

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Monique Ferrary Américo

**Avaliação da potencial modulação da ativação microglial pelo eixo  
PERK da via UPR pela proteína TAT do HIV**

Florianópolis

2019

Monique Ferrary Américo

**Avaliação da potencial modulação da ativação microglial pelo eixo  
PERK da via UPR pela proteína TAT do HIV**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito obrigatório para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.  
Orientador: Prof. Aguinaldo Roberto Pinto, Dr.  
Coorientador MSc. Douglas Bardini Silveira

Florianópolis

2019

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

Américo, Monique

Avaliação da potencial modulação da ativação microglial pelo eixo PERK da via UPR pela proteína TAT do HIV / Monique Américo ; orientador, Aguinaldo Roberto Pinto, coorientador, Douglas Bardini Silveira, 2019.

52 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. HIV. 3. Proteína TAT. 4. via UPR. 5. ativação microglial. I. Pinto, Aguinaldo Roberto. II. Bardini Silveira, Douglas. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Monique Ferrary Américo

**Avaliação da potencial modulação da ativação microglial pelo eixo PERK da via UPR  
pela proteína TAT do HIV**

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

Florianópolis, 27 de novembro de 2019.

---

Prof. Carlos Roberto Zanetti, Dr.  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

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

---

MSc. Douglas Bardini Silveira  
Coorientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Profa. Jéssica Campestrini  
Avaliadora

---

Dra. Doris Sobral Marques Souza  
Avaliadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho aos meus pais, Eroni e Márcia.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais Eroni e Márcia, pelo apoio incondicional na busca pelos meus objetivos, por terem me ensinado o valor da dedicação e do trabalho e sempre buscarem a melhor educação que eu pudesse ter. Eu devo tudo a vocês.

Ao meu orientador, Aguinaldo, por ter me aceitado no Laboratório de Imunologia Aplicada e pelos ensinamentos, conselhos, e convivência ao longo de dois anos de Iniciações Científicas e agora TCC. Você é também um professor incrível que eu tive a sorte de ter tido.

Ao meu coorientador Douglas, por todo o conhecimento transmitido sempre com clareza, paciência e sapiência, não somente na bancada. Nos momentos de mediocridade intelectual, você me ajudou a ver as coisas com mais nitidez. Seus ensinamentos fizeram e farão toda a diferença na minha formação científica.

Agradeço aos colegas de laboratório pela convivência agradável e amizade, em especial ao Wellington, por ser a primeira pessoa a me acolher no laboratório e por todas as tardes bebendo café, principalmente enquanto este trabalho era redigido.

Agradeço às amigas de Criciúma que estão comigo desde o colégio: Laura, Natália e Rebecca, pela amizade maravilhosa que temos e por terem acompanhado minha evolução durante esses anos. Às amigas que estão comigo desde o primeiro semestre da graduação: Ariel, Barbara, Bruna Vieira e Bruna Soares, Giovanna e Julia pela amizade duradoura mesmo quando a vida nos leva a diferentes caminhos (tem gente até na França!). À Thaís Leal pelo companheirismo ao longo boa parte dessa jornada, pela paciência em lidar comigo e com as minhas questões existenciais e por toda a positividade que você me trouxe.

Às minhas amigas vizinhas Carime, Guti, e Tati, por todos os cafés da tarde conversando sobre a vida, o universo e tudo mais, por todas as jogatinas de domingo à noite, por toda a rede de apoio mútuo que construímos. Às amigas Ana, Carol, Isa, Lary, Laura, Moni, Sofia, e Thaís Assis por todas as horas felizes, por todas as festas e todos os momentos ao lado de vocês ao longo do curso. Vocês fizeram minha jornada pela graduação ser uma experiência mais leve e completa.

Agradeço por fim a UFSC e CNPq pelas bolsas concedidas e infraestrutura para a realização do trabalho e da minha formação.

Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes. (NEWTON, Isaac, 1675)

