais	09
1.4. HIV e via UPR	13
2. JUSTIFICATIVA	17
3. HIPÓTESE	19
4. OBJETIVOS	21
4.1. Objetivo Geral	21
4.2. Objetivos Específicos	21
5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E METODOLOGIA	23
5.1. Considerações éticas	23
5.2. Grupo de Estudo – Seres Humanos	23
5.3. Desenho Experimental	24
5.4. Separação de subpopulações celulares	24
5.5. Avaliação da pureza das subpopulações celulares	25
5.6. Preparação de lisados celulares das subpopulações celulares purificadas	26
5.7. Análise da expressão de proteínas relacionadas à via UPR através de Western Blot	27
5.8. Avaliação da expressão diferencial de proteínas através de densitometria e análise estatística.....	29
6. RESULTADOS	31
6.1. Características epidemiológicas da população estudada	31
6.2. Análise da pureza das subpopulações celulares obtidas	34

6.3. Avaliação da qualidade dos lisados celulares.....	37
6.4. Avaliação da expressão de BiP em linfócitos B, linfócitos T CD4+ e monócitos	38
6.5. Avaliação da expressão de eIF2 α e P-eIF2 α em linfócitos B, linfócitos T CD4+ e monócitos.....	40
6.6. Avaliação da expressão de P-IRE1 em linfócitos B, linfócitos T CD4+ e monócitos.....	45
6.7. Avaliação da expressão de ATF6 em linfócitos B, linfócitos T CD4+ e monócitos	48
7. DISCUSSÃO	53
8. SUMÁRIO DOS RESULTADOS	67
9. CONCLUSÕES	69
10. PERSPECTIVAS	71
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
12. ANEXOS	83
12.1. Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	83

1. INTRODUÇÃO

A capacidade de resposta de uma célula diante de estímulos e eventuais estresses é essencial para a manutenção de sua homeostase. As causas de estresse celular são muitas e bastante variadas, podendo ser endógenas ou exógenas, e incluem, por exemplo, danos químicos, mutações gênicas, insuficiência de nutrientes, diferenciação celular e também infecções por diferentes patógenos (Walter & Ron, 2011). Diante dessas situações, o processo de dobramento de proteínas é bastante afetado e por isso os compartimentos celulares responsáveis por esta função possuem mecanismos que permitem a detecção de proteínas desenoveladas e a sua correção (Mori, 2009).

O retículo endoplasmático é a organela celular responsável pela síntese, dobramento e modificação de peptídeos e proteínas. Quando perturbações mínimas na estrutura das proteínas nascentes são detectadas é ativada uma via de sinalização intracelular denominada UPR (do inglês *Unfolded Protein Response*) (Schröder, 2008). A UPR é uma resposta bastante eficiente que permite à célula não somente identificar o aumento de proteínas mal dobradas no lúmen do retículo endoplasmático, bem como incrementar a capacidade celular de redobrá-las de maneira correta ou induzir sua degradação. Não sendo esse esforço eficiente na eliminação do excesso de proteínas desenoveladas, a UPR pode ainda induzir a célula à autofagia ou apoptose (Schröder, 2008).

Em células estressadas o aumento da capacidade de dobramento de proteínas no retículo endoplasmático estabelece-se através da indução da expressão de chaperonas e foldases, além do incremento da síntese de fosfolipídeos, causando um aumento do volume do retículo e consequente diminuição do estresse nessa organela (Schröder & Kaufman, 2006). Por outro lado, a demanda por dobramento de proteínas sofre uma redução através da atenuação da transcrição de genes envolvidos na secreção de proteínas e da tradução, aumentando a capacidade do retículo endoplasmático de degradar proteínas através de um mecanismo conhecido como ERAD (do inglês *ER-associated degradation*) (Schröder & Kaufman, 2006).

A via UPR pode ser encontrada desde organismos bastante simples, como as leveduras, até organismos mais derivados chegando aos mamíferos (Mori, 2009). Do ponto de vista evolutivo, todos os eucariotos compartilham mecanismos similares para lidar com elevados níveis de proteínas desenoveladas, tais como o aumento da expressão de chaperonas responsáveis pelo redobramento de proteínas e proteases destinadas a degradar proteínas irreversivelmente desenoveladas. Em leveduras, o aumento dos níveis de proteínas desenoveladas leva a ativação de uma proteína homóloga à encontrada na via UPR de mamíferos que culmina na produção de um fator de transcrição que ativa a expressão de chaperonas. De maneira bastante similar, as células de mamíferos podem incrementar os níveis de chaperonas através de fatores de transcrição produzidos como resultado da ativação de componentes da via UPR. Os metazoários possuem ainda um mecanismo adicional para lidar com o estresse no retículo endoplasmático: a atenuação da tradução através da inibição da formação de um complexo entre as duas subunidades ribossomais (Bernales, Papa, Wagner, 2006). Dessa forma, simultaneamente ao aumento da complexidade dos organismos houve também um incremento na via UPR, que passou a contar com um maior número de moléculas e a influenciar um maior número de mecanismos celulares. Inicialmente o restabelecimento da homeostase celular foi vinculado ao controle transcricional de genes e posteriormente a via UPR passou a contar também com alternativas de controle traducional, sendo que em mamíferos estas duas vias de controle são bastante estabelecidas e estudadas (Mori, 2009).

1.1. Identificação dos componentes sinalizadores da via UPR

Quando o dobramento de proteínas no retículo endoplasmático é comprometido, a via UPR é ativada. Esta ativação pode ser resultante de diferentes condições fisiológicas, como diferenciação e desenvolvimento de células especializadas com alta taxa de secreção de proteínas como as células pancreáticas e os linfócitos B, condições metabólicas alteradas, mutação em genes codificantes para proteínas da via de secreção ou proteínas transmembrana, bem como infecção por determinados patógenos, dando-se destaque aos vírus. Além disso,

algumas intervenções experimentais sabidamente induzem a via UPR, tais como inibição da N-glicosilação no retículo endoplasmático, redução dos estoques intracelulares de cálcio, estresse redutor ou ainda expressão de proteínas mutantes que saturam a capacidade de dobramento do retículo endoplasmático (Walter & Ron, 2011).

Existem três proteínas residentes no retículo endoplasmático que são os principais pontos de regulação da ativação da via UPR: a quinase e endonuclease IRE1, a quinase PERK e o fator de transcrição com zíper de leucina ATF6 (Schróder, 2008) (Figura 1). A atuação sinérgica dessas três moléculas culmina na ativação de genes que codificam para proteínas importantes no dobramento de proteínas como as chaperonas e também proteínas envolvidas em mecanismos de degradação proteica. Além disso, ocorre uma queda no nível de expressão de genes envolvidos nos processos de transcrição e tradução, causando uma diminuição no fluxo de proteínas nascentes na célula como um todo (Walter & Ron, 2011).

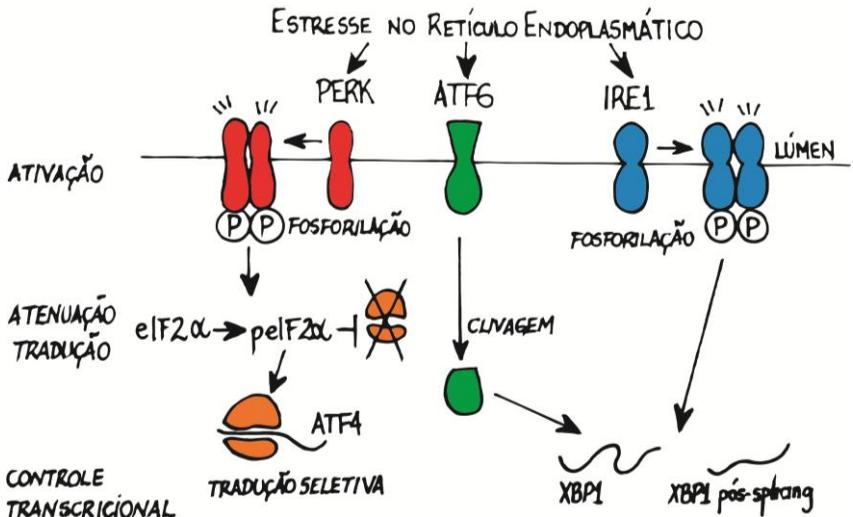


Figura 1: Ativação da via UPR. PERK atua na fosforilação da proteína eIF2 α , levando à inibição de eventos traducionais e simultâneo aumento seletivo da tradução do fator de transcrição ATF4 que induz a expressão de genes envolvidos na ativação da via UPR; ATF6 é ativada após

clivagem e migração até o complexo de Golgi, onde é liberada na sua forma citoplasmática e tem como principal função induzir um aumento da expressão de XBP-1; IRE1 é responsável pelo processamento do RNAm de XBP-1, levando-o à sua forma ativa que atua como fator de transcrição nuclear.

PERK é uma proteína quinase de 150 kDa cujo domínio catalítico possui alta homologia com membros da família das eIF2 α quinases (Harding et al., 2000). Sua autofosforilação na membrana do retículo endoplasmático leva a ativação do seu domínio quinase, que acaba por fosforilar a serina 51 de eIF2 α (Lu, Harding, Ron, 2004) (Figura 1). A adição de um grupamento fosfato a este fator acaba por inibir a interação entre as duas subunidades ribossomais, causando uma generalizada inibição da síntese protéica (Walter & Ron, 2011). Entretanto, apesar do estado geral de redução da tradução, alguns RNAs mensageiros sofrem um aumento na sua expressão em condições onde eIF2 α está fosforilado, como o fator de transcrição ATF4. ATF4 é uma proteína de 39 kDa que regula os promotores de muitos genes envolvidos na ativação da via UPR, incluindo o gene codificante para a chaperona GRP78, também conhecido por BiP (Harding et al., 2003). Dessa forma, ATF4 colabora para o restabelecimento da homeostase na célula através de um aumento da capacidade de dobramento e degradação de proteínas desenoveladas no retículo endoplasmático.

A importância de sinais iniciados após a ativação de PERK é demonstrada também através de estudos realizados em células que não produzem esta proteína ou ainda que possuem eIF2 α não fosforilável, o que leva a um maior risco de colapso das funções celulares diante de estresse no retículo endoplasmático (Harding et al., 2000). O papel de PERK na regulação da morte celular ainda é incerto. Sabe-se que a fosforilação de eIF2 α tem atividade anti-apoptótica a partir do momento que inibe a tradução e a produção de proteínas desenoveladas em situações de estresse no retículo endoplasmático. Porém, uma inibição prolongada da tradução é ao mesmo tempo incompatível com a manutenção da homeostase celular e sobrevivência, levando em um primeiro momento a indução da autofagia. Isto indica que dentro de um contexto onde a autofagia é a última estratégia anterior à apoptose, PERK está relacionado com sobrevivência celular (Boyce et al., 2005).

ATF6 é uma proteína de 90 kDa que possui uma sequência hidrofóbica que a endereça e mantém no retículo endoplasmático (Schröder, 2006). A ativação de ATF6, ao contrário da de PERK e IRE1, não se dá através da sua oligomerização, mas sim através de uma liberação do retículo endoplasmático, quando a interação com BiP é rompida, seguida de endereçamento ao complexo de Golgi (Rutkowski & Kaufman, 2004). No complexo de Golgi, duas proteases residentes clivam a parte da proteína que a mantém presa à membrana, levando à liberação da mesma em uma forma citoplasmática, que consegue então deslocar-se até o núcleo, onde atuará na regulação da expressão de alguns genes (Ye & Goldstein, 2000). ATF6 é capaz de estimular a expressão de genes relacionados a estresse do retículo endoplasmático como um homodímero ou heterodímero através da interação com outros fatores de transcrição como XBP-1. ATF6 também é capaz de induzir a transcrição de XBP-1 e está possivelmente envolvida na regulação positiva do gene da chaperona BiP, resultando num aumento da capacidade de dobramento e degradação de proteínas desenoveladas no retículo endoplasmático (Yamamoto et al., 2007).

IRE1 é uma proteína transmembrana do tipo I de aproximadamente 100 kDa (Kaufman, 2002). Seu domínio endorribonuclease catalisa a remoção de um *intron* de 26 nucleotídeos do RNAm da *X-box-binding-protein 1*, ou XBP-1, tornando-o competente para tradução através de uma mudança na janela de leitura. O resultado dessa tradução é uma proteína de aproximadamente 41 kDa e que atua como fator de transcrição. XBP-1, ao formar um heterodímero com a proteína NF-Y, atua na ativação de inúmeros genes envolvidos na via UPR e também na ERAD (Travers et al., 2000). Além disso, IRE1 é requerida para a clivagem e degradação pós-transcricional de RNAs mensageiros codificantes para proteínas de secreção, diminuindo a carga de atividade de correção de proteínas no retículo endoplasmático (Zhang et al., 2005). De forma similar a muitos membros da família dos receptores do fator de necrose tumoral, IRE1 é capaz de ligar-se à proteína TRAF2 (do inglês *TNF receptor associated factor 2*), induzindo ativação de uma série de quinases envolvidas na imunidade, inflamação e apoptose (Urano et al., 2000), além de regular a atividade de proteínas da família BCL-2, responsáveis pela coordenação de mecanismos relacionados à morte celular (Oyadomari & Mori, 2004).

As três vias de sinalização UPR acima descritas ainda são responsáveis pela indução do fator de transcrição CHoP (do inglês *C/EBP homologous protein*), também conhecido como DDIT3 ou GADD153, reconhecidamente um componente pró-apoptótico (Rutkowski & Kaufman, 2004). O promotor do gene CHOP possui sítios de ligação para todos os maiores indutores da via UPR, incluindo ATF4, ATF6 e XBP-1. Estudos indicam que esses componentes possuem influência na ativação e expressão do fator de transcrição ChoP (Oyadomari & Mori, 2004). Dessa forma, a via UPR pode ser vista como um ponto que pode divergir para três diferentes destinos: o restabelecimento da homeostase, a autofagia como última alternativa pela sobrevivência da célula ou a apoptose.

1.2. Ativação da via UPR

A via UPR é um mecanismo tempo-dependente e os componentes da mesma são ativados de maneira sequencial diante das condições fisiológicas de estresse presentes no retículo endoplasmático (Figura 2). Quando proteínas desenoveladas acumulam-se no lúmen do retículo endoplasmático de mamíferos, inicialmente busca-se o redobramento das mesmas utilizando chaperonas endógenas abundantemente expressas presentes na organela mesmo em condições normais. A atenuação traducional mediada por PERK é o primeiro braço da via UPR a ser ativado, levando a um decréscimo do número de proteínas alvo das chaperonas. Se este mecanismo for suficiente para restabelecer a homeostase celular, a via UPR é finalizada. Porém, se as proteínas desenoveladas persistirem no retículo endoplasmático, ativam-se mecanismos de controle transcricional mediados por ATF6. ATF6 em sua forma ativa atua na indução da expressão de chaperonas e se este aumento da capacidade de dobramento for suficiente para conter a presença de proteínas desenoveladas, a via UPR é finalizada. Permanecendo proteínas sem dobramento correto no retículo endoplasmático, XBP-1 passa a ser sintetizado na sua forma ativa e atua na indução de componentes da ERAD, como resultado da ativação de IRE1. Esta fase possui um comportamento bidirecional à medida que atua através de um aumento da capacidade de dobramento de proteínas aliado à degradação das mesmas (Mori, 2009).

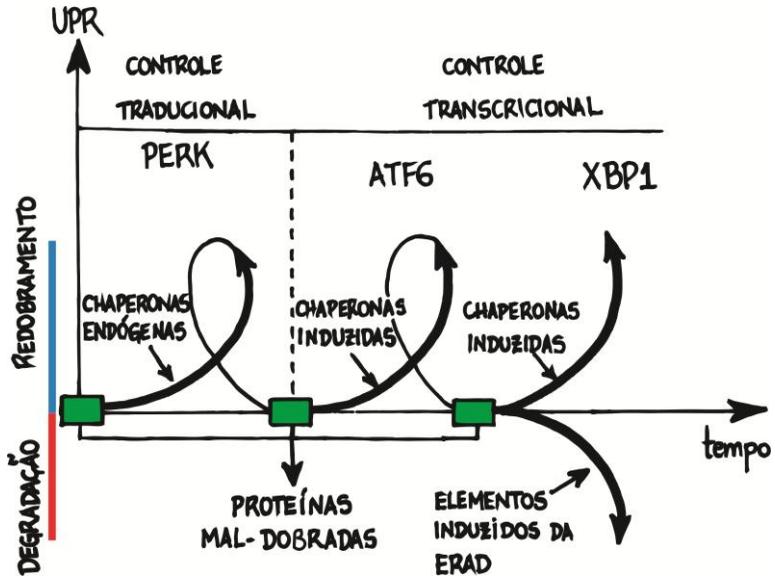
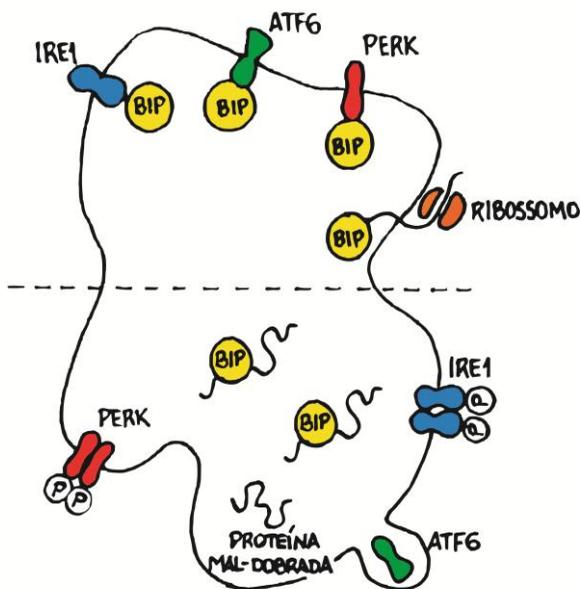


Figura 2: Sequência temporal da ativação da via UPR. Inicialmente a via UPR atua no controle traducional através de PERK inibindo a síntese de novas proteínas e posteriormente, não sendo este mecanismo capaz de restabelecer a homeostase celular, desencadeia-se uma fase de controle transcricional mediado por ATF6/IRE1, que tem como principal função promover a indução da expressão de XBP-1. Não sendo estes mecanismos suficientes no restabelecimento da homeostase celular, ativa-se um processo de degradação de proteínas desenoveladas através de proteassomos, denominada via ERAD.