## RESUMO

Na infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), o processo neurodegenerativo e seus consequentes prejuízos cognitivos, categorizados como *HIV-Associated Neurocognitive Disorders* (HAND), se destacam como um aspecto relevante. Um dos pontos consensuais sobre a patogênese da neurodegeneração associada ao HIV é a ativação microglial resultante da liberação de uma série de fatores neurotóxicos direta e indiretamente pela população de células do Sistema Nervoso Central. No entanto, nos quadros de neurodegeneração, a micróglia também apresenta um fenótipo alternativo caracterizado pela síntese de mediadores de resolução de inflamação. Paralelamente, em uma infecção viral de sucesso, grandes quantidades de proteínas são sintetizadas pelo Retículo Endoplasmático, gerando estresse. Assim, as células possuem um mecanismo de resposta a esse estresse, denominado via UPR (*Unfolded Protein Response*), que possui três braços que podem atuar sinergicamente na resolução do estresse do RE: IRE1, PERK e ATF6. O eixo PERK é deflagrado pela proteína sensora do acúmulo de proteínas que inicia uma cascata de sinalização, resultando na inibição traducional, e por ser tempo-dependente, caso o estresse não seja resolvido, há transcrição de genes que iniciarão apoptose. Sabe-se que há modulação da via UPR na infecção pelo HIV e um dos fatores envolvidos tanto na modulação da via quanto na ativação microglial observada é a proteína de transativação viral (TAT). A proteína TAT tem um papel na replicação viral, sendo responsável pela transcrição do material genético, mas também pode ser secretada e adentrar outros tipos celulares. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a potencial modulação do eixo PERK da via UPR na polarização M1/M2 causada pela proteína TAT do HIV-1 em células microgliais *in vitro*. Para tanto, empregou-se um sistema procarioto de expressão da proteína e uma estratégia de purificação utilizando colunas de cromatografia por afinidade. Células de linhagem microglial BV-2 foram estimuladas com a proteína TAT recombinante para avaliação de diferentes marcadores. Foram detectados níveis significantes das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-6 e MCP-1 e de NO, corroborando os dados encontrados na análise transcricional de iNOs, o qual atingiu valores significativos, enquanto que níveis de Arg-1 não foram significativos. Em adição, TAT induziu a expressão do marcador CD16/32. A inibição do eixo PERK revelou atenuação em nos marcadores M1 induzidos pela proteína TAT. Em conjunto, os dados apresentados indicam que a proteína TAT do HIV-1 leva células microgliais à ativação clássica (M1), tendo o eixo PERK da via UPR um papel na modulação desta ativação, podendo ser futuramente alvo de investigações visando seu bloqueio e consequente atenuação da inflamação.

**Palavras-chave:** HIV-1. TAT. Neuroinflamação. Via UPR.



## ABSTRACT

In human immunodeficiency virus (HIV) infection, the neurodegenerative process and its consequent cognitive impairments, categorized as HIV-Associated Neurocognitive Disorders (HAND), stand out as a relevant aspect. One of the consensual points about the pathogenesis of HIV-associated neurodegeneration is microglial activation, resulting from the release of a number of neurotoxic factors directly and indirectly by the central nervous system immune cell population. However, in neurodegeneration, microglia also have an alternative phenotype characterized by the synthesis of inflammation resolution mediators. At the same time, in a successful viral infection, the endoplasmic reticulum synthesizes large amounts of protein, generating stress. Thus, cells have a mechanism of response to this stress, called Unfolded Protein Response (UPR) pathway, which has three branches that can act synergistically in the resolution of the stress of ER. The protein accumulation triggers the PERK axis, which initiates a signaling cascade, resulting in translational inhibition, and because it is time-dependent, if stress is not resolved, there is transcription of genes that will initiate apoptosis. UPR pathway modulation is known to occur in virus infection, and HIV transactivation protein (TAT) is one of the factors involved in both this stress in ER and in observed microglial activation. TAT protein plays a role in viral replication, being responsible for the transcription of genetic material, but it can also be secreted and infect other cell types. Thus, the objective of the present work was to evaluate the potential modulation of the PERK axis of the UPR pathway in microglial polarization caused by HIV-1 TAT protein in microglial cells *in vitro*. We employed a prokaryote expression system and a purification strategy using affinity chromatography columns. BV-2 microglial lineage cells were stimulated with recombinant TAT protein to evaluate different markers. We detected significant levels of pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6 and MCP-1 and NO, corroborating the data found in the transcriptional analysis of iNOs, which reached significant values. In addition, TAT induced expression of the CD16/32 marker. Finally, inhibition of the PERK axis revealed attenuation in the TAT protein-induced M1 markers. Taken together, the data presented leads us to the conclusion that the HIV-1 TAT protein brings microglial cells to classical activation (M1), and the PERK branch of the UPR pathway plays a role in modulating this activation, and may in future be investigated aiming at its blockade and consequent attenuation of CNS inflammation.

**Keywords:** HIV. TAT. Neuroinflammation. UPR pathway.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ativação da via UPR.....	16
Figura 2 – Delineamento experimental utilizado.....	20
Figura 3 – Sistema de expressão procariota de TAT baseado no vetor pET-15b.....	30
Figura 4 – Purificação de TAT expressa em <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	30
Figura 5 – Secreção de Óxido Nítrico em células microgliais estimuladas com diferentes concentrações de TAT.....	33
Figura 6 – Níveis de secreção das moléculas de resposta de ativação microglial analisadas 3, 6, 12, 24, 48 e 72h pós estímulo com 400 nM de proteína TAT recombinante do HIV.....	34
Figura 7 – Expressão relativa dos genes iNOs e Arg-1 em células BV-2 com TAT recombinante avaliada em 3, 24, 48 e 72 horas pós-estímulo por uso da técnica RT-qPCR.....	38
Figura 8 – Análise da expressão de CD16/32 e CD206 em células BV-2 por citometria de fluxo.....	40
Figura 9 – Perfil de viabilidade de células BV-2 após tratamento com o inibidor farmacológico do eixo PERK da via UPR.....	42
Figura 10 – Efeito na expressão de componentes eixo PERK da via UPR induzida por TAT em células BV após tratamento com inibidor farmacológico.....	43
Figura 11 – Efeito do inibidor do braço PERK da via UPR sobre a ativação induzida por TAT em células BV-2.....	44

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1	O HIV E A NEURODEGENERAÇÃO .....	13
1.2	OS ESTADOS DE POLARIZAÇÃO MICROGLIAL.....	14
1.3	A VIA UPR ( <i>UNFOLDED PROTEIN RESPONSE</i> ).....	15
1.4	A PROTEÍNA TAT DO HIV-1 .....	17
1.5	O HIV E A VIA UPR .....	18
<b>2</b>	<b>HIPÓTESE .....</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>19</b>
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	19
4.2	PRODUÇÃO DA PROTEÍNA TAT RECOMBINANTE DO HIV-1 .....	21
4.2.1	Transformação bacteriana .....	21
4.2.2	Expressão heteróloga .....	21
4.2.3	Purificação.....	22
4.2.4	Dot-blot .....	22
4.2.5	Espectrometria de massas.....	23
4.3	CULTIVO CELULAR E ESTIMULAÇÃO COM TAT RECOMBINANTE .....	24
4.4	DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO .....	24
4.5	ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR.....	25
4.6	ANÁLISE DE SECREÇÃO DE CITOCINAS POR <i>CITOMETRIC BEAD ARRAY</i> – CBA.....	26
4.7	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE CELULAR.....	26
4.8	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DA POLARIZAÇÃO MICROGLIAL E DO EIXO PERK DA VIA UPR.....	26
4.9	INIBIÇÃO DO EIXO PERK DA VIA UPR.....	29
4.10	ANALISE ESTATÍSTICA .....	29
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>29</b>
5.1	EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE TAT E PURIFICAÇÃO .....	29
5.2	TAT MODULA A SECREÇÃO DE MARCADORES INFLAMOGÊNICOS DE FORMA TEMPO-DEPENDENTE .....	32
5.3	TAT MODULA A EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES DE ATIVAÇÃO MICROGLIAL .....	37
5.4	TAT MODULA A EXPRESSÃO DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE CELULAR.....	39
5.5	A MODULAÇÃO DO PERFIL M1 POR TAT ENVOLVE O EIXO PERK DA VIA UPR.....	41

<b>6</b>	<b>SUMÁRIO DE RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>46</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O HIV E A NEURODEGENERAÇÃO

Quatro décadas atrás surgiu o primeiro relato descrevendo uma imunodeficiência potencialmente transmissível, capaz de levar pacientes previamente saudáveis ao desenvolvimento de quadros clínicos raros como pneumonia pneumocística e candidíase mucocutânea (GOTTLIEB et al., 1981). Causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus*, HIV), a aids é atualmente uma pandemia: 37,9 milhões de pessoas vivem com HIV no mundo, sendo registrados em 2018 1,7 milhões de novas infecções e 770 mil mortes relacionadas à aids (UNAIDS, 2019). Desde o início da epidemia, 74,9 milhões de pessoas foram infectadas e 32 milhões morreram (UNAIDS, 2019). No Brasil, de 1980 a 2018, foram detectados 982.192 casos de aids e somente em 2017, 42.420 novas infecções, 37.791 casos de aids e 11.463 óbitos foram registrados (BRASIL, 2018). Deste modo, o vírus ainda apresenta desafios para médicos e pesquisadores no combate ao seu vasto impacto.

Reconhecido pelas consequências deletérias no sistema imune, o HIV também chega ao Sistema Nervoso Central (SNC), onde causa perturbações. Ao espectro de complicações neurocognitivas ocasionadas pela infecção viral denomina-se *HIV-associated neurocognitive disorders*, ou HAND. Em suas manifestações mais severas, ocorre perda de atenção e concentração, correlacionados com nódulos celulares típicos de encefalites virais e níveis detectáveis de marcadores inflamatórios no encéfalo (CLIFFORD; ANCES, 2013). No entanto, a maior prevalência das HAND observadas atualmente é a de formas moderadas e assintomáticas, cujos critérios de avaliação clínica não são inteiramente definidos. A terapia antirretroviral tem diminuído as formas mais severas das HAND, porém, pacientes podem ainda vivenciar prejuízos cognitivos e manter reservatórios virais no SNC em decorrência de diversos obstáculos, como a difícil distribuição de fármacos no encéfalo (CLIFFORD; ANCES, 2013; KRAFT-TERRY et al., 2010).

O HIV-1 infecta linfócitos, macrófagos e monócitos pela interação entre o receptor CD4 com a proteína viral capsular gp120 e subsequente ligação com correceptor celular CXCR4 ou CCR5 para exposição da proteína viral gp41 e fusão das membranas viral e celular (RAO; RUIZ; PRASAD, 2014). O vírus alcança o SNC através de monócitos infectados, que cruzam a barreira hematoencefálica com certa periodicidade como parte de uma vigilância e reabastecimento imune do SNC (BANKS; ERCAL; OTAMIS PRICE, 2006). A afluência de células infectadas leva, por sua vez, à infecção nas células residentes do SNC, que serão o principal sítio de replicação viral e fonte de fatores virais e inflamogênicos. Assim ocorrerá um

cenário de neuropatogênese, que, por sua vez, tem como um de seus produtos um afrouxamento da barreira hematoencefálica, levando a um aumento na taxa de células infectadas que chegam no encéfalo, tornando o cenário mais complexo (RAO; RUIZ; PRASAD, 2014). Sabe-se que neurônios não são capazes de abrigar a replicação do vírus, entretanto expressam receptores de superfície que os tornam suscetíveis a citocinas pró-inflamatórias e fatores virais. Estes ocasionarão prejuízos diretos, como apoptose neuronal e perda da árvore dendrítica, e indiretos, já reportados, como a desregulação do braço imunocompetente do SNC (CLIFFORD; ANCES, 2013; RAO; RUIZ; PRASAD, 2014).