Três alternativas de ativação da via UPR são atualmente descritas. A primeira delas toma como ponto-chave a interação dos componentes da via UPR com a chaperona BiP, presente no lúmen do retículo endoplasmático (Figura 03). Em condições normais esta chaperona mantém uma interação com os três componentes sinalizadores da via UPR, impedindo a sua ativação (Liu, Xu, Kaufman, 2003). O domínio de ligação de BiP a estas proteínas é rico em resíduos hidrofóbicos e também é responsável pela interação dessa chaperona com as proteínas desenoveladas do lúmen da organela, que caracteristicamente expõem resíduos hidrofóbicos como sinal. Dessa forma a regulação da ativação da via UPR por BiP atua de acordo com o nível de proteínas

desenoveladas presentes no lúmen do retículo endoplasmático. Em condições normais, as moléculas de BiP disponíveis no lúmen interagem com as proteínas que expõem resíduos hidrofóbicos e também com ATF6, IRE1 e PERK. Em condições de estresse, porém há um aumento de proteínas desenoveladas no lúmen do retículo endoplasmático, levando ao desligamento desta chaperona dos três componentes da via UPR, que estariam então livres para serem ativados (Rutkowski & Kaufman, 2004).

RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO em CONDIÇÕES NORMAIS



RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO SOB STRESS

Figura 3: Papel da chaperona BiP na ativação dos componentes da via UPR. Em condições de estresse e subsequente aumento do número de proteínas desenoveladas, a chaperona BiP deixa de interagir com PERK, ATF6 e IRE1 e liga-se a resíduos hidrofóbicos presentes nas proteínas residentes no lúmen do retículo endoplasmático. O desligamento de BiP permite a ativação dos elementos da via UPR

através da homodimerização de PERK e IRE1 e migração de ATF6 ao complexo de Golgi, onde será clivada e adquirirá sua forma citoplasmática ativa.

A segunda alternativa de ativação da via UPR se dá através da proteína ATF6. Em condições normais, ATF6 é altamente glicosilada e retida no retículo endoplasmático através da interação com as lectinas/chaperonas calnexina e calreticulina. Durante o estresse do retículo endoplasmático, essa organela tem seus níveis de Ca^{++} alterados, levando à inibição da interação dessas chaperonas com as proteínas recém-sintetizadas que se apresentam parcialmente glicosiladas. Dessa forma, ATF6 também não é capaz de atingir seus níveis normais de glicosilação e interação com moléculas de calnexina e calreticulina. Essa perda de afinidade auxilia sua liberação do retículo endoplasmático, permitindo sua migração até o complexo de Golgi, onde é processada e clivada em sua forma nuclear, levando assim à ativação da regulação transcricional de genes da via UPR (Hong et al., 2004).

A terceira estratégia de ativação da via UPR ocorre quando IRE1 e PERK atuam diretamente no dobramento de proteínas. Esse mecanismo foi elucidado através da análise da estrutura cristalizada do domínio luminal da proteína IRE1 de leveduras, homóloga à proteína encontrada em mamíferos (Credle et al., 2005). As regiões conservadas do domínio luminal de IRE1 e PERK possuem aproximadamente 22% de identidade e 45% de homologia entre si e são funcionalmente intercambiáveis. A estrutura tridimensional de IRE1 obtida após sua cristalização mostra que esta proteína forma filamentos construídos a partir de uma unidade dimerica de maneira semelhante à MHC, sugerindo que IRE1 e possivelmente PERK seriam capazes de efetuar uma interação direta com as proteínas desenoveladas do lúmen do retículo endoplasmático (Credle et al., 2005).

1.3. Via UPR e infecções virais

A via UPR é ativada diante de estresse celular, podendo este frequentemente ser resultado de uma infecção viral. Os vírus, ao induzirem a célula a produzir novos capsídeos virais, acabam por

umentar a carga de proteínas que devem ser dobradas no retículo endoplasmático levando assim à ativação das vias de sinalização UPR no hospedeiro. Porém, a fim de evitar que a ativação da via UPR impeça a formação de novas partículas virais, os vírus podem modular esta ativação através do controle de IRE1, PERK e ATF6 (Kepp et al., 2009). Vírus como Epstein-Barr (EBV), citomegalovírus (CMV), hepatite C (HCV) e dengue (DENV) são capazes de ativar nas células infectadas os três braços da via UPR. EBV, um vírus da família *Herpesviridae*, infecta linfócitos B, células secretoras profissionais e que por produzirem uma grande quantidade de proteínas, dependem fortemente de um bom funcionamento da via UPR (Gass et al., 2002). Este vírus é capaz de regular dois mecanismos celulares a fim de estimular a fase latente do seu ciclo de replicação: a via UPR e também a autofagia. Uma das proteínas virais, a proteína latente de membrana 1 (LMP-1), é capaz de ativar a via UPR de maneira dose-dependente mimetizando o receptor CD40, que induz a expressão de NF- κ B e culmina na ativação de IRE1, ATF6 e PERK (Lee & Sugden, 2008). Quanto maior a concentração de LMP-1, maior o nível de fosforilação de eIF2 α , levando à inibição da tradução proteica e baixos níveis de proliferação celular (Lam, Sandberg, Sugden, 2004). A ativação de PERK também leva à tradução de ATF4, sendo esse fator responsável pela transcrição do promotor de LMP-1 que passa a se acumular na célula. Porém, a ativação prolongada de PERK não é favorável à infecção viral, pois culminaria em apoptose por um excesso de LMP-1 na célula. A fim de contornar essa situação, LMP-1 também é capaz de ativar mecanismos autofágicos e dessa forma controlar os seus níveis intracelulares através do balanço entre sua degradação e produção (Lee & Sugden, 2008). Adicionalmente, o controle da via UPR pelo EBV permite que XBP-1 tenha seu *intron* removido e se configure na sua forma ativa, requerida por plasmócitos para a secreção de imunoglobulinas, sendo também este o mecanismo responsável pelos elevados e constantes títulos de anticorpos secretados pelas células transformadas com EBV (Costa, Rosa, Camargo, 2011). A diferenciação de linfócitos B *naive* em plasmócitos leva a produção de XBP-1 via IRE1, além da ativação de ATF6 (Gass et al., 2002). Células deficientes no *splicing* de XBP-1 são deficientes no processo secretório (Wen et al., 1999), o que justificaria mais uma vez o comportamento de células B

infectadas por EBV, onde XBP-1 é constantemente processado culminando em células secretoras de altos níveis de anticorpos.

CMV, membro da família *Herpesviridae*, promove a produção de XBP-1 em sua forma ativa, além de induzir o acúmulo de ATF4 nas células infectadas, resultado da fosforilação e inativação de eIF2 α (Isler, Skalet, Alwine, 2005). CMV promove o acúmulo de BiP e o tratamento *in vitro* de células recém-infectadas por CMV com uma toxina que cliva esta chaperona impede a montagem de novas partículas virais (Buchkovich et al., 2008). Dessa forma, a indução de síntese de BiP e seu acúmulo no retículo endoplasmático são essenciais para dar suporte à montagem de novos vírions. A produção de BiP possui ainda uma característica adicional e bastante engenhosa: duas proteínas virais ligam-se à BiP e promovem a degradação do MHC classe I, protegendo a célula infectada do reconhecimento pelas células T do hospedeiro e garantindo maior eficiência na infecção e replicação viral (Lee, Lee, Sugden, 2009).

HCV, membro da família *Flaviviridae*, apresenta duas glicoproteínas no envelope viral, denominadas E1 e E2, responsáveis pela ativação da via UPR (Chan & Egan, 2009). Estas glicoproteínas, ao se acumularem e formarem agregados no retículo endoplasmático induzem estresse nessa organela. O HCV é capaz de induzir os três braços de sinalização da via UPR (ATF6, PERK e IRE1), como demonstrado recentemente em um estudo com pacientes portadores de hepatite C crônica (Asselah et al., 2010). Além disso, ocorre um mecanismo de inibição da resposta imune contra HCV por meio da degradação do receptor de interferon α/β (IFNAR1) em células Huh7 de hepatoblastoma humano através de um mecanismo que leva a ubiquitinação deste receptor e seu posterior endereçamento ao proteassomo (Liu et al., 2009). Esse mecanismo de degradação do IFNAR1 parece estar relacionado com a molécula PERK, uma vez que células PERK $-/-$ mostraram não só a manutenção deste receptor na superfície celular, como também maior resistência à infecção por HCV e melhor resposta a tratamentos pós-infecção utilizando-se interferon (Liu et al., 2009).

O vírus da dengue (DENV), um arbovírus da família *Flaviviridae*, por sua vez, leva a uma ativação e modulação sequencial dos três braços da via UPR, o que permite ao vírus adaptar-se ao estresse celular causado pela infecção e prevenir eventos pró-apoptóticos. Em estágios

precoces da infecção, o braço PERK é ativado, levando à fosforilação de eIF2 α e consequente inibição da tradução proteica. Posteriormente, o braço PERK é inibido, seguido de ativação do braço IRE1, que leva a um aumento dos níveis de *splicing* do RNAm de XBP-1. Em estágios tardios da infecção o braço ATF6 também é ativado, porém células ATF6^{-/-} não apresentam diferença de carga viral em relação a células selvagens. Dessa forma, DENV promove uma ativação sequencial de proteínas relacionadas à via UPR no sentido traducional-transcricional (Peña & Harris, 2011).

HSV-1, pertencente à família *Herpesviridae*, modula a via UPR através da inibição de PERK ou IRE1. Uma das proteínas virais, denominada glicoproteína B, é capaz de ligar-se a PERK e impedir tanto sua ativação quanto a fosforilação de eIF2 α (Mulvey, Arias, Mohr, 2007). A fim de compensar a ausência dessa via, a célula ativa um mecanismo alternativo que culmina também na inativação de eIF2 α através da fosforilação dessa proteína por uma outra quinase, denominada PKR. Porém o genoma do HSV-1 codifica duas proteínas responsáveis por inibir a fosforilação por essa via alternativa: uma delas transporta uma proteína do hospedeiro até eIF2 α levando à sua desfosforilação e a outra liga-se a PKR a fim de impedir sua capacidade de fosforilação (Lee, Lee, Sugden, 2009). Ao impedir a ativação de PERK, o HSV-1 garante a síntese eficiente de suas proteínas e ainda inibe a síntese de CHOP e subsequente indução de apoptose (Oyadomari & Mori, 2004). A mesma proteína que impede a fosforilação de eIF2 α é ainda responsável pelo bloqueio de processos de autofagia na célula hospedeira. A cepa ICP34.5r de HSV-1 é incapaz de expressar esta proteína e apresenta uma capacidade de infecção e replicação até mil vezes menor do que o vírus selvagem, indicando que a manipulação da via UPR e da autofagia são essenciais para o ciclo viral de HSV-1 (Alexander et al., 2007).

Existem ainda vírus capazes de ativar alguns pontos da via UPR e simultaneamente inibir outros. Infecções *in vitro* do enterovírus 71 (EV71), pertencente à família *Enteroviridae*, em células de rhabdomiosarcoma levam a uma superexpressão da chaperona BiP, além da fosforilação do fator eIF2 α . Além disso, EV71 inibe a tradução e ativação de ATF6, sugerindo a capacidade de modulação da via UPR por este vírus (Jheng et al., 2010). O vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV), membro da família *Arenaviridae*, leva a uma indução seletiva

da clivagem de ATF6, enquanto PERK e IRE1 não são ativados (Pasqual et al., 2010). Por fim, o vírus do Oeste do Nilo (WNV), membro da família *Flaviviridae*, também é capaz de modular a ativação da via UPR através da ativação dos braços ATF6 e IRE1, levando a altos níveis de XBP-1 pós-*splicing*. Porém, não há qualquer indício de fosforilação de eIF2 α , sugerindo que a infecção por este vírus iniba a ativação de PERK e consequentemente o controle traducional promovido pela via UPR (Ambrose & Mackenzie, 2011).

1.4. HIV e via UPR

O HIV é um lentivírus pertencente à família *Retroviridae* e responsável pela epidemia de AIDS no mundo (Rambaut et al., 2004). Cada partícula viral tem aproximadamente 100 nm de diâmetro e possui um envelope lipoproteico originado da célula hospedeira. O genoma do HIV-1 possui aproximadamente 10 mil nucleotídeos e é composto por nove genes flanqueados por regiões LTR (do inglês *long terminal repeat*), que não codificam para nenhuma proteína, mas são importantes na regulação da expressão gênica viral e conectam o genoma viral ao DNA da célula hospedeira durante o processo de integração. Os três principais genes virais, *gag*, *pol* e *env*, estão presentes em todos os retrovírus e codificam respectivamente as proteínas do capsídeo, as enzimas virais e as proteínas presentes no envelope (Sleasman & Goodenow, 2003).

A porta de entrada do HIV-1 na célula hospedeira é o receptor CD4 (Dalglish et al., 1984). Esta molécula é encontrada na superfície de linfócitos T, monócitos, macrófagos, células dendríticas e da microglia. A proteína gp120 do envelope viral é capaz de ligar-se ao CD4 e iniciar o processo de infecção. Após esta ligação, ocorre interação entre sítios da gp120 com receptores de quimiocinas CCR5 ou CXCR4. A escolha de um destes receptores vai depender da célula alvo e da cepa viral infectante, mas o desfecho é sempre a fusão do envelope do vírus com a membrana da célula e a liberação do conteúdo viral no citoplasma (Pope & Haase, 2003).

Os primeiros estudos relacionando HIV e via UPR focaram na relação entre estresse no retículo endoplasmático e efeitos adversos do tratamento antirretroviral com inibidores de protease. Os inibidores de

protease são responsáveis por um desequilíbrio no metabolismo de lipídeos, levando a um aumento do colesterol livre que pode ser uma causa de estresse do retículo endoplasmático, com consequente ativação da via UPR (Zhou, Pandak, Hylemon, 2006). A ativação farmacológica da via UPR pode acontecer em diferentes tipos celulares, resultando em algumas patologias específicas. A ativação prolongada da via UPR em macrófagos pode levar à aterosclerose (Zhou et al., 2005; Zhou, Pandak, Hylemon, 2006), em hepatócitos a perturbações no metabolismo de colesterol (Zhou et al., 2006) e em células do sistema nervoso central a uma série de doenças neurodegenerativas ocasionadas pela da interação da proteína Tat do HIV com receptores neuronais (Norman et al., 2008). A ativação da via UPR pelos inibidores de protease em macrófagos também está associada a elevados níveis séricos de citocinas inflamatórias como IL-6 e TNF- α (Chen et al., 2009). Entretanto ainda não se sabe ao certo quais trechos da via UPR são ativados e qual origem dessa manifestação: estresse oxidativo, aumento do colesterol livre ou depleção de cálcio no retículo endoplasmático.

Além da ativação farmacológica da via UPR por inibidores de protease, existem poucos relatos da influência da infecção do HIV sobre este mecanismo de resposta ao estresse. As primeiras evidências dessa possível relação surgiram em estudos sobre o mecanismo de interação da proteína viral Tat com componentes da via UPR. Esta molécula é capaz de promover a fosforilação e inibição do fator eIF2 α através de uma proteína com função semelhante a PERK, denominada proteína-quinase dependente de RNA ou PKR (McMillan et al., 1995). Tat possui um sítio de ligação a PKR e com isso impede a fosforilação de eIF2 α e permite a continuação da tradução e produção de novas proteínas na célula. Estudos realizados com amostras de tecido nervoso cortical de indivíduos HIV-positivos obtidas através de necropsias mostraram uma elevada expressão de BiP e de ATF6, porém a causa desse perfil de expressão não foi identificada, podendo ser ele decorrente da infecção ou ainda uma resposta de proteção celular a componentes citotóxicos presentes no sistema nervoso central destes indivíduos (Lindl et al., 2007).

Recentemente, a infecção por HIV foi relacionada à indução na transcrição e tradução de ATF4, causando um acúmulo deste fator durante a fase aguda da infecção. ATF4 é também responsável por promover a reativação da replicação do HIV em células infectadas,

sugerindo que eventos de estresse no retículo endoplasmático que levam a um aumento de ATF4, como a própria infecção viral, podem ser relevantes para o fim do estado de latência viral (Caselli et al., 2011). Um outro estudo demonstrou ainda que o HIV é capaz de promover um aumento dos níveis de eIF2 α fosforilado em estágios precoces da infecção e durante picos de carga viral em macrófagos cultivados *in vitro* (Cross et al., 2011). O tratamento destas células com inibidor de protease leva a uma robusta indução da via UPR representada pelo aumento dos níveis de eIF2 α fosforilado e BiP, sugerindo que a indução farmacológica da via UPR pode ser capaz de atenuar a replicação do HIV (Cross et al., 2011). Dessa forma, a compreensão da modulação do HIV sobre a via UPR pode contribuir para o surgimento de novos alvos terapêuticos com potencial de inibir a tradução de proteínas virais nas células infectadas.

2. JUSTIFICATIVA

A ativação da via UPR por vírus é um mecanismo natural, decorrente de uma maior demanda por dobramento de proteínas derivada justamente da produção de proteínas virais. Porém, os vírus normalmente interferem na ativação dessa via a fim de evitar que a mesma culmine no processo de apoptose. Dessa forma, diante de infecções virais a via UPR pode ser apenas parcialmente ativada, apresentar componentes funcionalmente inibidos ou ainda um padrão de ativação de proteínas sincronizado com o estágio do ciclo de replicação do vírus invasor. O conhecimento dessas refinadas estratégias leva a uma nova e otimista perspectiva de que a via UPR possa vir a ser um potencial alvo terapêutico para tratamento de infecções virais, como tem acontecido com diversas outras patologias, tais como Alzheimer, diabetes, tumores, doenças auto-imunes e aterosclerose. Evidências sobre a ativação da via UPR em resposta à infecção pelo HIV restringiam-se à avaliação dos efeitos colaterais de fármacos empregados em terapias antirretrovirais e alguns estudos *in vitro* sobre expressão de proteínas como ATF4 e eIF2 α fosforilado em células infectadas com HIV. O presente estudo permitiu descrever outros pontos importantes de sinalização intracelular ativadas por este vírus. Além disso, tendo como objeto de estudo células oriundas de pacientes soropositivos em diferentes estágios de infecção e sob diferentes esquemas terapêuticos, foi possível realizar uma correlação entre a infecção por HIV, os efeitos da terapia antirretroviral e a ativação da via UPR, contribuindo assim para uma maior elucidação do intrincado mecanismo da modulação da via UPR pelo HIV.