## 1.2 OS ESTADOS DE POLARIZAÇÃO MICROGLIAL

A população de macrófagos residentes é denominada micróglia, que apresentam capacidade de proliferação, migração e fagocitose e se envolve na função de manter a homeostasia do SNC (MIRON; FRANKLIN, 2014). No contexto fisiológico, a micróglia é responsável pela vigilância imune no ambiente neuronal, contribui com a limpeza de resíduos celulares no desenvolvimento e maturação neuronal e secreta uma série de fatores que estão envolvidos na regeneração tecidual (LOCATI; MANTOVANI; SICA, 2013). Contudo, a micróglia torna-se ativa através do estímulo deflagrado pela infecção do HIV-1 ou mediado por fatores virais circulantes, representando o principal sítio de replicação e síntese de proteínas virais solúveis e assim, assume um caráter neuropatogênico relevante nas HAND (WU et al., 2018b).

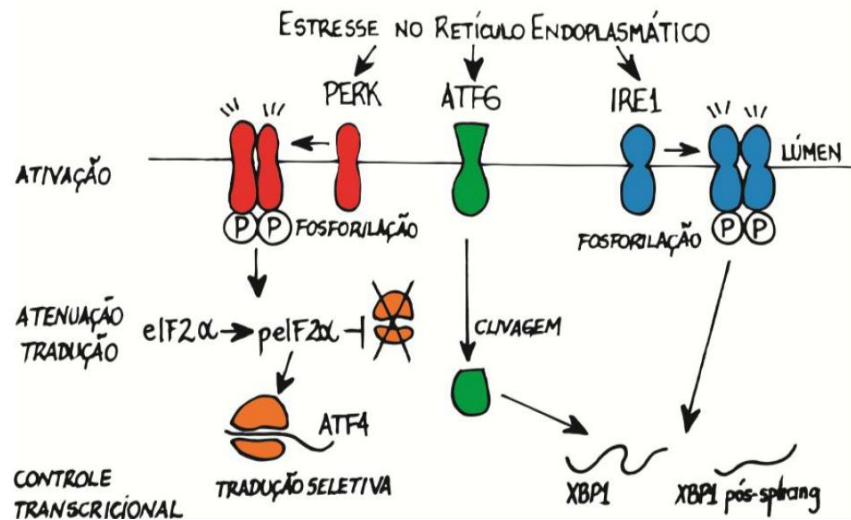
A micróglia, quando ativada por interferon (IFN)- $\gamma$  ou ligantes de receptores tipo *toll* (*toll like receptors*, TLRs), como lipopolissacarídeo (LPS), assume um estado fenotípico entendido como “ativação clássica” ou perfil M1. O perfil M1 é caracterizado por alta produção de citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas (IL) -12, IL-23, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , e produção de espécies reativas de oxigênio (LOCATI; MANTOVANI; SICA, 2013; WANG et al., 2019). Posteriormente, foi descoberta a ativação microglial em resposta às citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-13, a qual entendeu-se como um perfil alternativo de ativação também denominado perfil M2. Em contraste, o perfil M2 caracteriza-se por altos níveis de IL-10, citocina também anti-inflamatória, e as células participam na remodelação tecidual, angiogênese e funções resolutivas de inflamação, sobretudo em doenças neurodegenerativas (LOCATI; MANTOVANI; SICA, 2013; RÖSZER, 2015). Embora antagonísticos, os perfis M1 e M2 podem coexistir, e a modulação do processo de polarização M1/M2 é multifatorial e

relacionada à extensão do dano tecidual e aos vários componentes imunoquímicos ativadores ou inibidores disponíveis (MARTINEZ; GORDON, 2014).

O papel dos fenótipos M1 e M2 é relevante também em outras doenças neurodegenerativas. Na doença de Parkinson, o fenótipo M1 é promovido principalmente pelo acúmulo da proteína  $\alpha$ -sinucleína liberada de neurônios mortos, enquanto que o fenótipo M2 permanece escassamente compreendido (TANG; LE, 2015). Na doença de Alzheimer, encontra-se uma mistura dos fenótipos M1 e M2 ao longo dos estágios da doença, com o fenótipo M1 tendo um papel inicial relevante na degradação da proteína  $\beta$ -amiloide mal-dobrada, enquanto que o fenótipo M2 pode ser atribuído à limpeza tecidual (SARLUS; HENEKA, 2017). Na infecção pelo HIV-1, a resposta M1 leva à síntese de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que podem inibir a entrada do vírus na célula, mas favorece sua replicação, levando à formação de reservatórios virais, ao passo que também se relata a inibição transcricional modulada pelas citocinas IL-4 e IL-13, relacionadas ao fenótipo M2. Assim, a polarização M1/M2 dos macrófagos na infecção pelo HIV-1 pode representar um mecanismo pelo qual haja uma alternância entre estado latente da infecção e estado produtivo, sem descartar a importância do microambiente na modulação da polarização (HERBEIN; VARIN, 2010).

### 1.3 A VIA UPR (*UNFOLDED PROTEIN RESPONSE*)

Em uma infecção viral produtiva, grandes quantidades de proteínas são sintetizadas utilizando a maquinaria celular, gerando acúmulo de proteínas mal-dobradas no interior do Retículo Endoplasmático (RE). O mecanismo de resposta a esse estresse do RE é uma via denominada *Unfolded Protein Response* (UPR), iniciada pelo reconhecimento das proteínas mal-dobradas pelas chaperonas, que levarão à remodelação ou à degradação no proteossomo (WALTER; RON, 2011). A via compreende três braços relacionados à sua ativação: IRE1 (*Inositol Requiring Enzyme 1 $\alpha$* ), ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*) e PERK (*Protein Kinase-like ER Kinase*), que podem atuar sinergicamente na resolução do estresse e estão mostrados na Figura 1. A não resolução do estresse no RE leva a célula à transcrição de moléculas que irão iniciar o processo de apoptose (YOSHIDA, 2007).



**Figura 1. Ativação da via UPR.** PERK atua na fosforilação da proteína eIF2  $\alpha$ , 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. Fonte: Borsa, 2012.

PERK é uma proteína transmembrana do RE cuja porção citoplasmática contém um domínio quinase. Na ausência de estresse, a proteína está ligada à chaperona BiP (*Binding immunoglobulin Protein*) que impede a ativação do eixo. Quando ativada, BiP dissocia-se de PERK, que oligomeriza-se e fosforila-se, e então fosforila a subunidade  $\alpha$  do fator de transcrição eIF2 $\alpha$  (*eukaryotic Translational Initiation Factor 2*), resultando em inibição traducional pela diminuição da entrada de proteínas no RE (WALTER; RON, 2011b; YOSHIDA, 2007). Por consequência da atenuação de eIF2 $\alpha$ , há a ativação da proteína ATF4, que por sua vez, tem como alvo a transcrição do fator CHOP (*C/EBP homology protein*), envolvido na inibição de genes antiapoptóticos e GADD34, envolvido na defosforilação de eIF2 $\alpha$ , além de proteínas relacionadas a resistência a estresse (WALTER; RON, 2011b; YOSHIDA, 2007). O eixo PERK também está relacionado com vias de sinalização da resposta imune inata, conforme reporta-se que a sinalização via TLR inibe o eixo ATF4/CHOP (ZHONG et al., 2012). Ademais, reporta-se a modulação do eixo PERK da via pelo HIV-1 *in vitro* e *in vivo*, com o vírus induzindo altos níveis de eIF2 $\alpha$  em linfócitos T CD4 (BORSA et al., 2015). Descreve-se também a modulação do eixo PERK e consequente apoptose de linfócitos T CD4 por um dos fatores virais importantes no curso da infecção, a proteína TAT (CAMPESTRINI; SILVEIRA; PINTO, 2018).



#### 1.4 A PROTEÍNA TAT DO HIV-1

O gene *TAT* codifica uma proteína de 14 kDa, de 86-104 aminoácidos, já nos estágios iniciais de infecção na célula que desempenha um papel crucial na transcrição do vírus: ligar-se a um sítio do RNA do HIV-1 denominado *TAR* (*Transactivator Response Element*), que desencadeia o recrutamento do maquinário celular hospedeiro para a transcrição do material genético viral completo. Embora se conheça a necessidade das sequências *TAR* na maioria dos tipos celulares, *TAT* também é capaz de ativar diretamente as sequências LTR (*Long Terminal Repeat*) na ausência de *TAR* em linhagens neurogliais (BAGASHEV; SAWAYA, 2013).

Além do seu papel intracelular em células infectadas e acúmulo no núcleo, a proteína *TAT* é secretada por um mecanismo não-convencional, que se baseia na ligação com fosfoinositídeos de membrana (DEBAISIEUX et al., 2012). Extracelularmente, *TAT* é capaz de interagir com receptores celulares endocíticos ubíquos como dipeptidil aminopeptidase IV, CXCR4, LPR (*Lipoprotein Receptor-related Protein*), além de receptores neuronais, o que permite causar efeito em diversos tipos celulares. Desta forma, chega ao citosol por meio de endocitose dirigida pela exposição de domínios específicos induzida pela diminuição do pH endossomal, com a translocação para o citosol e reestruturação catalisadas pela chaperona Hsp90 (*Heat Shock Protein 90*) (DEBAISIEUX et al., 2012).

*TAT* contribui direta e indiretamente para a infecção pelo vírus e para a progressão do quadro clínico de imunodeficiência, aumentando a expressão de CD4 e a taxa de replicação celular naquelas que serão alvo do HIV-1 (CAMPESTRINI; SILVEIRA; PINTO, 2018; PUGLIESE et al., 2005). No SNC, *TAT* pode alterar diretamente o influxo de cálcio neuronal e inibir o transporte de dopamina por interação nas vias desses mecanismos e interagir com a atividade mitocondrial neuronal, podendo levar à apoptose (LI et al., 2009). A proteína também é um dos agentes a interferir em células da barreira hematoencefálica, alterando o padrão de expressão de proteínas de junção importantes tornando a barreira mais permeável a células infectadas e fatores virais, evento também confirmado *in vivo* em camundongos (BAGASHEV; SAWAYA, 2013). *TAT* circulante também pode agir em conjunto com outros fatores virais, como a proteína viral gp120, glutamato presente no SNC ou drogas de abuso para causar neurotoxicidade (LI et al., 2009). Além da interação direta que ocasiona a neurodegeneração, *TAT* também contribui para ativação de astrócitos em decorrência da ativação microglial, que também contribuirão na neurodegeneração secretando altos níveis de MCP-1 (BAGASHEV; SAWAYA, 2013).