3. HIPÓTESE

A hipótese deste estudo é que o HIV é capaz de modular a via UPR e que diferentes esquemas terapêuticos podem interferir nesse processo. Dessa forma, o perfil de ativação da via UPR poderá ser visto como um reflexo da intensidade da replicação viral em indivíduos HIV positivos e da eficácia do esquema terapêutico utilizado para cada paciente.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Estudar o impacto da infecção pelo HIV sobre a via UPR (*Unfolded Protein Response*) em células de indivíduos HIV positivos submetidos ou não à terapia antiretroviral.

4.2. Objetivos Específicos

- a) Identificar a expressão de proteínas relacionadas à ativação da via UPR em monócitos e linfócitos T CD4+;
- b) Avaliar possíveis diferenças entre os padrões de ativação da via UPR em linfócitos T CD4+ e monócitos;
- c) Determinar a ativação da via UPR em linfócitos B decorrente de estresse indireto proveniente de linfócitos T CD4+ e monócitos infectados por HIV;
- d) Elucidar a relação entre a terapia antirretroviral utilizada e o padrão de ativação da via UPR em células de sangue periférico.

5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS & METODOLOGIA

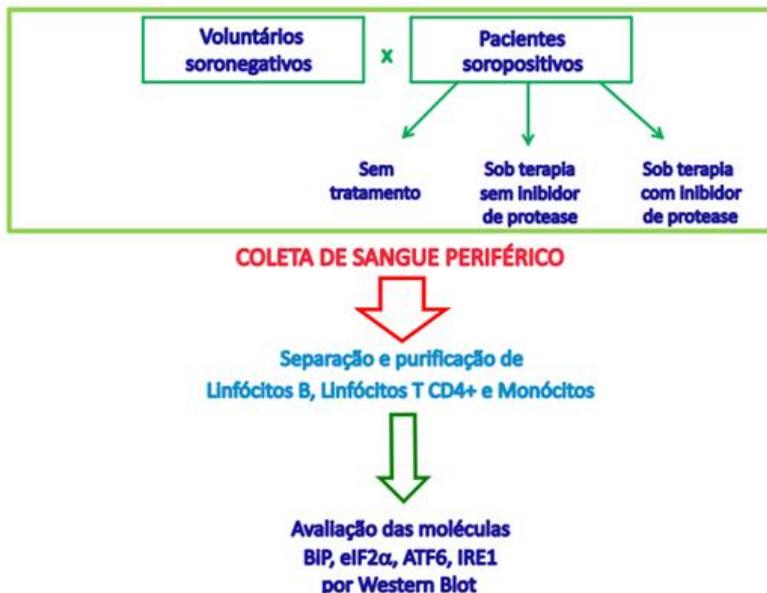
5.1. Considerações éticas

Este estudo foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (processo 1056/2010). Os voluntários recrutados foram esclarecidos quanto aos objetivos do estudo e metodologia utilizada na coleta de amostras. Aqueles que demonstraram interesse em participar da pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 1).

5.2. Grupos de estudo – Seres Humanos

Os indivíduos elegíveis para esta pesquisa possuem idade superior a 18 anos e foram recrutados no Centro de Hemoterapia e Hematologia de Santa Catarina (HEMOSC, Florianópolis, SC), Hospital Regional Dr. Homero de Miranda Gomes (São José, SC) e Centro de Testagem e Aconselhamento (São José, SC). Trata-se de um estudo transversal em que as instituições envolvidas fizeram análises individuais da pesquisa em questão e emitiram pareceres autorizando o desenvolvimento da mesma através do recrutamento de voluntários. Seguindo critérios de inclusão, os indivíduos que aderiram ao estudo foram divididos em quatro grupos distintos: (i) 10 indivíduos HIV negativos doadores regulares de plaquetas (doadores de aférese); (ii) 5 indivíduos HIV positivos que nunca receberam terapia antirretroviral; (iii) 5 indivíduos HIV positivos sob terapia antirretroviral sem inibidor de protease; (iv) 5 indivíduos HIV positivos sob terapia antirretroviral com inibidor de protease. Diagnóstico positivo para HCV e manifestações clínicas de infecções por EBV, CMV e HSV-1 foram considerados critérios de exclusão para qualquer um dos grupos descritos.

5.3. Desenho Experimental



5.4. Separação de subpopulações celulares

Através de punção venosa coletou-se 30 ml de sangue periférico de cada voluntário em tubos Vacutainer® (BD Biosciences) contendo EDTA como anticoagulante. Este volume foi dividido em três frações de 10 ml a partir das quais foram isoladas as populações de linfócitos B, linfócitos T CD4+ e monócitos com o auxílio dos kits *RosetteSeP Human B Cell Enrichment Cocktail*, *RosetteSeP Human CD4+ T Cell Enrichment Cocktail* e *RosetteSeP Human Monocyte Cell Enrichment Cocktail* (StemCell Technologies), respectivamente. Após leve homogeneização de 10 ml de sangue com 500 μ l da solução proveniente do respectivo *kit*, as mesmas foram mantidas em repouso à temperatura ambiente por 20 min. Acrescentou-se então 10 ml de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7,4) enriquecido com 2% de soro fetal bovino (SFB), seguido de

homogeneização. O volume total de cada amostra foi distribuído de forma igualitária e delicadamente em três tubos contendo 4 ml de Ficoll-Paque™ Plus (StemCell Technologies). As amostras foram submetidas à centrifugação por 20 min a 1200 x g a 25°C e, após este procedimento, as células presentes na interface Ficoll-plasma foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS acrescido de 2% de SFB através de centrifugação por 5 min a 500 x g a 25°C, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado celular mantido em gelo. As frações purificadas de linfócitos B, linfócitos T CD4+ e monócitos foram contadas em câmara de Neubauer, sendo a viabilidade celular analisada através de coloração com Trypan blue 0,02% (Invitrogen).

5.5. Avaliação da pureza das subpopulações celulares

A fim de verificar a pureza das subpopulações celulares, uma fração das células obtidas ao final do procedimento de purificação foi destinada a análise fenotípica por citometria de fluxo. Para a verificação do grau de pureza de linfócitos B, linfócitos T CD4+ e monócitos foram utilizados, respectivamente, os pares de anticorpos anti-CD3 /anti-CD19, anti-CD3/anti-CD4 e anti-CD4/anti-CD14 (Quadro 01). Numa placa de 96 cavidades de fundo em “U” adicionou-se 1×10^6 células de cada um dos subtipos celulares purificados, seguido de incubação com 0,1 µg de cada um dos anticorpos descritos por 30 min a 4° C no escuro e subsequente centrifugação com tampão FACS (PBS, EDTA 2 mM, SFB 2%) a 300 x g por 5 min a 4°C. Ao precipitado celular foram adicionados 100 µl de paraformaldeído 4% (pH 7,2), procedendo-se à incubação por 20 min a 4°C em câmara escura, sendo as células posteriormente lavadas 2 vezes com tampão FACS e centrifugadas a 300 x g por 5 min a 4°C. Por fim, as células foram suspensas em 200 µl de tampão FACS e transferidas para tubos de aquisição.

Quadro 01: Anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo

MOLÉCULA-ALVO	FLUORÓFORO	ORIGEM	FABRICANTE	CÓDIGO
CD3	Pacific Blue	Camundongo, clone	BD Pharmingen	558117

		UCHT71		
CD4	Pe-Cy7	Camundongo, clone SK3	BD Pharmingen	557852
CD14	FITC	Camundongo, clone M5E2	BD Pharmingen	555397
CD19	APC	Camundongo, clone HIB19	BD Pharmingen	555415

A aquisição das amostras foi realizada no citômetro de fluxo FACSCanto (BD Biosciences) e os eventos adquiridos analisados através do *software* FlowJo (Tree Star, Inc.). A análise da frequência das subpopulações celulares de interesse foi realizada através de *gate* correspondente às populações de linfócitos B, linfócitos T CD4⁺ e monócitos em amostras de sangue periférico não incubadas com quaisquer anticorpos. Durante a aquisição das células, parâmetros celulares como dispersão da luz frontal (determinado pelo *forward scatter* – FSC) e dispersão de luz lateral (estabelecido pelo *side scatter* – SSC) foram definidos através de ajustes nos detectores FSC e SSC até a obtenção de valores ideais para sangue periférico. Determinou-se ainda a população de células duplo-negativas através de ajustes nos detectores de fluorescência para cada um dos fluoróforos utilizados. Os valores da intensidade de fluorescência dos marcadores de interesse foram determinados separadamente para cada detector utilizando-se anticorpos adequados para cada subpopulação de células e ajustados até obtenção de valores ideais para sangue periférico. Após terem sido estabelecidos os valores acima citados, foram realizadas as aquisições das células marcadas com anti-CD3 e anti-CD19, anti-CD3 e anti-CD4 e anti-CD4 e anti-CD14, totalizando-se 200.000 eventos para cada.

5.6. Preparação de lisados celulares das subpopulações celulares purificadas

O lisado celular das populações celulares purificadas foi obtido com o uso do *kit* PARIS – *Protein and RNA Isolation System* (Ambion, Life Technologies), seguindo-se as instruções do fabricante. Às subpopulações celulares purificadas de linfócitos B, linfócitos T CD4⁺ e monócitos foram adicionados 300 µl de *cell disruption buffer* para cada

1 x 10⁶ células, seguido de pipetagem vigorosa e incubação em gelo por 10 min. A seguir, os lisados proteicos foram armazenados a -20°C na presença de coquetel de inibidor de proteases *Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma-Aldrich). A quantificação proteica destes lisados foi realizada pelo método do ácido bicinconínico (BCA) através do *kit Micro BCA Protein Assay* (Pierce). Uma curva-padrão com concentrações conhecidas de albumina bovina sérica foi confeccionada. As amostras foram incubadas por 2 horas a 37°C na presença do agente colorimétrico e a leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro *Infinite M200* (Tecan) a 562 nm.

Uma alíquota de 100 µl dos lisados de cada um os subtipos celulares foi utilizada para isolamento de RNA total a ser utilizado em ensaios futuros. Aos extratos proteicos foram adicionados consecutivamente 100 µl de *2X Lysis Binding Buffer* e 100 µl de etanol 100%, seguido de quatro inversões dos tubos para homogeneização. As amostras foram transferidas para colunas de purificação disponibilizadas pelo *kit* e acondicionadas em novos tubos coletores, seguido de centrifugação por 1 min a 11.000 x g à temperatura ambiente. O conteúdo que atravessou o filtro das colunas de purificação foi descartado e as colunas foram lavadas por 3 vezes com tampões disponibilizados pelo *kit* através de centrifugações por 1 min a 11.000 x g à temperatura ambiente. A eluição do RNA total foi realizada através da adição da solução de eluição fornecida pelo *kit* aquecida a 95°C, sendo a amostra obtida após centrifugação por 30 s a 11.000 x g a temperatura ambiente e armazenada a -80°C.

5.7. Análise da expressão de proteínas relacionadas à via UPR através de Western Blot

A expressão das proteínas BiP, eIF2 α , eIF2 α fosforilado, ATF6 e IRE1 fosforilado nas subpopulações celulares purificadas de indivíduos pertencentes aos quatro grupos de indivíduos abordados neste estudo foi avaliada através de Western Blot utilizando-se anticorpos específicos (Quadro 02).

Quadro 02: Anticorpos utilizados no ensaio de Western Blot.

MOLÉCULA-ALVO	DILUIÇÃO	ORIGEM	CÓDIGO
BIP	1.000	Camundongo	ab96483
eIF2 α	500	Camundongo	ab5469-50
eIF2 α fosforilado	1.000	Coelho	ab4837
ATF6	500	Camundongo	ab11909
IRE1 fosforilado	2.000	Coelho	ab48187
Imunoglobulina de camundongo	2.000	Coelho	ab6728
Imunoglobulina de coelho	6.000	Cabra	ab6721

Dez μ g de cada um dos lisados proteicos de interesse foram submetidos à separação eletroforética em gel SDS-PAGE 12%, sendo então transferidos para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, metanol 20%), a 30 V por 30 min, no aparelho ECLTM semi-dry (GE Healthcare Life Sciences). A fim de verificar a eficácia do processo de transferência, a membrana foi corada em solução de Ponceau S 0,1% em ácido acético 3% por 5 min. A membrana foi descorada através de lavagem com água destilada e procedeu-se a incubação com solução de bloqueio (TBS [Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4], Tween 20 0,1%, leite desnatado 10%) por 2 h a temperatura ambiente, sob constante agitação. Após o bloqueio, a membrana de nitrocelulose foi incubada por 2-5 h com anticorpo primário específico contra as proteínas de interesse diluído em solução de bloqueio. Após 5 lavagens com TBS Tween 20 0,1% por 5 min sob constante agitação, a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado a peroxidase diluído em solução de bloqueio por 1 h. Foram feitas, então, 5 lavagens da membrana em TBS Tween 20 0,1%, sob constante agitação. Posteriormente ao último procedimento de lavagem, a membrana foi incubada com 1 ml de reagente ECL (GE Healthcare[®]) por 1 min. A membrana foi então utilizada para marcação por quimioluminescência de filmes radiográficos em câmara escura. Finalizando o procedimento, o filme foi inserido em uma máquina de revelação SRX 101-A (Konica Minolta Medical & Graphic) onde foi incubado sequencialmente em

uma solução reveladora, fixadora e água, sendo ao final aquecido a 45 °C para secagem.

5.8. Avaliação da expressão diferencial de proteínas através de densitometria e análise estatística

A análise quantitativa dos dados obtidos nos experimentos de Western Blot foi realizada através da avaliação densitométrica das bandas correspondentes a elementos da via UPR através do *software* ImageJ (disponível em <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). A intensidade da banda foi determinada através da sua densidade subtraída da densidade de fundo do filme, sendo todas as medições realizadas em triplicatas. Os resultados obtidos foram normalizados e submetidos à análise estatística pelo teste paramétrico ANOVA utilizando-se o *software* GraphPad InStat[®]. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Características epidemiológicas da população estudada

O recrutamento de voluntários e coleta de amostras ocorreu entre os meses de abril e setembro de 2011. O grupo de voluntários HIV negativos, indivíduos doadores de plaquetas recrutados no HEMOSC, caracterizou-se por distribuição equitativa de gênero, com 5 homens e 5 mulheres. Quanto aos pacientes HIV positivos, foram recrutados 8 mulheres e 7 homens. O diagnóstico da infecção por HIV nos pacientes recrutados ocorreu há no mínimo dois anos. Os indivíduos virgens de tratamento apresentaram cargas virais detectáveis enquanto todos os pacientes que se encontram sob terapia antirretroviral com ou sem inibidor de protease apresentaram cargas virais abaixo dos níveis detectáveis (Tabela 01). O tratamento destes indivíduos teve início há no mínimo dois anos e todos aderiram à terapia.

Tabela 01: Informações clínicas e epidemiológicas dos pacientes HIV positivos recrutados.

GRUPO	CÓDIGO	ANO DE	DATA	CARGA	CD4/CD8	INÍCIO
ST	I2	2010	06/06/2011	4.105 log 3,613	491/897	-
	I3	2009	08/06/2011	749 log 2,8	608/1617	-
	I9	2009	20/06/2011	519 log 2,715	783/1078	-
	I12	2007	24/08/2011	5.999 log 3,78	478/1067	-
	I13	2007	24/08/2011	32.310 log 4,51	283/637	-
TSI	I1	2007	27/05/2011	<50	297/276	2010
	I7	2007	15/06/2011	<50	938/785	2008
	I10	1997	18/06/2011	<50	1077/871	2002
	I11	2001	18/07/2011	<50	726/1084	2001
	I14	2001	06/09/2011	<50	1481/1871	2008
TCI	I4	2004	08/06/2011	<50	419/1219	2004
	I5	1997	10/06/2011	<50	512/571	1998
	I6	2006	14/06/2011	<50	821/2364	2006
	I8	2000	16/06/2011	<50	1053/1051	2006
	I15	1999	20/09/2011	<50	1645/1081	2001

ST: Indivíduos sem tratamento antirretroviral; **TSI:** Indivíduos sob terapia antirretroviral sem inibidor de protease; **TCI:** Indivíduos sob terapia antirretroviral com inibidor de protease. Os dados de carga viral e contagem de células referem-se às datas das coletas de amostras de sangue periférico utilizadas para análise neste estudo.

A comparação de dados clínicos relacionados à contagem de células nos pacientes HIV positivos permite observar que indivíduos sob tratamento antirretroviral apresentam em média um maior número de linfócitos T CD4+ circulantes (Figura 4), assim como uma razão linfócitos T CD4/CD8 maior (Figura 5). Porém, esta diferença não se mostrou estatisticamente significativa ($p>0,05$) quando analisados as médias e desvios padrão apresentados pelos dados referentes aos três grupos de pacientes HIV positivos.

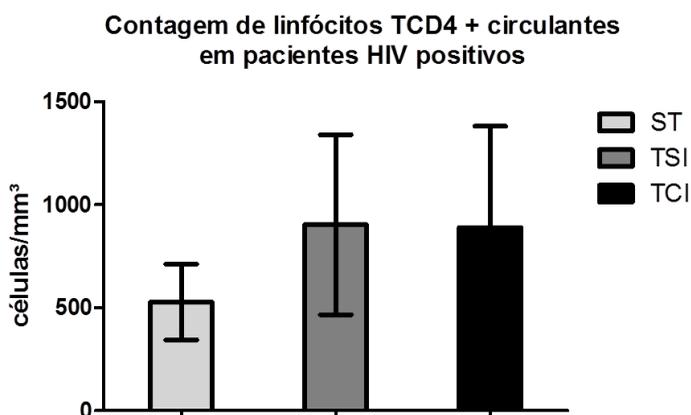


Figura 4: Contagem de linfócitos T CD4+ no sangue periférico de pacientes HIV positivos. ST: pacientes HIV positivos sem tratamento antirretroviral; TSI: pacientes HIV positivos sob tratamento antirretroviral sem inibidor de protease; TCI: pacientes HIV positivos sob tratamento antirretroviral com inibidor de protease.

Razão CD4/CD8 em pacientes HIV positivos sob diferentes esquemas terapêuticos

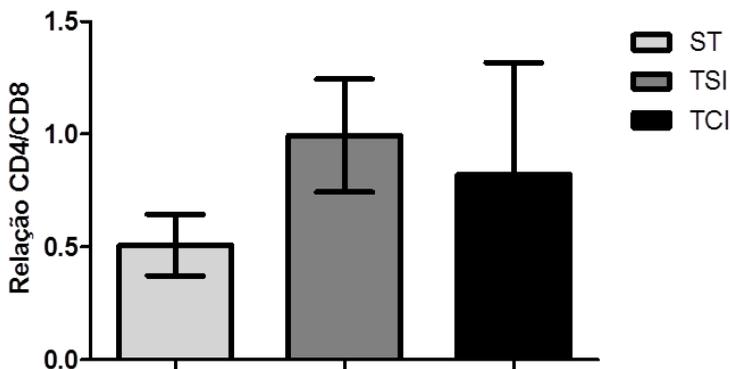


Figura 5: Razão quantitativa entre linfócitos T CD4+ e linfócitos TCD8+ nos pacientes HIV positivos. ST: pacientes HIV positivos sem tratamento antirretroviral; TSI: pacientes HIV positivos sob tratamento antirretroviral sem inibidor de protease; TCI: pacientes HIV positivos sob tratamento antirretroviral com inibidor de protease.

6.2. Análise da pureza das subpopulações celulares obtidas

Após a separação das subpopulações celulares de linfócitos B, linfócitos T CD4+ e monócitos a partir das amostras de sangue periférico obtidas, procedeu-se à contagem celular em câmara de Neubauer a fim de quantificar o número de células viáveis disponíveis para posteriores análises. Não foram observadas diferenças significativas entre as contagens de células dos grupos de indivíduos avaliados neste estudo ($p>0,05$) (Figura 6), tanto em relação à infecção por HIV quanto em relação ao tipo de terapia aos quais os pacientes estavam ou não sendo submetidos, o que diverge dos dados clínicos apresentados no item 6.1 e sugere que existe uma limitação da capacidade quantitativa de separação de subtipos celulares pelo *kit* de purificação utilizado.

Contagem de subpopulações celulares pós-purificação

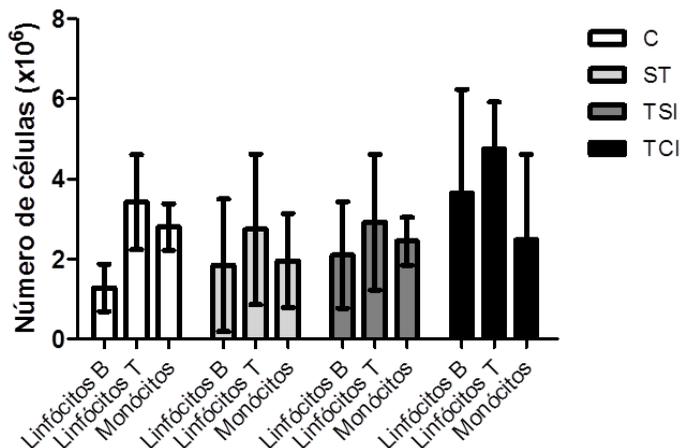


Figura 6: Quantificação das subpopulações de linfócitos B, linfócitos T CD4+ e monócitos após purificação. C: voluntários doadores de plaquetas; ST: pacientes HIV positivos sem tratamento antirretroviral; TSI: pacientes HIV positivos sob tratamento antirretroviral sem inibidor de protease; TCI: pacientes HIV positivos sob tratamento antirretroviral com inibidor de protease.

Com o intuito de verificar a pureza das subpopulações celulares obtidas e consequente viabilidade para análises posteriores, as mesmas foram submetidas a avaliação fenotípica por citometria de fluxo. A subpopulação de linfócitos B (CD3+/CD19+) apresentou pureza de 74,4% (Figura 7A). Para linfócitos T CD4+ (CD3+/CD4+) a pureza encontrada foi de 93,4% (Figura 7B), enquanto que a subpopulação de monócitos (CD4+/CD14+) apresentou pureza de 71,2% (Figura C). Dessa forma, todas as subpopulações celulares avaliadas apresentaram grau de pureza compatível com a análise de expressão de proteínas correlacionadas aos seus fenótipos, já que as células de interesse – linfócitos B, linfócitos T CD4+ e monócitos – mostraram constituir a maioria das células obtidas após separação.

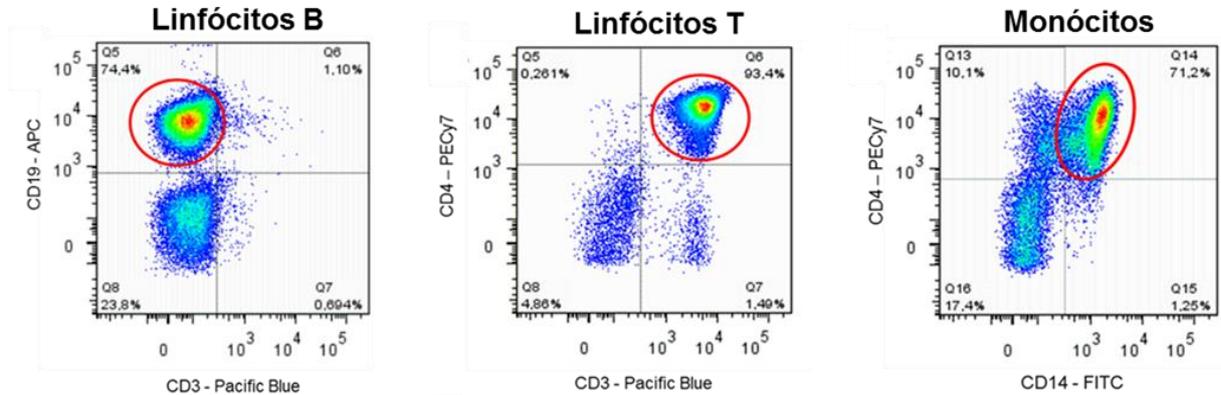


Figura 7: Análise da frequência de linfócitos B, linfócitos T CD4+ e monócitos nas subpopulações celulares purificadas. As células foram marcadas com os anticorpos conjugados a fluoróforos, como indicado nos eixos x e y dos gráficos aqui representados e adquiridas em citômetro de fluxo.

6.3. Avaliação da qualidade dos lisados celulares

A integridade, qualidade e uniformidade das proteínas presentes nos lisados de linfócitos B, linfócitos T CD4+ e monócitos foram avaliadas visualmente através da transferência de proteínas separadas eletroforéticamente para membranas de nitrocelulose, que foram subsequentemente coradas com Ponceau S 0,1% em ácido acético 3%. Através deste procedimento pode-se verificar a eficácia da quantificação proteica feita através do método BCA diante da observação de quantidades similares de proteínas entre os lisados de cada uma das subpopulações celulares (Figura 8). As imagens são representativas para as subpopulações celulares estudadas, tendo sido observados perfis semelhantes em amostras provenientes de indivíduos HIV negativos e HIV positivos.

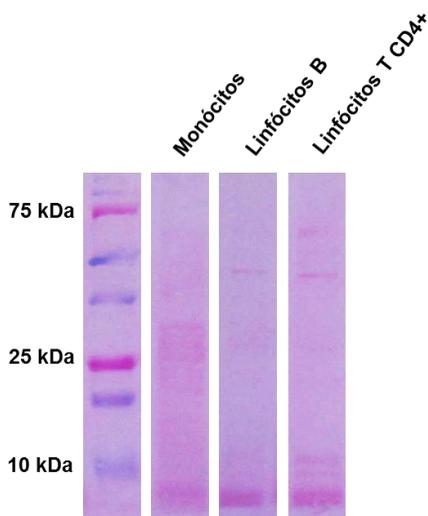


Figura 8: Perfil eletroforético dos lisados proteicos de monócitos, linfócitos B e linfócitos T CD4+. Os lisados celulares foram submetidos à separação eletroforética em SDS-PAGE 10%, transferidos para membrana de nitrocelulose e corados com solução Ponceau S 0,1% em ácido acético 3%. O padrão de massa molar está à esquerda.

6.4. Avaliação da expressão de BiP em linfócitos B, linfócitos TCD4+ e monócitos

Com o objetivo de avaliar o perfil de expressão da chaperona BiP foram realizados ensaios de Western Blot utilizando anticorpo anti-BiP para detecção desta proteína nos lisados proteicos oriundos de linfócitos B, linfócitos T CD4+ e monócitos. Após análise comparativa da expressão de BiP nos diferentes subtipos celulares oriundos do grupo controle e dos pacientes HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos foi possível verificar um aumento da presença dessa chaperona em linfócitos B de indivíduos infectados quando comparado ao grupo controle representado pelos doadores de plaquetas (Figura 9). Este aumento foi significativo ($p < 0,05$) e não se mostrou relacionado com o tipo de terapia antirretroviral ao qual o paciente HIV positivo estava submetido (Figura 10). Linfócitos B oriundos de pacientes virgens de tratamento apresentaram uma expressão de BiP 2,5 vezes maior do que os pertencentes à indivíduos saudáveis. Para linfócitos B oriundos de pacientes sob tratamento antirretroviral sem inibidor de protease esse aumento foi de 3,5 vezes, enquanto para pacientes sob tratamento com inibidor de protease foi de 4,5 vezes. Além disso, a avaliação densitométrica das bandas obtidas por Western Blot permitiu identificar um aumento da expressão de BiP em monócitos e linfócitos T CD4+ de pacientes HIV positivos submetidos à terapia antirretroviral em comparação ao grupo de indivíduos HIV negativos (Figura 10). Dessa forma, a expressão de BiP nas subpopulações celulares estudadas mostrou-se relacionada à infecção por HIV, tendo os linfócitos B apresentado aumento significativo da expressão dessa chaperona em indivíduos infectados comparando-se a indivíduos saudáveis.

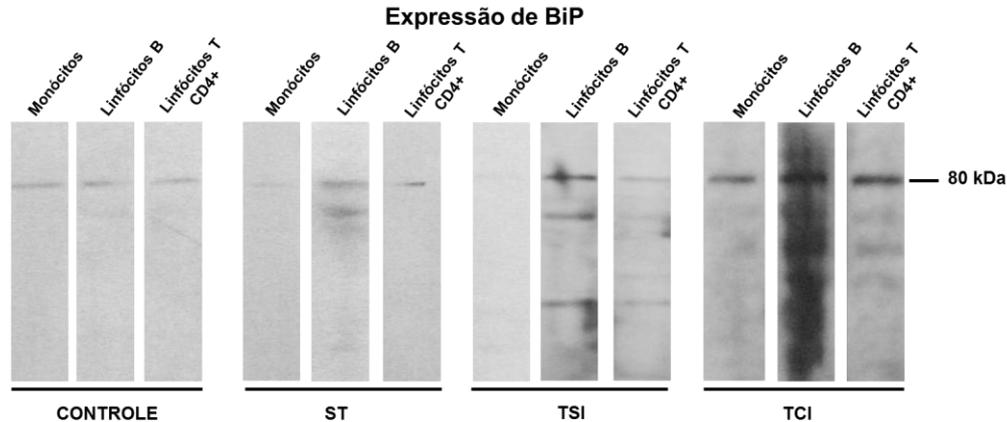


Figura 9: Avaliação da expressão da chaperona BiP em monócitos, linfócitos B e linfócitos T CD4+ provenientes de voluntários saudáveis e pacientes HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos. C: voluntários saudáveis; ST: pacientes HIV positivos não submetidos à terapia antirretroviral; TSI: pacientes HIV positivos submetidos a terapia antirretroviral sem inibidor de protease; TCI: pacientes HIV positivos submetidos a terapia antirretroviral com inibidor de protease. As bandas acima representadas correspondem a uma proteína de massa molar aproximada de 80 kDa, compatível com o peso esperado da chaperona BiP. As imagens acima apresentadas são representativas para os 5 indivíduos de cada um dos grupos de estudo.

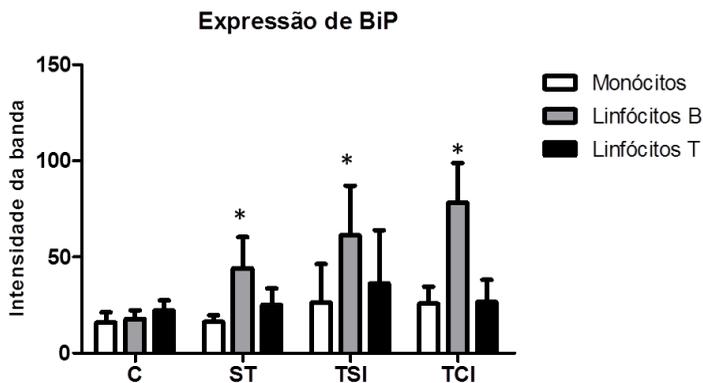


Figura 10: Análise comparativa da expressão de BiP em linfócitos B, linfócitos T CD4+ e monócitos provenientes de voluntários sadios e pacientes HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos. Linfócitos B apresentaram aumento significativo na expressão de BiP em pacientes HIV positivos. C: voluntários sadios; ST: pacientes HIV positivos não submetidos à terapia antirretroviral; TSI: pacientes HIV positivos submetidos a terapia antirretroviral sem inibidor de protease; TCI: pacientes HIV positivos submetidos a terapia antirretroviral com inibidor de protease. Asteriscos representam $p < 0,05$.

6.5. Avaliação da expressão de eIF2 α e P-eIF2 α em linfócitos B, linfócitos T CD4+ e monócitos

A expressão da proteína eIF2 α foi avaliada em sua forma ativa e inativa, quando apresenta-se fosforilada. Em indivíduos HIV negativos não foi possível detectar esta proteína em nenhuma das suas formas, assim como em indivíduos HIV positivos não submetidos à terapia antirretroviral (Figuras 11 e 13). Em indivíduos HIV positivos tratados, essa proteína mostrou ter expressão diferencial entre os diferentes subtipos celulares: na sua forma não-fosforilada e ativa foi encontrada somente em monócitos (Figuras 11 e 12) e sua forma fosforilada e inativada pode ser identificada em linfócitos B e linfócitos T CD4+ (Figuras 13 e 14). Em indivíduos sob tratamento sem inibidor de

protease, houve expressão significativa de P-eIF2 α em linfócitos B e T CD4+ ($p < 0,05$) em comparação aos indivíduos controle e não-tratados; já indivíduos sob tratamento com inibidor de protease apresentaram expressão significativa de P-eIF2 α ($p < 0,05$) em linfócitos T CD4+ comparando-se também aos indivíduos controle e não-tratados (Figura 14). Pode-se concluir a partir destes resultados que somente pacientes HIV positivos sob tratamento apresentaram expressão de eIF2 α e que a sua inativação e fosforilação, relacionada à ativação da via UPR, ocorreu em somente em linfócitos B e T CD4+.

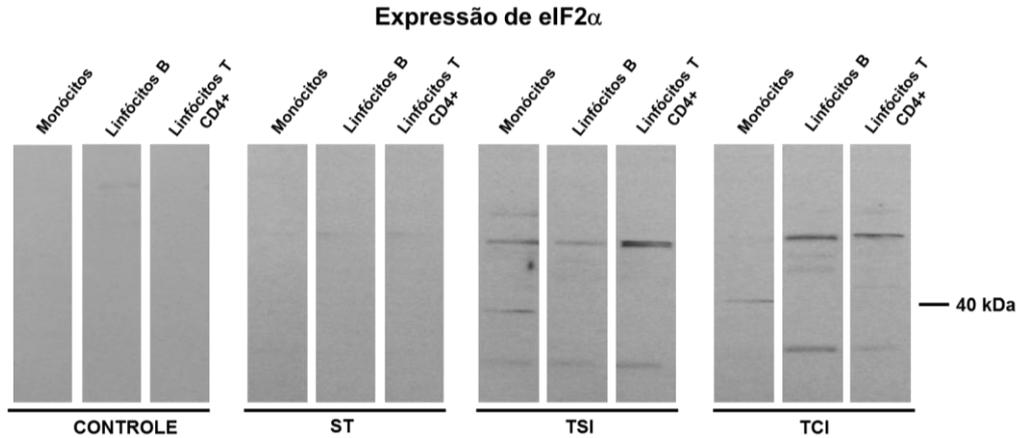


Figura 11: Avaliação da expressão da proteína eIF2 α em monócitos, linfócitos B e linfócitos T CD4+ provenientes de voluntários saudáveis e pacientes HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos. C: voluntários saudáveis; **ST:** pacientes HIV positivos não submetidos à terapia antirretroviral; **TSI:** pacientes HIV positivos submetidos à terapia antirretroviral sem inibidor de protease; **TCI:** pacientes HIV positivos submetidos à terapia antirretroviral com inibidor de protease. As bandas acima representadas correspondem a uma proteína de massa molar aproximada de 37 kDa, compatível com o peso esperado de eIF2 α . As imagens acima apresentadas são representativas para os 5 indivíduos de cada um dos grupos de estudo.

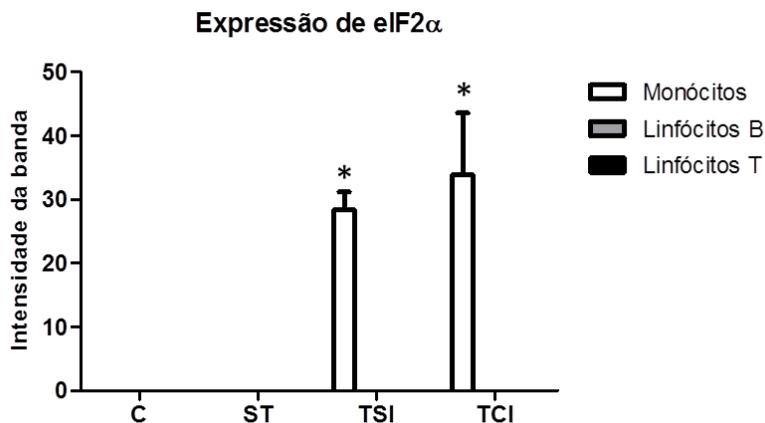


Figura 12: Análise comparativa da expressão de eIF2 α em linfócitos B, linfócitos T CD4⁺ e monócitos provenientes de voluntários saudáveis e pacientes HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos. C: voluntários saudáveis; ST: pacientes HIV positivos não submetidos à terapia antirretroviral; TSI: pacientes HIV positivos submetidos a terapia antirretroviral sem inibidor de protease; TCI: pacientes HIV positivos submetidos a terapia antirretroviral com inibidor de protease. Asteriscos representam $p < 0,05$.