## 1.5 O HIV E A VIA UPR

A ativação viral da via UPR é desencadeada pela intensa expressão de novas partículas virais pelo maquinário de síntese do RE. Entretanto, a resposta celular mediada por determinados efetores da via UPR mostra-se um obstáculo ao processo de replicação viral. O sucesso da infecção de um vírus é, portanto, alcançado por meio da manipulação de diferentes etapas das vias UPR (ZHANG; WANG, 2012).

A infecção por HIV foi associada à expressão de ATF4, causando um acúmulo deste fator durante a fase aguda da infecção. ATF4 é também responsável por promover a reativação da replicação do HIV em células infectadas, sugerindo que eventos de estresse no RE indutores de ATF4 podem ser relevantes para o fim do estado de latência viral (CASELLI et al., 2012). Outro estudo recente observou ativação dos três braços da via UPR sob estímulo de TAT de maneira tempo-dependente em células Jurkat e consequente ativação de genes pró-apoptóticos CHOP, GADD34 e BIM, além de observar também alterações morfológicas e de ciclo celular nas células estudadas quando estimuladas com TAT (CAMPESTRINI; SILVEIRA; PINTO, 2018).

Relata-se também que a infecção pelo HIV aumenta os níveis de expressão de BiP/GRP78 e resulta na ativação dos três braços da via UPR: PERK, IRE1 $\alpha$  e ATF6 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e monócitos provenientes de pacientes submetidos ou não ao tratamento antirretroviral (BORSA et al., 2015). Aparentemente, os sensores PERK e IRE1 $\alpha$  nestas células sofrem ativação sinérgica pela ação viral e a presença de drogas antiretrovirais, enquanto a indução do braço mediado por ATF6 não é influenciada pelo tratamento farmacológico (BORSA et al., 2015).

Sendo assim, a neurodegeneração observada na infecção pelo HIV leva à investigação mais profunda de diversos aspectos. Diversos estudos têm sido realizados para elucidar a ativação microglial resultante da liberação de uma série de fatores neurotóxicos pela população de células do SNC. No entanto, nos quadros de neurodegeneração, a micróglia também apresenta um fenótipo alternativo caracterizado pela síntese de mediadores de resolução de inflamação. Paralelamente, estudos também têm elucidado a resposta celular ao estresse causado pela síntese de grandes quantidades de proteínas e a consequente ativação da via UPR, que possui três braços que irão atuar na resolução do estresse do RE ou iniciar um processo de apoptose, caso o estresse não seja solucionado. Há uma extensa literatura acerca da modulação da via UPR na infecção pelo HIV, sendo um dos fatores envolvidos a proteína de transativação viral (TAT). A proteína TAT também é referida como um dos agentes da ativação microglial,

já que é secretada e é internalizada pelas células. No entanto, o papel da via UPR na ativação microglial permanece pouco compreendida e o entendimento dos processos na neurodegeneração poderão futuramente viabilizar novas estratégias de tratamento visando o bloqueio de fatores virais ou intracelulares.

## **2 HIPÓTESE**

A proteína TAT do HIV induz as células microgliais a exibir um estado pró-inflamatório e deflagra o eixo PERK da via UPR.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Caracterizar o perfil fenotípico induzido pela proteína TAT recombinante do HIV-1 e avaliar a potencial modulação deste pela deflagração do eixo PERK da via UPR em células microgliais *in vitro*.