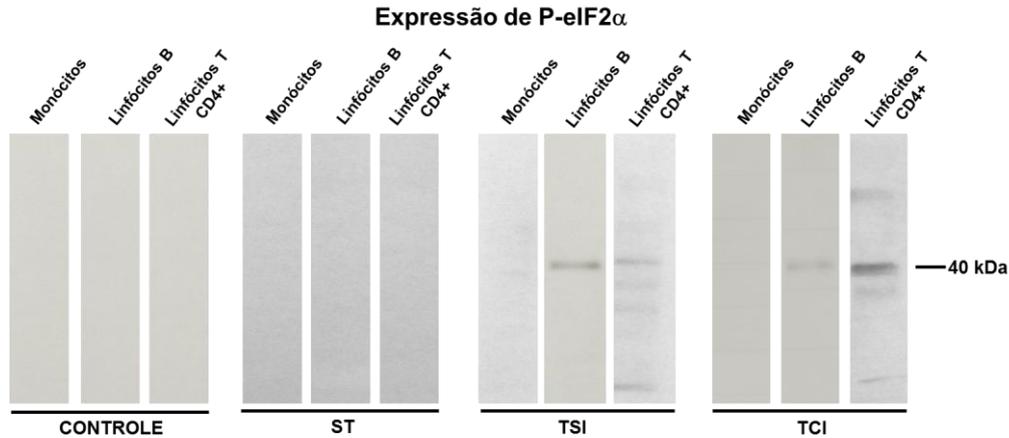


Figura 13: Avaliação da expressão de P-eIF2 α em monócitos, linfócitos B e linfócitos T CD4⁺ provenientes de voluntários sadios e pacientes HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos. C: voluntários sadios; ST: pacientes HIV positivos não submetidos à terapia antirretroviral; TSI: pacientes HIV positivos submetidos à terapia antirretroviral sem inibidor de protease; TCI: pacientes HIV positivos submetidos à terapia antirretroviral com inibidor de protease. As bandas acima representadas correspondem a uma proteína de massa molar aproximada de 40 kDa, compatível com o peso esperado de P-eIF2 α . As imagens acima apresentadas são representativas para os 5 indivíduos de cada um dos grupos de estudo.

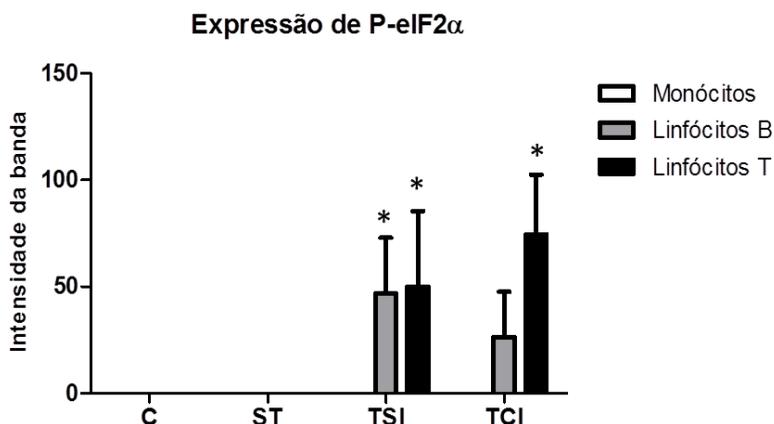


Figura 14: Análise comparativa da expressão de P-eIF2 α em linfócitos B, linfócitos T CD4 $^{+}$ e monócitos provenientes de voluntários saudáveis e pacientes HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos. C: voluntários saudáveis; ST: pacientes HIV positivos não submetidos à terapia antirretroviral; TSI: pacientes HIV positivos submetidos a terapia antirretroviral sem inibidor de protease; TCI: pacientes HIV positivos submetidos a terapia antirretroviral com inibidor de protease. Asteriscos representam $p < 0,05$.

6.6. Avaliação da expressão de P-IRE1 em linfócitos B, linfócitos T CD4 $^{+}$ e monócitos

A proteína IRE1 teve sua presença avaliada em sua forma fosforilada e ativada. Bandas correspondentes ao seu tamanho esperado, de aproximadamente 100 kDa, foram identificadas somente em lisados oriundos de linfócitos B e T CD4 $^{+}$ (Figura 15). Essa expressão ocorreu em células de indivíduos pertencentes aos quatro grupos de estudo aqui apresentados. Pode ser observado nível de expressão significativamente maior em linfócitos B de indivíduos sob tratamento sem inibidor de protease ($p < 0,001$) e linfócitos T CD4 $^{+}$ de indivíduos sob tratamento com inibidor de protease ($p < 0,001$) em relação a células de indivíduos

controle ou não-tratados (Figura 16). Linfócitos B de pacientes em terapia antirretroviral sem inibidor de protease apresentaram uma expressão de P-IRE1 11 vezes maior do que a encontrada em indivíduos saudáveis e 5 vezes maior do que a de indivíduos não-tratados. Linfócitos T CD4⁺ de pacientes sob tratamento com inibidor de protease demonstraram expressão de P-IRE1 7 vezes maior do que voluntários saudáveis e 10 vezes maior do que pacientes HIV positivos não-tratados. Entre os indivíduos HIV positivos submetidos à terapia antirretroviral sem inibidor de protease, a expressão de P-IRE1 em linfócitos B foi 2,2 vezes maior do que em linfócitos T CD4⁺ ($p < 0,01$). Em pacientes sob terapia antirretroviral com inibidor de protease a expressão desta mesma molécula mostrou-se 5 vezes em linfócitos T CD4⁺ em comparação a linfócitos B ($p < 0,01$). Assim, estes resultados sugerem que o aumento da expressão de P-IRE1, indicativo de ativação da via UPR, está relacionada a indivíduos HIV positivos submetidos à terapia antirretroviral, tendo os indivíduos HIV positivos virgens de tratamento apresentado resultados semelhantes aos indivíduos saudáveis no que se refere à expressão desta molécula.

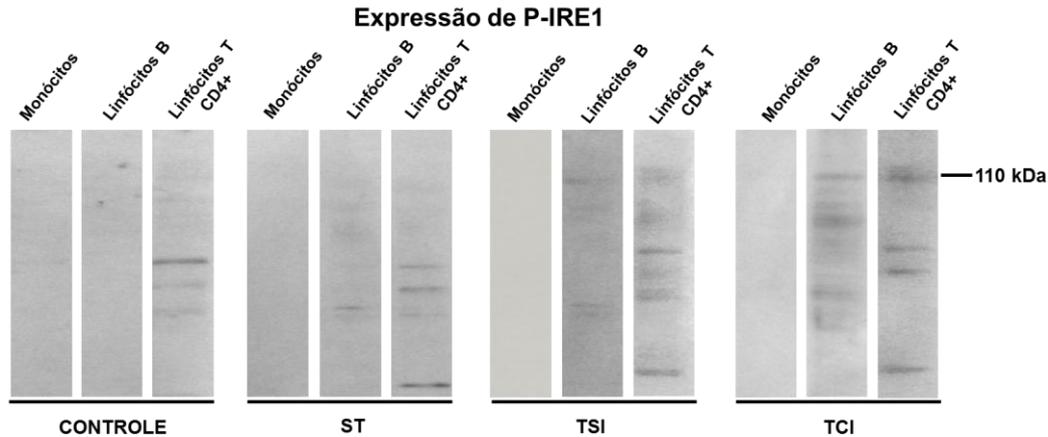


Figura 15: Avaliação da expressão de P-IRE1 em monócitos, linfócitos B e linfócitos T CD4+ provenientes de voluntários saudáveis e pacientes HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos. C: voluntários saudáveis; **ST:** pacientes HIV positivos não submetidos à terapia antirretroviral; **TSI:** pacientes HIV positivos submetidos à terapia antirretroviral sem inibidor de protease; **TCI:** pacientes HIV positivos submetidos à terapia antirretroviral com inibidor de protease. As bandas acima representadas correspondem a uma proteína de massa molar aproximada de 100 kDa, compatível com o peso esperado de P-IRE1. As imagens acima apresentadas são representativas para os 5 indivíduos de cada um dos grupos de estudo.

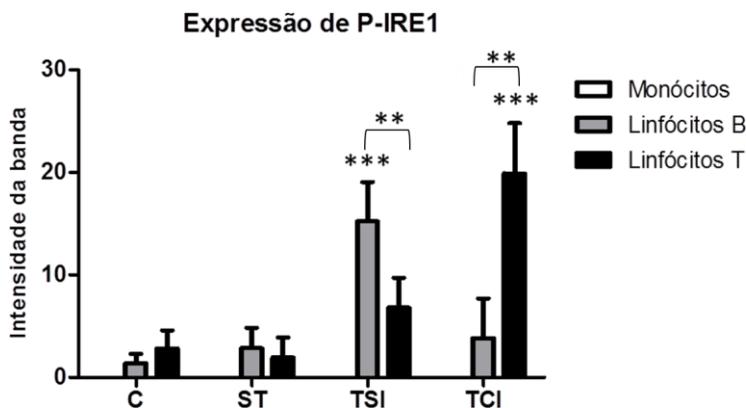


Figura 16: Análise comparativa da expressão de P-IRE1 em linfócitos B, linfócitos T CD4+ e monócitos provenientes de voluntários saudáveis e pacientes HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos. Controle: voluntários doadores de plaquetas; Sem tratamento: pacientes HIV positivos sem tratamento antirretroviral; Tratamento com inibidor: pacientes HIV positivos sob tratamento antirretroviral sem inibidor de protease; Tratamento com inibidor: pacientes HIV positivos sob tratamento antirretroviral com inibidor de protease. Duplo asteriscos representam $p < 0,01$ e triplo asteriscos representam $p < 0,001$.

6.7. Avaliação da expressão de ATF6 em linfócitos B, linfócitos T CD4+ e monócitos

A análise da expressão de ATF6 permitiu identificar esta proteína sob duas diferentes formas: sua forma inativada de 90 kDa e sua forma ativada e clivada de aproximadamente 50 kDa (Figura 17). Em indivíduos HIV negativos esta proteína foi encontrada essencialmente em sua forma inativada (Figura 18). Somente em um indivíduo controle identificou-se uma banda de 50 kDa correspondente a sua forma clivada em linfócitos B (Figura 19). Já os indivíduos HIV positivos apresentaram um forte aumento da presença de ATF6 em sua forma

clivada (Figuras 17 e 19). Este padrão não se mostrou relacionado à presença ou tipo de terapia antirretroviral e esteve presente nas três subpopulações celulares avaliadas.

ATF6 em sua forma inativada de 90 kDa teve expressão significativamente maior ($p < 0,05$) em linfócitos T CD4+ provenientes de indivíduos sadios em comparação à mesma subpopulação celular proveniente de pacientes HIV positivos (Figura 19). A expressão em indivíduos controle foi 9,5 vezes maior do que em pacientes não-tratados, 6,8 vezes maior do que em pacientes sob terapia antirretroviral sem inibidor de protease e 3,4 vezes maior do que em pacientes sob terapia antirretroviral com inibidor de protease. A presença de ATF6 em sua forma clivada não foi detectada em monócitos e linfócitos T CD4+ de indivíduos sadios, ocorrendo somente em linfócitos B provenientes de um voluntário (Figura 19). Em pacientes HIV positivos, as três subpopulações celulares expressaram ATF6 em sua forma clivada, não havendo diferenças significativas relacionadas aos esquemas terapêuticos aos quais estavam sendo submetidos. Quanto aos linfócitos B, a expressão de ATF6 clivado foi significativamente maior em pacientes HIV positivos em relação a indivíduos sadios ($p < 0,01$). Em pacientes não-tratados a expressão foi 12 vezes maior do que em indivíduos sadios; em pacientes tratados sem inibidor de protease a expressão foi 9,3 vezes maior e em indivíduos sob tratamento com inibidor de protease 10 vezes maior do que em indivíduos controle. Estes resultados sugerem que a clivagem de ATF6, relacionada à ativação da via UPR, está vinculada à infecção pelo HIV, já que não houve diferenças significativas da expressão dessa molécula comparando-se células de pacientes HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos.

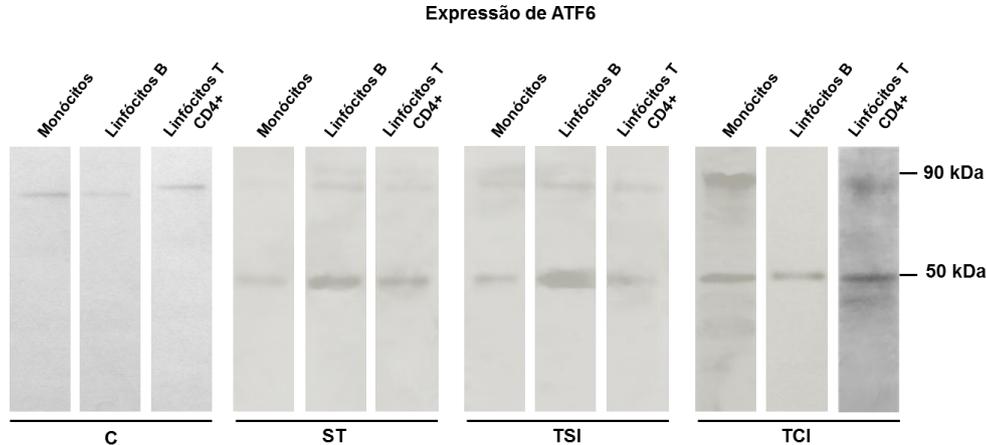


Figura 17: Avaliação da expressão da chaperona ATF6 em monócitos, linfócitos B e linfócitos T CD4+ provenientes de voluntários saudáveis e pacientes HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos. C: voluntários saudáveis; ST: pacientes HIV positivos não submetidos à terapia antirretroviral; TSI: pacientes HIV positivos submetidos a terapia antirretroviral sem inibidor de protease; TCI: pacientes HIV positivos submetidos a terapia antirretroviral com inibidor de protease. As bandas de 90 kDa correspondem à proteína ATF6 em sua forma não ativa enquanto as bandas de 50 kDa representam a proteína ATF6 em sua forma ativa pós-clivagem. As imagens acima apresentadas são representativas para os 5 indivíduos de cada um dos grupos de estudo.

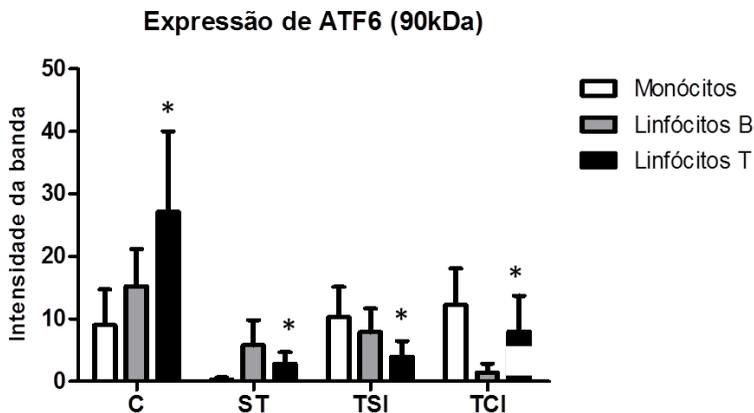


Figura 18: Análise comparativa da expressão de ATF6 em sua forma não clivada (90kDa) em linfócitos B, linfócitos T CD4+ e monócitos provenientes de voluntários sadios e pacientes HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos. Controle: voluntários doadores de plaquetas; Sem tratamento: pacientes HIV positivos sem tratamento antirretroviral; Tratamento com inibidor: pacientes HIV positivos sob tratamento antirretroviral sem inibidor de protease; Tratamento com inibidor: pacientes HIV positivos sob tratamento antirretroviral com inibidor de protease. Asteriscos representam $p < 0,05$.

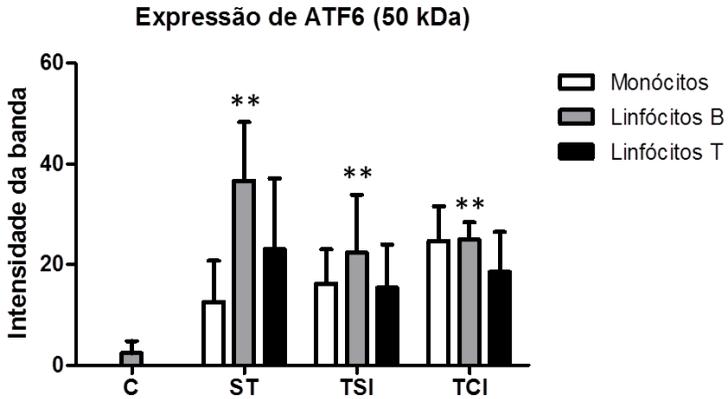


Figura 19: Análise comparativa da expressão de ATF6 em sua forma clivada (50kDa) em linfócitos B, linfócitos T CD4+ e monócitos provenientes de voluntários sadios e pacientes HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos. Controle: voluntários doadores de plaquetas; Sem tratamento: pacientes HIV positivos sem tratamento antirretroviral; Tratamento com inibidor: pacientes HIV positivos sob tratamento antirretroviral sem inibidor de protease; Tratamento com inibidor: pacientes HIV positivos sob tratamento antirretroviral com inibidor de protease. Duplo-asteriscos representam $p < 0,01$.

7. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a expressão de proteínas relacionadas à via UPR em indivíduos HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos: não-tratados, sob tratamento antirretroviral sem inibidor de protease e sob tratamento antirretroviral com inibidor de protease. A formação destes três grupos se deu a fim de estabelecer a causa da expressão ou inibição de mecanismos de resposta ao estresse relacionados à via UPR: a infecção pelo vírus HIV, carga viral, efeitos do tratamento antirretroviral ou ainda o tipo de terapia ao qual o indivíduo estava sendo submetido.

Os inibidores de protease utilizados na terapia anti-HIV são fármacos que induzem estresse no retículo endoplasmático e conseqüentemente ativam a via UPR. Estes fármacos podem levar à ativação da via UPR por inibirem a atividade dos proteassomos, aumentarem os níveis de colesterol livre, promoverem a depleção dos estoques de cálcio no retículo endoplasmático ou ainda desregularem o metabolismo da glicose, levando a uma diminuição da sua disponibilidade para as células (Oyadomari & Mori, 2004; Parker et al., 2005). Os efeitos de diversos inibidores de protease sobre o metabolismo de macrófagos e hepatócitos foram testados individualmente e, apesar de influenciarem mecanismos diferentes, mostraram-se eficazes tanto na ativação da via UPR nestas células como na indução da apoptose (Zhou et al., 2005; Zhou et al., 2006; Chen et al., 2009). Foram também constatados aumentos na expressão de proteínas como CHOP, XBP-1 e ATF4 em macrófagos e hepatócitos cultivados em meio contendo inibidor de protease, além de um incremento na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α , ambas evidências da ativação da via UPR (Zhou et al., 2005; Zhou et al., 2006; Chen et al., 2009).

Diante destas informações, a avaliação da ativação da via UPR em células de indivíduos que não estivessem sobre a influência de inibidores de protease mostrou-se importante a fim de detectar uma possível relação entre a via UPR e a infecção pelo HIV. A comparação entre o perfil de expressão de proteínas de células provenientes de indivíduos saudáveis, HIV positivos não-tratados ou sob tratamento, abriu a possibilidade de avaliar não somente diferenças relacionadas à ativação

farmacológica da via UPR, como também aquelas relacionadas a dados clínicos como carga viral e razão entre linfócitos T CD4+ e T CD8+.

A análise dos dados clínicos dos pacientes permitiu observar dois perfis diferentes: pacientes HIV positivos sob tratamento antirretroviral apresentaram cargas virais indetectáveis acompanhadas de maior contagem de linfócitos T CD4+; indivíduos HIV positivos virgens de tratamento apresentaram cargas virais detectáveis acompanhadas de contagens de linfócitos T CD4+ menores do que os indivíduos tratados.

A purificação das subpopulações celulares utilizadas neste estudo foi bem sucedida, conforme resultados obtidos a partir da análise fenotípica por citometria de fluxo, com alta proporção das células de interesse nas amostras obtidas (Figura 3). Dessa forma, os dados provenientes dos lisados proteicos dessas subpopulações celulares podem ser vinculados ao tipo celular em questão - linfócitos B, linfócitos T CD4+ e monócitos – permitindo que fosse feita uma análise comparativa entre os seus perfis fenotípicos de expressão proteica de moléculas relacionadas à via UPR. Outro ponto a ser levantado refere-se aos diferentes dados clínicos que pacientes HIV positivos apresentaram. Indivíduos soropositivos sob tratamento antirretroviral não apresentaram cargas virais detectáveis no plasma, ao contrário de indivíduos virgens de tratamento. Além disso, pacientes tratados mostraram possuir uma média de linfócitos T CD4+ maior do que a de pacientes sob tratamento (Figura 4), assim como uma maior razão CD4/CD8 (Figura 5). Estes dados estão de acordo com o encontrado em pesquisas clínicas e epidemiológicas e corroboram a justificativa utilizada para início do tratamento antirretroviral: diminuir a carga viral e aumentar o número de linfócitos T CD4+ a fim de postergar o surgimento do estágio sintomático da síndrome da imunodeficiência adquirida, ou AIDS. Isso se dá porque as drogas utilizadas no tratamento antirretroviral são capazes de inibir diferentes estágios do ciclo do HIV, desde sua entrada até sua maturação, sendo indivíduos HIV positivos tratados detentores de taxas de replicação viral muito menores do que as apresentadas por indivíduos virgens de tratamento (Mocroft & Lundgren, 2004; Simon, Ho, Karim, 2006).

A análise dos dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes permitiu apontar possíveis causas para diferenças na expressão de proteínas relacionadas à via UPR. Um dos pontos de convergência da ativação desta via é um aumento da expressão da chaperona BiP, que tem como função promover o redobramento de proteínas desenoveladas presentes no lúmen do retículo endoplasmático (Kaufman, 2002). A

análise da expressão de BiP, considerando os quatro grupos de indivíduos e as três subpopulações celulares analisadas, indicou um aumento da sua expressão em pacientes HIV positivos em relação aos indivíduos saudáveis, principalmente no que refere-se aos linfócitos B (Figura 10). O aumento da expressão de BiP é um indicativo de estresse no retículo endoplasmático, acúmulo de proteínas e necessidade de um incremento da capacidade de dobramento das mesmas dentro desta organela (Walter & Ron, 2011). Trata-se, portanto, de uma manifestação da ativação da via UPR associada à infecção por HIV, assim como já relatado em infecções causadas por vírus da família *Flaviviridae* como DENV-1 (Wati et al., 2009; Peña & Harris, 2011), WNV (Ambrose & Mackenzie, 2011) e HCV (Asselah et al., 2010) e outros vírus como CMV (Buchkovich et al., 2010) e EV71 (Jheng et al., 2010). O importante aumento da expressão de BiP em linfócitos B pode estar associado à função desta célula como secretora profissional de anticorpos. BiP é a chaperona responsável por ligar-se a moléculas de anticorpos nascentes em linfócitos B, escondendo seus resíduos hidrofóbicos ainda expostos antes do seu completo e correto dobramento (Flynn et al., 1991; Costa, Rosa & Camargo, 2011). Paralelamente, estudos relatam que pacientes HIV positivos possuem pronunciada hipergamaglobulinemia, apesar de possuírem produção ineficiente de anticorpos antígeno-específicos (Nagase et al., 2002). Essa aparente discrepância se dá pelo aumento da expressão de CD70 e ausência da molécula CD154 em linfócitos T CD4+ infectados, levando a uma diferenciação contínua de linfócitos B em plasmócitos e a uma deficiência na produção de linfócitos B de memória, o que contribui para uma redução do número dessas células no sangue periférico apesar do aumento dos níveis de IgG circulantes que, na sua maioria, não são específicos para qualquer antígeno (Nagase et al., 2002). Essa produção exagerada de anticorpos não funcionais em pacientes HIV positivos apresenta-se como provável causa do aumento da expressão de BiP em linfócitos B, já que esta chaperona está intimamente relacionada a cadeias de imunoglobulinas nascentes.

Além do incremento na expressão de BiP, que pode ser causado pela ativação de diferentes elementos da via UPR (Walter & Ron, 2011), foram analisadas, quanto à sua expressão, proteínas relacionadas a cada um dos braços da via UPR: PERK, IRE1 e ATF6. A fim de elucidar se o braço PERK da via UPR estava sendo ativado nas células analisadas neste estudo, a expressão de eIF2 α foi investigada, uma vez que este componente é diretamente afetado diante da ativação de PERK (Walter

& Ron, 2011). O fator eIF2 α foi detectado em células de pacientes HIV positivos sob tratamento antirretroviral com ou sem inibidor de protease. Pacientes HIV positivos virgens de tratamento apresentaram o mesmo perfil de expressão de indivíduos saudáveis. Na sua forma não fosforilada, eIF2 α foi detectado apenas em monócitos (Figuras 11 e 12). Na sua forma fosforilada, esta proteína foi encontrada em linfócitos B e linfócitos T (Figura 13 e 14). A fosforilação de eIF2 α está associada à sua inativação e consequente inibição da tradução proteica a fim de reduzir o montante de proteínas desnoveladas no lúmen do retículo endoplasmático (Harding, Zhang, Ron, 1999). Dessa forma, pode-se dizer que evidências da fosforilação de eIF2 α e ativação da via UPR estão presentes somente em linfócitos T CD4+ e linfócitos B de indivíduos tratados, não sendo detectada esta proteína em sua forma ativa nessas células. Em monócitos, no entanto, P-eIF2 α não foi detectado, sugerindo que nestas células não houve ativação deste braço da via UPR. Existem, portanto, dois fatores a serem destacados: a diferença de expressão entre as diferentes subpopulações celulares e a diferença de expressão entre indivíduos HIV positivos submetidos ou não a terapia antirretroviral.

A ausência de P-eIF2 α pode estar vinculada a diferenças no ciclo de replicação do HIV em monócitos e macrófagos quando comparados a linfócitos T CD4+. Células da linhagem monocítica podem ser infectadas predominantemente por cepas virais com tropismo para macrófagos e mais raramente por cepas virais com tropismo para a linhagem de células T (Verani, Gras, Pancino, 2004). Monócitos e macrófagos são células bastante resistentes aos efeitos citopáticos do HIV, permanecendo como reservatórios deste vírus em diversos tecidos (Bergamaschi & Pancino, 2010). Mesmo em pacientes sob tratamento antirretroviral com cargas virais não detectáveis é possível resgatar partículas virais infecciosas no interior dessas células (Zhu et al., 2002). Porém, mesmo vistos como reservatórios, apenas uma pequena proporção dos monócitos circulantes apresenta o genoma do HIV em seu interior (McElrath, Steinman, Cohn, 1991). Existem diversos mecanismos refratários à infecção por HIV em linhagens monocíticas mesmo após sua entrada na célula, como a ausência de cofatores favoráveis a transcrição reversa e baixos níveis de precursores de nucleotídeos, dificultando a replicação viral (Triques & Stevenson, 2004). Levanta-se ainda a possibilidade de que os menores níveis de replicação do HIV em monócitos estejam associados à expressão de

proteínas com atividade antirretroviral da família APOBEC3, dando-se destaque à proteína APOBEC3G (Peng et al., 2007). Dessa forma, a ausência de eIF2 α em sua forma fosforilada em monócitos pode estar vinculada a uma menor velocidade e frequência de replicação viral nestas células levando a um cenário desfavorável à ativação da via UPR.

Os linfócitos T CD4⁺ são as células alvo preferenciais do HIV. A destruição gradual dessa subpopulação celular é a principal característica da infecção pelo HIV, podendo levar à AIDS (Douek, Picker, Roup, 2003). Dentre os linfócitos T CD4⁺, até 10% constituem-se como linfócitos T CD4 + HIV específicos (Douek et al., 2002). Esta alta proporção de células específicas contra HIV provavelmente se dá como resultado da ativação e proliferação de células *naïve* específicas diante de antígenos virais (Eckstein, 2001). Os linfócitos T CD4⁺ em estágio de maturação são altamente suscetíveis à infecção por HIV e ainda considerados o principal foco de replicação e propagação do vírus em estágios de infecção crônica no organismo (Grossman, Feinberg, Paul, 1998). Dessa forma, linfócitos T CD4⁺ em indivíduos HIV positivos são células sob constante estresse metabólico variando entre extremos: da apoptose à rápida proliferação celular. A presença de eIF2 α fosforilado nestas células, indicativo da ativação da via UPR, provavelmente surge como resultado deste estresse, que inclui ainda a grande demanda de dobramento de proteínas para produção de novas partículas virais.

A fosforilação de eIF2 α relaciona-se, portanto, a uma estratégia de inibição da tradução proteica em células infectadas, como já relatado para outros vírus como EBV (Lam, Sandberg, Sudgen, 2004), CMV (Isler, Skalet, Alwine, 2005), HCV (Asselah et al., 2010), DENV-1 (Peña & Harris, 2011) e EV71 (Jheng et al., 2010). Recentemente, foi relatada a presença de eIF2 α fosforilado em uma linhagem de macrófagos infectada *in vitro* pelo HIV (Cross, 2010). Paralelamente, outro estudo demonstrou um aumento da expressão de ATF4 em células de linhagem monocítica também infectadas *in vitro* (Caselli et al., 2011). ATF4 é uma proteína que tem sua tradução induzida justamente quando eIF2 α é fosforilado, levando a uma inibição da tradução de outras proteínas na célula (Harding et al., 2003). Ao contrário do previamente relatado na literatura, o presente trabalho não encontrou P-eIF2 α em monócitos circulantes, enquanto que em linfócitos T CD4⁺ esta proteína foi detectada. As diferenças de expressão de P-eIF2 α apresentadas neste trabalho aparentemente discordam de dados

anteriores, porém deve ser apontado um importante fator: as células utilizadas neste trabalho provêm de amostras de pacientes HIV positivos e foram diretamente utilizadas na produção de lisados proteicos. Considerando que monócitos circulantes são muito resistentes a infecção pelo HIV, é possível que essa discrepância se dê justamente pela menor frequência de células infectadas *in vivo* em comparação a experimentos dimensionados em condições *in vitro*. Quanto aos linfócitos T CD4⁺ expressarem P-eIF2 α , podemos considerar que este resultado corrobora evidências de estudos anteriores onde a inativação desta proteína apresenta-se como reflexo da ativação da via UPR.

A expressão de P-eIF2 α por linfócitos T CD4⁺ pode ser resultado da ativação e maturação de células *naive* em células efetoras (Scheu et al., 2006), processo que tem sua frequência aumentada diante de uma infecção sistêmica como a causada pelo HIV (Eckstein, 2001). Porém, a expressão de P-eIF2 α mostrou estar associada somente a indivíduos sob tratamento antirretroviral e com cargas virais não detectáveis no plasma. Sabe-se que a ausência de partículas virais livres não exclui a existência de partículas virais viáveis dentro de linfócitos T CD4⁺ mesmo em indivíduos sob terapia (Calcaterra et al., 2001). Ainda assim, a ausência de P-eIF2 α em pacientes HIV positivos virgens de tratamento levanta outra hipótese: este resultado pode ser consequência da ativação farmacológica do tratamento antirretroviral sobre a via UPR, já que se esperaria que, sendo esta ativação ocasionada pela infecção, estivesse também presente em indivíduos que não estivessem sob terapia antirretroviral. Essa ativação, portanto, não estaria relacionada somente aos inibidores de protease. A presença de P-eIF2 α em linfócitos B, também em indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral com ou sem inibidor de protease, sugere uma possível interação e comunicação entre linfócitos T CD4⁺ e linfócitos B através de mecanismos ainda não elucidados. Porém, já está estabelecida a necessidade de P-eIF2 α para maturação correta de linfócitos B e estando os mesmos sujeitos a um ambiente de forte ativação o aumento da expressão dessa proteína seria esperado, como aqui apresentado (Mielke et al., 2011).

A fim de avaliar a possível ativação do braço IRE1 da via UPR, foi analisada a presença desta proteína em sua forma fosforilada e ativa, P-IRE1, nas células utilizadas no presente estudo. P-IRE1 teve sua expressão detectada em linfócitos B e linfócitos T CD4⁺ de todos os

grupos estudados, havendo um significativo aumento da expressão desta proteína em indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral, semelhante ao que foi encontrado para P-eIF2 α (Figuras 15 e 16). IRE1 fosforilado indica a ativação desta proteína, que pode ser interpretada como um sinal de ativação da via UPR (Credle et al., 2005). A fosforilação de IRE1 em células infectadas por vírus, e consequentemente submetidas a estresse do retículo endoplasmático, já foi relatada para EBV (Lee & Sugden, 2008), CMV (Isler, Skalet, Alwine, 2005), HCV (Chan & Egan, 2009), DENV-1 (Peña & Harris, 2011) e WNV (Ambrose & Mackenzie, 2011). A fosforilação e ativação de IRE1 está ainda associada ao aumento da expressão e *splicing* de XBP-1 (Kaufman, 2002). Aumento da expressão de XBP-1 também foi relatado em células infectadas por vírus como EBV (Costa, Rosa, Camargo, 2011), CMV (Isler, Skalet, Alwine, 2005), DENV-1 (Peña & Harris, 2011) e WNV (Ambrose & Mackenzie, 2011). Neste estudo, P-IRE1 foi detectado em células provenientes de indivíduos saudáveis, indivíduos HIV positivos virgens de tratamento e indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral. Dessa forma, a expressão dessa proteína não esteve vinculada a infecção por HIV, mas mostrou-se relacionada ao tipo celular, já que em monócitos não foi possível detectar P-IRE1 em células de qualquer um dos grupos de estudo analisados. Porém, a expressão de P-IRE1 em indivíduos infectados e virgens de tratamento foi bastante semelhante à de indivíduos saudáveis, enquanto que indivíduos sob terapia antirretroviral mostraram aumento significativo da expressão desta proteína. Este aumento foi mais pronunciado em linfócitos B de indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral sem inibidor de protease e linfócitos T de indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral com inibidor de protease. A diferença de expressão de P-IRE1 entre as subpopulações celulares sugere efeitos farmacológicos distintos sobre os metabolismos destas duas células. A ausência de inibidor de protease em uma terapia leva a uma diminuição teórica do estresse causado à célula e consequentemente a uma menor probabilidade de ativação da via UPR pelas vias já conhecidas para este tipo de fármaco, como desregulação do metabolismo de lipídeos e glicose, inibição da atividade dos proteassomos ou depleção dos estoques de cálcio (Parker et al., 2005). A maior expressão de P-IRE1 em linfócitos T CD4+ de pacientes sob tratamento antirretroviral com inibidor de protease corrobora este argumento. Porém, para eIF2 α , não foram observadas diferenças de expressão vinculadas ao tipo de tratamento, com aumento da expressão

desta proteína em sua forma fosforilada em linfócitos B e T CD4+ de pacientes HIV positivos sob tratamento com ou sem inibidor de protease. Quanto a P-IRE1, sabe-se que existe um aumento da sua expressão vinculado à diferenciação de linfócitos B *naive* em plasmócitos secretores de anticorpos (Ma et al., 2010). Além disso, estudos relatam que a aderência à terapia antirretroviral por mais de dois anos é capaz de normalizar a produção de citocinas pró-inflamatórias e a ativação de linfócitos B, processo vinculado à fosforilação de IRE1 (Regidor et al., 2011). Dessa forma, a ativação de IRE1 em linfócitos B de pacientes sob tratamento antirretroviral sem inibidor de protease está provavelmente associada a efeitos farmacológicos exclusivos deste tipo de terapia que ainda não foram estudados quanto suas consequências sobre a ativação da via UPR.