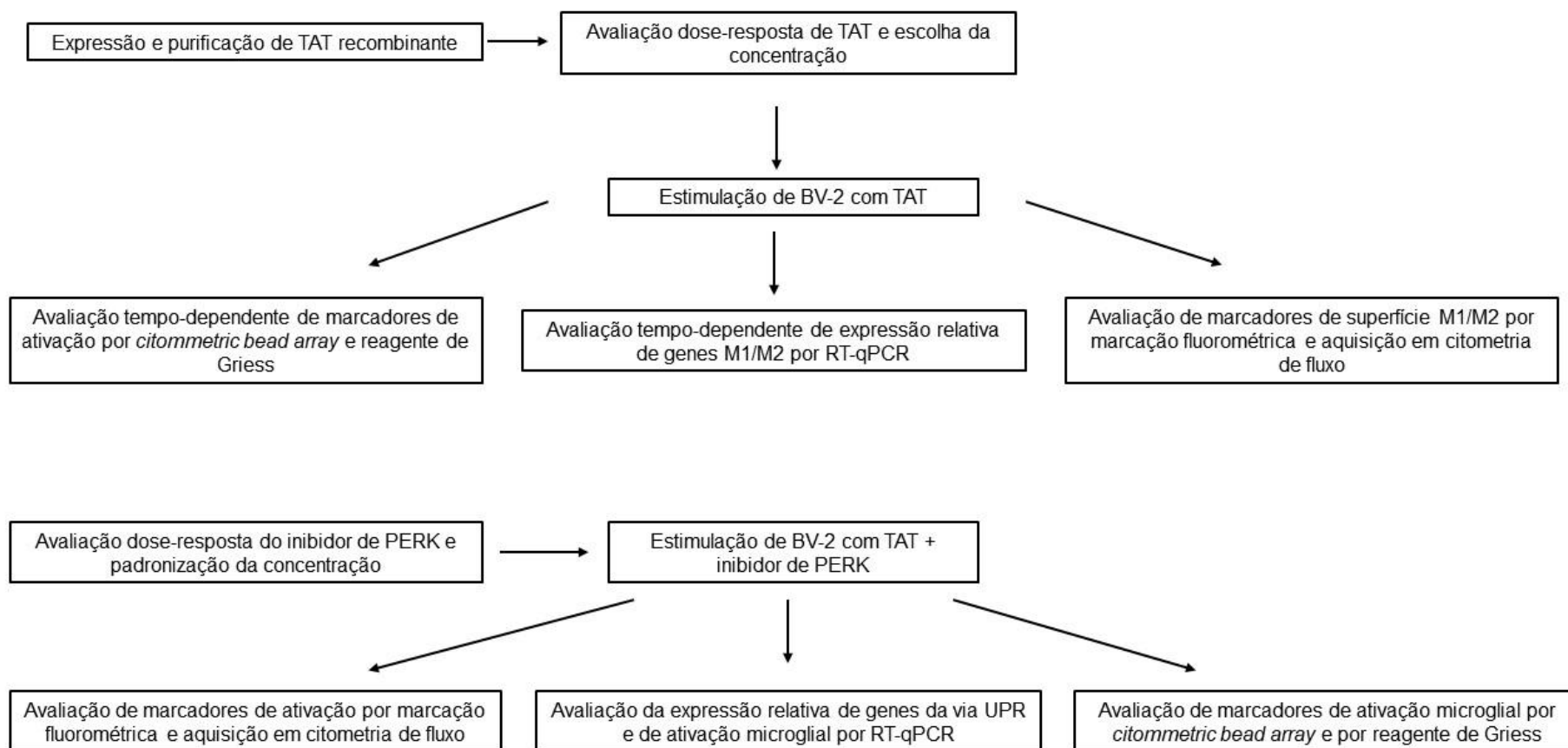
### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Expressar e purificar a proteína TAT recombinante do HIV-1 a partir de um modelo procarioto;
- b) Avaliar o perfil de expressão tempo-dependente de moléculas de ativação microglial em células *in vitro* estimuladas com a proteína TAT do HIV-1;
- c) Avaliar a expressão gênica tempo-dependente de moléculas envolvidas nas vias de sinalização relacionadas aos fenótipos M1/M2 em células microgliais murinas *in vitro* estimuladas com a proteína TAT do HIV-1;
- d) Avaliar a potencial relação entre a expressão de componentes da via UPR deflagrada por PERK e os perfis de ativação observados em células microgliais murinas sob estímulo *in vitro* de TAT.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

A figura 2 ilustra o delineamento experimental realizado no presente trabalho.



**Figura 2.** Delineamento dos experimentos realizados no presente trabalho.

## 4.2 PRODUÇÃO DA PROTEÍNA TAT RECOMBINANTE DO HIV-1

### 4.2.1 Transformação bacteriana

Em microtubos contendo 600 µl de cultura bacteriana, bactérias quimiocompetentes *Escherichia coli* (cepa BL21 DE3) receberam a adição de 2 µl do vetor de expressão pET-15b contendo a construção gênica codante para a proteína TAT (grupo M, subtipo B, cepa BH10 86 aa.) e 6 aminoácidos histidina na porção C-terminal (pet-15b-6xHis-HIV-TAT, 5952 pb, Genone). Os microtubos permaneceram em gelo por vinte minutos e após, foram imediatamente aquecidos a 42°C em termobloco por 2 minutos e então incubados novamente em gelo durante 1 minuto e meio.

Adicionou-se 500 µl de meio de cultura Luria-Bertani (Sigma-Aldrich) em cada microtubo de cultura bacteriana e incubou-se a 37°C sob agitação de 150 RPM durante 1 hora. Então, o volume total de cada microtubo foi inoculado em placas de Petri previamente preparadas com 25 ml de meio de cultura LB-Ágar (Sigma-Aldrich) e antibiótico ampicilina 100 mg/ml e, em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 37°C durante a noite. Na manhã seguinte, foram armazenadas a 4°C.

### 4.2.2 Expressão heteróloga

Para a expressão heteróloga da proteína recombinante de interesse, colônias individuais provenientes das placas previamente armazenadas foram selecionadas utilizando pipeta e crescidas em garrafas de vidro contendo 250 ml de meio de cultura LB (Miller) e 100 mg/ml de ampicilina durante a noite a 37°C sob agitação de 150 RPM. No dia seguinte, a indução da expressão proteica foi realizada adicionando 1 mM de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) às culturas com densidade ótica entre 0,6 e 0,8 lidas em espectrofotômetro a 600 nm de absorbância. As garrafas de cultura permaneceram incubadas por 4 horas a 37°C sob agitação de 150 RPM.