De maneira mais ampla, o padrão de expressão de P-IRE1 levanta novamente a questão da influência do tratamento antirretroviral sobre a ativação de uma proteína associada à via UPR, como discutido anteriormente para P-eIF2 α . Além da influência farmacológica, indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral apresentam uma queda dos níveis de vírions infectantes circulantes no plasma (Tabela 01). Apesar da ausência de carga viral detectável no plasma não significar a inexistência de células infectadas pelo HIV, os índices de replicação do HIV são muito mais controlados em indivíduos tratados, levando até mesmo ao restabelecimento de níveis normais de linfócitos CD4+ nestes indivíduos (Mocroft & Lundgren, 2004). Dessa forma, resgatando o que já foi apontado para P-eIF2 α , indivíduos HIV positivos tratados apresentam um perfil fenotípico de expressão de moléculas diferente do apresentado por indivíduos HIV positivos virgens de tratamento. Essa diferença pode estar relacionada à ativação farmacológica da via UPR ou ainda ao padrão de carga viral apresentado por estes grupos. Pensando-se na primeira hipótese, deve-se destacar que o presente estudo indica a ativação de componentes da via UPR mesmo em pacientes sem influência de terapia com inibidor de protease, não sendo este fármaco o exclusivamente responsável por este mecanismo, como apontado em estudos anteriores envolvendo células cultivadas *in vitro* (Zhou et al., 2005; Zhou, Pandak, Hylemon, 2006; Norman et al., 2008; Zhou et al., 2006). Tendo como enfoque a segunda possibilidade, é possível que a queda nos níveis de replicação do HIV leve a um padrão diferente de ativação da via UPR entre pacientes HIV positivos tratados e não tratados.

O terceiro braço da via UPR que teve sua ativação analisada foi ATF6. ATF6 é uma proteína transmembrana presente na membrana do retículo endoplasmático e que constitui um dos braços da via UPR. Na sua forma inativa, ATF6 possui uma massa molar de 90 kDa. Quando ocorre estresse no retículo endoplasmático a primeira manifestação da ativação da via UPR é a clivagem de ATF6 em uma proteína de 50 kDa, capaz de agir como fator de transcrição e ativar a expressão de genes como o codificante para BiP (Haze et al., 1999). A ativação de ATF6 através de sua clivagem em uma forma citosólica livre foi descrita em células infectadas por vírus como EBV (Lee & Sugden, 2008), HCV (Asselah, et al., 2010), DENV (Peña & Harris, 2011), LCMV (Pasqual et al., 2010) e WNV (Ambrose & Mackenzie, 2011). No presente estudo, a proteína de 90 kDa foi detectada em todas as subpopulações celulares estudadas provenientes de indivíduos pertencentes aos quatro grupos de estudo: sadios, HIV positivos virgens de tratamento, HIV positivos sob tratamento antirretroviral sem inibidor de protease e HIV positivos sob tratamento antirretroviral com inibidor de protease (Figura 17). Porém, esta expressão foi mais significativa em indivíduos sadios, sendo esta diferença estatisticamente significativa quando comparados os linfócitos B deste grupo em relação aos oriundos de indivíduos HIV positivos (Figura 18). Na sua forma clivada de 50 kDa, houve uma inversão do padrão de expressão, com aumento da expressão em indivíduos HIV positivos (Figura 19). Indivíduos sadios apresentaram expressão de ATF6 em sua forma clivada somente em linfócitos B. A expressão de ATF6 clivado nesta subpopulação celular foi significativamente maior em indivíduos HIV positivos, independentemente do tipo de terapia aos quais estavam submetidos. Em monócitos e linfócitos T CD4+, a expressão de ATF6 em sua forma clivada foi identificada somente em pacientes HIV positivos. Dessa forma, o cenário que se forma sugere a ativação de ATF6 em células infectadas por HIV de maneira independente do esquema terapêutico. Trata-se de um padrão semelhante ao encontrado para BiP, em que o aumento da sua expressão também mostrou-se relacionado à infecção por HIV. A maior expressão de BiP em indivíduos HIV positivos pode estar, portanto, relacionada ao aumento da ativação e clivagem de ATF6, uma vez que como fator de transcrição esta proteína induz a expressão de BiP a fim de aumentar a capacidade de dobramento de proteínas no retículo endoplasmático (Yamamoto et al., 2007).

O panorama de ativação da via UPR no presente estudo apresenta-se da seguinte forma: BiP e ATF6 tiveram, respectivamente, expressão

aumentada e ativação relacionadas à células infectadas por HIV; eIF2 α e IRE1 tiveram fosforilação detectadas em linfócitos B e linfócitos T CD4+ provenientes de indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral (Figura 20). Nessa perspectiva, células de indivíduos HIV positivos virgens de tratamento apresentaram ativação de somente um braço da via UPR: ATF6. Entretanto, indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral apresentaram ativação dos três braços da via UPR: PERK, representado pela fosforilação de eIF2 α , ATF6 e IRE1. Os esquemas terapêuticos aos quais estes indivíduos estavam submetidos são bastante variados, incluindo a ausência ou presença de inibidores de protease, o que impede o estabelecimento de uma relação linear entre a ativação de componentes da UPR e uma ativação farmacológica. Todavia, os indivíduos sob tratamento antirretroviral apresentam uma diferença importante em relação aos indivíduos não tratados: a ausência de carga viral detectável nos seus plasmas. Dessa forma, os resultados sugerem que células de pacientes HIV positivos sem controle de replicação viral apresentam um perfil de ativação da via UPR diferenciado: ao invés da via UPR ser ativada nos seus três braços como em indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral, parece haver uma modulação dessa ativação quando as cargas virais apresentam-se em níveis plasmáticos detectáveis.

Assim, a via UPR não é completamente ativada quando partículas infecciosas encontram-se em processo de ativa replicação. O HIV parece assumir, em células provenientes de amostras clínicas de pacientes, uma função de inibição de dois braços da via UPR: PERK e IRE1. Este fato pode ser relevante para o sucesso da produção de novos vírions, já que a ativação do braço ATF6 leva a um aumento da expressão de BiP, gerando um incremento da capacidade de dobramento de proteínas – e consequentemente de capsídeos virais. Paralelamente a inibição dos braços PERK e IRE1 impede que a célula infectada entre em um estado de inibição da tradução e degradação de proteínas via proteassomo através da via ERAD. Trata-se de um comportamento semelhante ao apresentado pelos vírus LCMV, que também ativa somente o braço ATF6 (Pasqual et al., 2010) e HSV-1, que inibe a ativação de PERK e IRE-1 nas células infectadas (Mulvey, Arias, Mohr, 2007).

Esta hipótese corrobora os dados encontrados em um estudo anterior, em que macrófagos tratados *in vitro* com inibidor de protease demonstraram uma robusta ativação da via UPR, com aumento da expressão de BiP e P- eIF2 α , levando a uma significativa queda dos

níveis de replicação viral (Cross et al., 2010). Deve-se ressaltar novamente que o presente estudo verificou o mesmo comportamento em células *ex vivo* sob tratamento antirretroviral sem inibidor de protease. Todavia, Cross e colaboradores, verificaram um aumento da expressão de P-eIF2 α em células de linhagem monocítica infectadas por HIV *in vitro* e não submetidas a tratamento antirretroviral em momentos de elevada carga viral, como nos estágios precoces da infecção. Este resultado contraria o padrão de expressão encontrado em células oriundas de pacientes HIV positivos virgens de tratamento no presente estudo, onde foi detectada expressão de eIF2 α não-fosforilado nos monócitos desses indivíduos. A discrepância de resultados pode ser resultado de diferenças do número de partículas virais entre as amostras utilizadas ou ainda consequência da diferença de condições de experimentos que utilizam amostras provenientes de pacientes ou células cultivadas *in vitro*. Os resultados aqui apresentados também contrariam os dados obtidos por Caselli e colaboradores, que identificaram um aumento da expressão de ATF4 em linhagens de macrófagos infectadas *in vitro* por HIV (Caselli et al., 2011). O aumento da expressão de ATF4 está relacionado à presença de P-eIF2 α (Rutkowski & Kaufman, 2004) e esta proteína só foi encontrada em células de indivíduos com baixa carga viral submetidos a tratamento antirretroviral neste estudo.

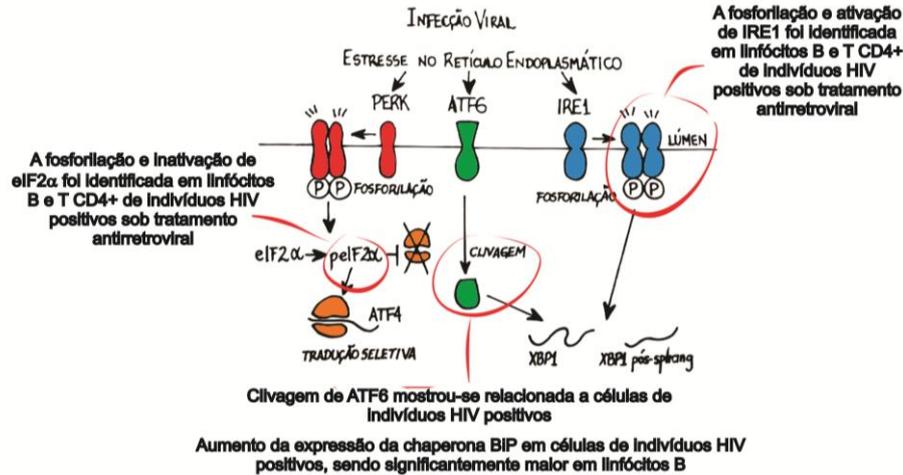


Figura 20: Perfil de ativação da via UPR em células provenientes de indivíduos HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos. Foi identificada a fosforilação de eIF2 α e IRE1 em linfócitos B e linfócitos T CD4+ de indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral e a clivagem e ativação de ATF6 em células provenientes de indivíduos HIV positivos, quando comparadas a células controle de indivíduos saudáveis.

A ausência de fosforilação de eIF2 α em células de indivíduos HIV positivos virgens de tratamento e com elevada carga viral pode estar relacionada à ação da proteína Tat do HIV. A ação de Tat como antagonista da fosforilação e inibição de eIF2 α já foi relatada em células infectadas por HIV (McMillan et al., 1995), evitando assim interrupções de processos traducionais. Além disso, o padrão de expressão comum apresentado por todas as células HIV positivas independentemente do esquema terapêutico aos quais os pacientes estavam sendo submetidos, com aumento da expressão de BiP e clivagem de ATF6, mostra-se semelhante ao encontrado em células do sistema nervoso central de indivíduos HIV positivos obtidas através de necropsias (Lindl et al., 2007). O tráfego do HIV até o sistema nervoso central se dá através do deslocamento de monócitos infectados que se diferenciam em macrófagos (Gonzales-Scarano & Martin-Garcia, 2005). Estes macrófagos secretam quimiocinas e citocinas que levam as células vizinhas a produzir uma série de neurotoxinas e fatores pró-inflamatórios que podem ser responsáveis pelos danos neurológicos observados em indivíduos HIV positivos. Nessas condições, na tentativa de restabelecer a homeostase celular, as células presentes no tecido afetado ativam a via UPR, o que foi demonstrado através do aumento da expressão de BiP e clivagem de ATF6, assim como relatado no presente estudo (Kaufman, 2002; Lindl et al., 2007). A influência de células infectadas sobre as células vizinhas justificaria ainda a expressão de proteínas relacionadas à ativação da via UPR em linfócitos B, células não infectadas por HIV.

A diferença no padrão de expressão entre células de pacientes HIV positivos tratados e não tratados abre uma nova perspectiva sobre a influência da terapia antirretroviral na busca pela homeostase celular. A ação farmacológica dos medicamentos utilizados na terapia antirretroviral permitiu observar um padrão de ativação completo da via UPR, enquanto pacientes virgens de tratamento e com cargas virais mais altas apresentaram um perfil de ativação apenas parcial. A ativação dos três braços da via UPR amplia as chances de restabelecimento da homeostase em células infectadas por HIV e diminui a possibilidade de altas taxas de replicação viral nas mesmas, ao contrário do encontrado em células de indivíduos não tratados, onde a ativação exclusiva do

braço ATF6 não leva a inibição da tradução, aumenta a capacidade de dobramento de proteínas e as condições celulares necessárias para que o HIV monte mais cópias de si mesmo.

8. SUMÁRIO DOS RESULTADOS

- A purificação das subpopulações celulares de linfócitos B, linfócitos T CD4+ e monócitos foi bem sucedida, havendo alta proporção das células de interesse nas amostras obtidas a partir de sangue periférico após separação por gradiente de densidade e incubação com os respectivos *kits* de separação.
- Os dados clínicos e epidemiológicos obtidos a partir dos prontuários dos pacientes permitiram criar um perfil relacionado ao esquema terapêutico aos quais estavam sendo submetidos: pacientes HIV positivos virgens de tratamento apresentaram cargas virais detectáveis e baixa razão entre linfócitos T CD4+ e T CD8+; pacientes sob tratamento antirretroviral não apresentaram carga viral detectável e demonstraram possuir uma relação entre linfócitos T CD4+ e T CD8+ maior do que indivíduos não tratados.
- Os índices de expressão de BiP em linfócitos B de pacientes HIV positivos foram significativamente maiores do que os encontrados nesta mesma subpopulação celular proveniente de indivíduos HIV negativos.
- A expressão de eIF2 α , mostrou-se relacionada ao tipo celular, infecção e tipo de tratamento. Na sua forma não-fosforilada foi detectada apenas em monócitos de indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral. Entretanto, na sua forma inativa e fosforilada foi identificada em linfócitos B e linfócitos T CD4+ de pacientes HIV positivos sob tratamento antirretroviral.
- P-IRE1 foi detectada em linfócitos B e linfócitos T CD4+ em células de voluntários saudáveis e pacientes HIV positivos. Sua expressão foi significativamente maior em linfócitos B de indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral sem inibidor de protease e linfócitos T CD4+ de indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral com inibidor de protease.

- ATF6 em sua forma não clivada esteve presente em todos as subpopulações celulares provenientes dos quatro grupos de estudo, porém sua expressão foi significativamente maior em linfócitos B de indivíduos sadios quando comparada à mesma subpopulação celular em indivíduos HIV positivos. Quando clivada, mostrou-se relacionada à infecção por HIV de forma independente do esquema terapêutico utilizado.
- Células de pacientes HIV positivos virgens de tratamento apresentaram ativação de apenas um braço da via UPR, identificada pela clivagem de ATF6.
- Pacientes HIV positivos sob tratamento antirretroviral apresentaram ativação dos três braços da via UPR: PERK, ATF6 e IRE1.

9. CONCLUSÕES

O presente estudo confirma a hipótese de influência da infecção por HIV sobre a ativação da via UPR. Células de pacientes HIV positivos apresentaram um perfil de expressão de proteínas relacionadas à via UPR diferente do apresentado por indivíduos saudáveis. Em relação à influência do tratamento antirretroviral, células provenientes de pacientes HIV positivos virgens de tratamento possuem um padrão de ativação da via UPR diferente do apresentado por células provenientes de indivíduos HIV positivos sob tratamento. O fenótipo de expressão de proteínas vinculadas à via UPR não mostrou-se relacionado ao tipo de fármaco utilizado na terapia e, dessa forma, não foram constatadas evidências da ação exclusiva de inibidores de protease como causa de estresse no retículo endoplasmático neste estudo. Células de indivíduos não tratados e com cargas virais detectáveis no plasma foram capazes de ativar somente o braço ATF6 da via UPR, enquanto células de indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral e com cargas virais indetectáveis mostraram resultados que indicam a ativação dos três braços desta via: PERK, ATF6 e IRE1. Esta diferença de padrão de expressão sugere comportamentos distintos de replicação viral em células de indivíduos HIV positivos tratados e não tratados. Células de indivíduos HIV positivos virgens de tratamento, através da clivagem de ATF6 em sua forma ativa, são capazes de aumentar seus estoques de BiP e consequentemente a capacidade de dobramento de novas proteínas – incluindo novas partículas virais. Indivíduos sob tratamento antirretroviral mostram um padrão de ativação da via UPR coerente com cargas virais mais baixas, já que a ativação dos três braços dessa via leva não só a um aumento da capacidade de dobramento de proteínas, mas também a um estado de inibição da tradução - indicado pela fosforilação de eIF2 α - que dificultaria a produção de novos capsídeos virais.

10. PERSPECTIVAS

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, surgem alguns pontos a serem esclarecidos e aprofundados e que constituem os objetivos dos próximos passos dessa pesquisa. Primeiramente, é preciso aumentar o número de indivíduos analisados para cada grupo de estudo, a fim de se obter resultados estatisticamente mais robustos e confiáveis em relação a diferenças no padrão de expressão de proteínas entre os mesmos. Para tal, o recrutamento de novos pacientes já está sendo realizado junto às instituições parceiras anteriormente citadas. O RNAm purificado proveniente de linfócitos B, linfócitos T CD4+ e monócitos de cada um dos indivíduos deste estudo será utilizado para verificar diferenças na expressão de genes relacionados à via UPR e comparar os resultados aos obtidos em relação ao perfil fenotípico de expressão de proteínas. Também planeja-se um experimento sob condições controladas *in vitro* a fim de esclarecer o real papel dos fármacos utilizados na terapia antirretroviral sobre a ativação da via UPR nas diferentes subpopulações celulares. Este experimento trará novos controles: células HIV negativas tratadas com antirretrovirais. Dessa forma, será possível estabelecer se a ativação da via UPR observada em indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral está associada a diferenças na carga viral ou a ação farmacológica desses compostos.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, D. E.; WARD, S. L.; MIZUSHIMA, N.; LEVINE, B.; LEIB, D. A. Analysis of the role of autophagy in replication of herpes simplex virus in cell culture. **J Virol**, v. 81, p. 12128–12134, 2007.

AMBROSE, R. L.; MACKENZIE, J. M. West Nile Virus differentially modulates the unfolded protein response to facilitate replication and immune invasion. **J Virol**, v. 85, p. 2723-2732, 2010.

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. **J Pathol**, v. 221, p. 264-274, 2010.

BERGARMASCHI, A.; PANCINO, G. Host hindrance to HIV-1 replication in monocytes and macrophages. **Retrovirology**, v. 7, p. 1-17, 2010.

BERNALES, S.; PAPA, F.R.; WALTER, P. Intracellular Signaling by the unfolded protein response. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 358, p. 321-333, 2006.

BOYCE, M.; BRYANT, K. F.; JOUSSE, C.; LONG, K.; HARDING, H. P.; SCHEUNER, D.; KAUFMAN, R. J.; MA, D.; COEN, D. M.; RON, D.; YUAN, J. A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. **Science**, v. 307, p. 935-939, 2005.

BUCHKOVICH, N. J.; MAGUIRE, T. G.; YU, Y.; PATON, A. W.; PATON, J. C.; ALWINE, J. C. Human cytomegalovirus specifically controls the levels of the endoplasmic reticulum chaperone BiP/GRP78, which is required for virion assembly. **J Virol**, v. 82, p. 31–39, 2008.

CALCATERRA, S.; CAPPIELLO, G.; DI CARO, A.; GARBUGLIA, A. R.; BENEDETTO, A. Comparative analysis of total and integrated HIV-1 DNA in peripheral CD4 lymphocytes and monocytes after long treatment with HAART. **J Infect**, v. 43, p. 239-245, 2001.

CASELLI, E.; BENEDETTI, S.; GENTILI, V.; GRIGOLATO, J.; DI LUCA, D. Activating transcription factor 4 (ATF4) promotes HIV-1 activation. **AIDS Res Hum Retroviruses**, Epub ahead of print, 2011.

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

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. **Biochem Pharmacol**, v. 78, p. 70-77, 2009.

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

CREDLE, J. J.; FINER-MOORE, J.S.; PAPA, F.R.; STROUD, R. M.; WALTER, P. Inaugural Article: on the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. **PNAS**, v. 102, p. 18773-18784, 2005.

CROSS, S.; KOLSON, L.; RUSBARZKY, J.; VANCE, P.; COOK, D.; AKAY, C.; JORDAN-SCIUTTO, C.; KOLSON, D. Induction of the unfolded protein response attenuates HIV replication in macrophages. In: **Anais da 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections**, CROI, San Francisco, CA, 2010.

DALGLEISH, A. G.; BEVERLEY, P. C.; CLAPHAM, P. R.; CRAWFORD, D. H.; GRAVES, M. F.; WEISS, R. A. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. **Nature**, v. 312, p. 763-767, 1984.

DOUEK, D. C.; BRENCHLEY, J. M.; BETTS, M. R.; AMBROZAK, D. R.; HILL, B. J.; OKAMOTO, Y.; CASAZZA, J. P.; KURUPPU, J.; KUNSTMAN, K.; WOLINSKY, S.; GROSSMAN, Z.; DYBUL, M.; OXENIUS, A.; PRICE, D. A.; CONNORS, M.; KOUP, R. A. HIV preferentially infects HIV-specific CD4⁺ T cells. **Nature**, v. 417, p. 95-98, 2002.

DOUEK, D. C.; PICKER, L. J.; ROUP, R. A. T cell dynamics in HIV-1 infection. **Annu Rev Immunol**, v. 21, p. 265-304, 2003.

ECKSTEIN, D. A.; PENN, M. L.; KORIN, Y.D.; SCRIPTURE-ADAMS, D. D.; ZACK J. A.; KREISBERG, J. F.; ROEDERER, M.; SHERMAN, M. P.; CHIN, P. S.; GOLDSMITH, M. A. HIV-1 actively replicates in naive CD4(+) T cells residing within human lymphoid tissues. **Immunity**, v. 15, p. 671-682, 2001.

FLYNN, G. C.; POHL, J.; FLOCCO, M. T.; ROTHMAN, J. E. Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. **Nature**, v. 353, p. 726-730, 1991.

GASS, J. N.; GIFFORD, N. M.; BREWER, J. W. Activation of an unfolded protein response during differentiation of antibody-secreting B Cells. **J Biol Chem**, v. 277, p. 49047-49054, 2002.

GONZALES-SCARANO, F.; MARTÍN-GARCÍA, J. The neuropathogenesis of AIDS. **Nat Rev Immunol**, v. 5, p. 69-81, 2005.

GROSSMAN, Z.; FEINBERG, M. B.; PAUL, W. E. Multiple modes of cellular activation and virus transmission in HIV infection: a role for chronically and latently infected cells in sustaining viral replication. **PNAS**, v. 95, p. 6314-6319, 1998.

HARDING, H.P.; ZHANG, Y.; RON, D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. **Nature**, v.397, p. 271-274, 1999.

HARDING, H. P.; ZHANG, Y.; BERTOLOTTI, A.; ZENG, H.; RON, D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. **Mol Cell**, v. 5, p. 897-904, 2000.

HARDING, H. P.; ZHANG, Y.; ZENG, H.; NOVOA, I.; LU, P. D.; CALFON, M.; SADRI, N.; YUN, C.; POPKO, B.; PAULES, R.; STOJDL, D. F.; BELL, J. C.; HETTMANN, T.; LEIDEN, J. M.; RON D. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. **Mol Cell**, v. 11, p. 619-633, 2003.

HAZE, K.; YOSHIDA, H.; YANAGI, H.; YURA, T.; AND MORI, K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. **Mol Biol Cell**, v. 10, p. 3787-3799, 1999.

HONG, M.; LUO, S.; BAUMEISTER, P.; HUANG, J. M.; GOGIA, R. K.; LI, M.; LEE, A.S. Underglycosylation of ATF6 as a novel sensing mechanism for activation of the unfolded protein response. **J Biol Chem**, v. 279, p. 11354-11363, 2004.

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

JHENG, J.; LAU, K. S.; TANG, W.; WU, M.; HORNG, J. Endoplasmic Reticulum stress is induced and modulated by enterovirus 71. **Cell Microbiol**, v. 12, p. 796-813, 2010.

KAUFMAN, R.J. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. **J Clin Invest**, v. 110, p. 1389-1398, 2002.

KEPP, O.; SENOVILLA, L.; GALLUZZI, L.; PANARETAKIS, T.; TESNIERE, A.; SCHLEMMER, F.; MADEO, F.; ZITVOGEL, L.;

KROEMER, G. Viral subversion of immunogenic cell death. **Cell Cycle**, v. 8, p. 860-869, 2009.

LAM, N.; SANDBERG, M. L.; SUGDEN, B. High physiological levels of LMP1 result in phosphorylation of eIF2 α in Epstein-Barr virus-infected cells. **J Virol**, v. 78, p. 1657–1664, 2004.

LEE, D. Y.; SUGDEN, B. The latent membrane protein 1 oncogene modifies B-cell physiology by regulating autophagy. **Oncogene**, v. 27, p. 2833–2842, 2008.

LEE, D. Y.; LEE, J.; SUGDEN, B. The unfolded protein response and autophagy: herpesvirus rule! **J Virol**, v. 83, p. 1168-1172, 2009.

LINDL, K. A.; AKAY, C.; WANG, Y.; WHITE, M. G.; JORDAN-SCIUTTO, K. L. Expression of the endoplasmic reticulum stress response marker, BiP, in the central nervous system of HIV-positive individuals. **Neuropath Appl Neuro**, v. 33, p. 658–669, 2007.

LIU, C. Y.; XU, Z.; KAUFMAN, R. J. Structure and intermolecular interactions of the luminal dimerization domain of human IRE1 α . **J Biol Chem**, v. 278, p. 17680-17687, 2003.

LIU, P. D.; HARDING, H. P.; RON, D. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. **J Cell Biol**, v. 167, p. 27-33, 2004.

LIU, JIANGHUAI; HUANGFU, W. C.; KUMAR, K. G. S.; QIAN, J.; CASEY, J. P.; HAMANAKA, R. B.; GRIGORIADOU, C.; ALDABE, R.; DIEHL, J. A.; FUCHS, S. Y. Virus-induced unfolded protein response attenuates anti-viral defenses via phosphorylation-dependent degradation of the type I interferon receptor. **Cell Host Microbe**, v. 5, p. 72-83, 2009.

MA, Y.; SHIMIZU, Y.; MANN, M. J.; JIN, Y.; HENDERSHOT, L. M. Plasma cell differentiation initiates a limited ER stress response by

specifically suppressing the PERK-dependent branch of the unfolded protein response. **Cell Stress Chaperones**, v. 15, p. 281-293, 2010.

McELRATH, M. J.; STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Latent HIV-1 infection in enriched populations of blood monocytes and T cells from seropositive patients. **J Clin Invest**, v. 87, p. 27-30, 1991.

McMILLAN, N. A.; CHUN, R. F.; SIDEROVSKI, D. P.; GALABRU, J.; TOONE, W. M.; SAMUEL, C. E.; MAK, T. W.; HOVANESSIAN, A. G.; JEANG, K. T.; WILLIAMS, B. R. HIV-1 Tat directly interacts with the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent kinase, PKR. **Virology**, v.213, p. 413-424, 1995.

MIELKE, N.; SCHWARZER, R.; CALKHOVEN, C. F.; KAUFMAN, R. J.; DÖRKEN, B.; LEUTZ, A.; JUNDT, F. Eukaryotic initiation factor 2 α phosphorylation is required for B cell maturation and function in mice. **Haematologica**, v. 96, p. 1261-1268, 2011.

MOCROFT, A.; LUNDGREN, J. D. Starting highly active antiretroviral therapy: why, when and response to HAART. **J Antimicrob Chemother**, v. 54, p. 10-13, 2004.

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

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

NAGASE, H.; AGEMATSU, K.; KITANO, K.; TAKAMOTO, M.; OKUBO, Y.; KOMYIAMA, A.; SUGANE, K. Mechanism of hypergammaglobulinemia by HIV infection: circulating memory B-cell reduction in plasmocytosis. **Clin Immunol**, v. 100, p. 250-259, 2001.

NORMAN, J.P.; PERRY, S.W.; REYNOLDS, H.M.; KIEBALA, M.; DE MESY BENTLEY, K.L.; TREJO, M.; VOLSKY, D. J.;

MAGGIRWAR, S. B.; DEWHURST, S.; MASLIAH, E.; GELBARD, H. A. HIV-1 Tat activates neuronal ryanodine receptors with rapid induction of the unfolded protein response and mitochondrial hyperpolarization. **PLoS ONE**, v. 3, e3731, p.1-13, 2008.

OYADOMARI, S.; MORI, M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. **Cell Death Differ**, v. 11, p. 381–389, 2004.

PARKER, R. A.; FLINT, O. P.; MULVEY, R.; ELOSUA, C.; WANG, F.; FENDERSON, W.; WANG, S.; YANG, W. P.; NOOR, M. A. Endoplasmic reticulum stress links dyslipidemia to inhibition of proteasome activity and glucose transport by HIV transport inhibitors. **Mol Pharmacol**, v. 67, p. 1909-1919, 2005.

PASQUAL, G.; BURRI, D., J.; PASQUATO, A.; DE LA TORRE, J. C.; KUNZ, S. Hole of the host cell's unfolded protein response in arenavirus infection. **J Virol**, v. 85, p. 1662-1670, 2010.

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

PENG, G.; GREENWELL-WILD, T.; NARES, S.; JIN, W.; LEI, K. J.; RANGEL, Z. G.; MUNSON, P. J.; WAHL, S. M. Myeloid differentiation and susceptibility to HIV-1 are linked to APOBEC3 expression. **Blood**, v.110, p. 393-400, 2007.

POPE, M.; HAASE, A. T. Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. **Nat Med**, v. 9, p. 847-52, 2003.

RAMBAUT, A.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A.; HOLMES, E. C. The causes and consequences of HIV evolution. **Nat Rev Genet**, v. 5, p. 52-61, 2004.

REGIDOR, D. L.; DETELS, R.; BREEN, E. C.; WIDNEY, D. P.; JACOBSON, L. P.; PALELLA, F.; RINALDO, C. R.; BREAM, J. H.; MARTÍNEZ-MAZA, O. Effect of highly active antiretroviral therapy on

biomarkers of B-lymphocyte activation and inflammation. **AIDS**, v. 25, p. 303-314, 2011.

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

SCHEU, S.; STETSON, D. B.; REINHARDT, R. L.; LEBER, J. H.; MOHRS, M.; LOCKSLEY, R. M. Activation of the integrated stress response during T helper cell differentiation. **Nat Immunol**, v. 7, p. 644-651, 2006.

SCHRÖDER, M. Endoplasmic reticulum stress responses. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, p. 862-894, 2008.

SCHRÖDER, M.; KAUFMAN, R. J. Divergent roles of Ire1 α and PERK in the unfolded protein response. **Curr Mol Med**, v. 6, p. 5-36, 2006.

SIMON, V.; HO, D. D.; KARIM, Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. **Lancet**, v. 368, p. 489-504, 2006.

SLEASMAN, J. W.; GOODENOW, M. M. HIV-1 infection. **J Allergy Clin Immunol**, v. 111, p. 5582-5592, 2003.

TRAVERS, K.J.; PATIL, C.K.; WODICKA, L.; LOCKHART, D.J.; WEISSMAN, J.S.; WALTER, P. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. **Cell**, v. 101, p. 249-258, 2000.

TRIQUES, K.; STEVENSON, M. Characterization of restrictions to human immunodeficiency virus type 1 infection of monocytes. **J Virol**, v. 78, p. 5523-5527, 2004.

URANO, F.; WANG, X.; BERTOLOTTI, A.; ZHANG, Y.; CHUNG, P.; HARDING, H.P.; RON, D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. **Science**, v. 287, p.664–666, 2000.

VERANI, A.; GRAS, G.; PANCINO, G. Macrophages and HIV-1: dangerous liaisons. **Mol Immunol**, v. 192, p. 195-212, 2004.

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

WATI, S.; SOO, M. L.; ZILM, P.; LI, P.; PATON, A. W.; BURRELL, C. J.; BEARD, M.; CARR, J. M. Dengue virus infection induces upregulation of GRP78, which acts to chaperone viral antigen production. **J Virol**, v. 83, p. 12871-12880, 2009.

WEN, X. Y.; STEWART, A. K.; SOOKNANAN, R. R.; HENDERSON, G.; HAWLEY, T. S.; REIMOLD, A. M.; GLIMCHER, L. H.; BAUMANN, H.; MALEK, L. T.; HAWLEY, R. G. Identification of c-myc promoter-binding protein and X-box binding protein 1 as interleukin-6 target genes in human multiple myeloma cells. **Int J Oncol**, v. 15, p. 173-178, 1999.

YAMAMOTO, K.; SATO, T.; MATSUI, T.; SATO, M.; OKADA, T.; YOSHIDA, H.; HARADA, A.; MORI, K. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. **Dev Cell**, v. 13, p.365-376, 2007.

YE, J.; RAWSON, R. B.; KOMURO, R.; CHEN, X.; DAVÉ, U. P.; PRYWES, R.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. **Mol Cell**, v. 6, p. 1355-1364, 2000.

ZHANG, K.; WONG, H.N.; SONG, B.; MILLER, C.N.; SCHEUNER, D.; KAUFMAN, R.J. The unfolded protein response sensor IRE1alpha is required at 2 distinct steps in B cell lymphopoiesis. **J Clin Invest**, v. 115, p. 268-281, 2005.

ZHOU, H.; PANDAK, W. M. JR.; LYALL, V.; NATARAJAN, R.; HYLEMON, P.B. HIV protease inhibitors activate the unfolded protein

response in macrophages: implication for atherosclerosis and cardiovascular disease. **Mol Pharmacol**, v. 68, p. 690–700, 2005.

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

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. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 291, p. 1071-1080, 2006.

ZHU, T; MUTHUI, D.; HOLTE, S.; NICKLE, D.; FENG, F.; BRODIE, S.; HWANGBO, Y.; MULLINS, J.I.; COREY, L. Evidence for human immunodeficiency virus type 1 replication in vivo in CD14(+) monocytes and its potential role as a source of virus in patients on highly active antiretroviral therapy. **J Virol**, v. 76, p. 707-716.

12. ANEXOS

ANEXO 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



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

PROJETO DE PESQUISA

**IMPACTO DA INFECÇÃO PELO HIV SOBRE A VIA UPR
(UNFOLDED PROTEIN RESPONSE) EM CÉLULAS DE
INDIVÍDUOS HIV POSITIVOS**
RESPONSÁVEL: PROF. DR. AGUINALDO R. PINTO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Justificativa: Quando uma pessoa é infectada por um vírus, as células do corpo procuram se defender deste invasor. Esta defesa tem como objetivo evitar que o vírus se multiplique dentro da célula. Além disso, todo vez que uma célula é invadida por um vírus o seu funcionamento é bastante alterado. Para fazer com que a célula volte a funcionar normalmente ela produz alguns fatores, conhecidos como fatores de resposta ao estresse. Vírus como o da hepatite C e o do herpes são oportunistas e utilizam estes fatores em seu próprio benefício. Com isso eles são capazes de escapar da defesa da célula e produzir muitos novos vírus. Quando se descobre quais fatores de defesa contra o estresse são afetados pelos vírus é possível desenvolver novos remédios, ajudando no tratamento de pessoas infectadas. Não existe nenhuma informação ainda sobre como o vírus HIV, causador da AIDS, se comporta diante destes fatores de resposta ao estresse da célula. O vírus HIV destrói

células que fazem parte da defesa do organismo e por isso pessoas infectadas acabam perdendo sua proteção natural contra diversas doenças. É importante dizer que mesmo com a grande quantidade de estudos sobre o HIV ainda não existe um tratamento totalmente eficaz contra a infecção. Este estudo pretende identificar se o HIV também manipula alguns fatores de resposta ao estresse nas células. Para isso vamos comparar a presença destes fatores em células do sangue de pessoas não-infectadas (grupo controle) e infectadas pelo HIV. Dessa forma, os resultados deste estudo tem grande potencial de gerar novas informações que poderão ser utilizadas na produção de novos remédios mais eficientes contra o vírus, ajudando milhões de pessoas. Você está sendo convidado a participar deste projeto, sendo sua participação muito importante para que ele se torne possível, mas podendo você decidir se deseja participar ou não.

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

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

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

Direitos do Voluntário:

1. Garantia de esclarecimento e resposta a qualquer pergunta que você tiver sobre o estudo.
2. Liberdade de abandonar a presente pesquisa a qualquer momento e sem qualquer prejuízo. Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, podendo você se recusar a participar ou desistir a qualquer momento.
3. Garantia de que você não será responsável por qualquer despesa, sendo os gastos absorvidos pelo orçamento da pesquisa.
4. Garantia de privacidade à sua identidade e sigilo de suas informações. Todas as perguntas feitas a você ou informações do seu prontuário e exames permanecerão sob confidencialidade, tendo acesso a elas somente você, os pesquisadores envolvidos na presente pesquisa e o Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC. O seu nome não será identificado em qualquer tipo de publicação que resulte da presente pesquisa.

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

Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Fone: 3721 5206

Mariana Borsa – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Fone: 3721 5514, email: nanaborsa@gmail.com

TERMO DE CONSENTIMENTO

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

(Local e data)

Assinatura do voluntário ou responsável

Nome completo do voluntário: _____

RG/CPF:

Nome completo do responsável: _____

RG/CPF:

Dr. Aguinaldo R. Pinto (pesquisador responsável)

Mariana Borsa (pesquisadora)