Posteriormente, as culturas foram centrifugadas a 4000 RPM e 4°C durante 40 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em Tampão A (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 50mM NaCl, 20mM Imidazol, pH 7,4) adicionado de 10 µg/mL de fluoreto de fenilmetano sulfonil (PMSF). Em seguida, as células foram lisadas por sonicação em 10 ciclos de 30 segundos (QSonica). O sobrenadante (Fração Insolúvel, FI) e o precipitado (Fração Solúvel, FS) foram filtrados utilizando filtros 0,22 µm e armazenados para posterior purificação. A expressão foi avaliada por meio da coleta das amostras seguida de adição de

tampão desnaturante e fervura a 95°C durante 5 minutos para resolução em gel SDS PAGE 16% e ensaio imunocromatográfico.

#### 4.2.3 Purificação

A estratégia de purificação empregada foi desenvolvida por Siddappa e colaboradores (2006), utilizando uma coluna de Ni-NTA e uma SP-Sepharose, em tandem. A coluna Ni-NTA fundamenta-se na afinidade do níquel e o agente quelante ácido nitrilotriacético (NTA) que o estabiliza, com anéis imidazol presentes nos 6 aminoácidos histidina do marcador His-tag na porção N-terminal da proteína. Primeiramente, a coluna Ni-NTA (HisTrap HP™ 1mL, GE Healthcare LifeSciences) foi lavada com 10 ml de água ultra destilada e equilibrada com 5 ml de Tampão A. Então, a amostra foi aplicada com auxílio de seringa a uma velocidade de 1 ml por minuto, seguida de lavagem com 10 ml de Tampão A acrescido de 2% de Triton X-100. Posteriormente, realizou-se uma nova lavagem com Tampão A, seguido de lavagem com 5ml de Tampão C (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 500mM NaCl, pH 7,4), 5 ml de solução Tampão A/D 1:2 (Tampão D: 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 50mM NaCl, pH 7,4). A eluição final foi realizada com 5 ml de Buffer B (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 50mM NaCl, 1M Imidazol, pH 6,8).

Proseguiu-se com a purificação em coluna SP Sepharose (HiTrap™ SP FF 1mL, GE Healthcare LifeSciences). Inicialmente, a coluna foi lavada com 10 ml de água ultra destilada e equilibrada com 5ml de Tampão E (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, pH 6,8). Após, aplicou-se 5 ml de Tampão F (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 1M NaCl, pH 6,8) e novamente 5 ml de Tampão E. Então aplicou-se a amostra eluída previamente da coluna Ni-NTA com auxílio de seringa em velocidade de 1 ml por minuto. A coluna foi lavada com 5 ml de solução Tampão E/F 1:2 e então eluída com 5ml de Tampão F.

O eluído final foi filtrado em tubos Amicon™ (Milipore) contendo Tampão D acrescido de DTT 1 Mm e aliqotado em microtubos que foram armazenados a -80°C. Amostras foram adicionadas a tampão denaturante e submetidas à fervura em 95°C durante 5 minutos para posterior resolução em gel SDS PAGE 16%. A quantificação foi realizada por ensaio de Bradford, lido em espectrofotômetro com comprimento de onda a 595 nm (KRUGER, 2002).

#### 4.2.4 Dot-blot

A fim de confirmar a expressão da proteína TAT recombinante, amostras foram coletadas a partir das frações solúvel e insolúvel dos cultivos de bactérias BL21(DE3) transformadas após indução de expressão, transformadas e lisadas em tampão de lise (1% SDS,

2mM EDTA, 50mM Tris), para então serem aplicadas em membrana de nitrocelulose (Bio-Rad). A membrana foi bloqueada com solução de bloqueio (TBS 1x, 0,05% Tween20, 5% leite desnatado) durante 1 hora sob agitação à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada 5 vezes com solução de lavagem (TBS 1x, 0,05% Tween20) e então adicionou-se o anticorpo primário anti-His (Sigma) diluído 1.000 vezes em uma solução TBS 1x, 0,05% Tween20, 5% BSA, 15mM Azida de sódio que permaneceu sob agitação durante a noite. No dia seguinte, a membrana foi lavada novamente 5 vezes com a mesma solução de lavagem e incubada com o anticorpo secundário anti-*mouse* HPR conjugado em diluição de 1.000 vezes em uma solução TBS 1x, 0,05% Tween20, 5% leite desnatado durante 1 hora. As membranas foram reveladas utilizando o reagente ECL (Thermo-Scientific) e com auxílio do equipamento GelDoc™ XR+ (Bio-Rad) conforme instruções do fabricante.

#### 4.2.5 Espectrometria de massas

Para caracterizar bioquimicamente e avaliar o grau de pureza da proteína purificada, amostras foram submetidas a análises de ionização a laser assistida por matriz seguida de espectrometria de massas por tempo de voo (MALDI-TOF). Para tanto, amostras obtidas do processo de purificação foram analisadas em gel SDS-PAGE conforme descrito e bandas correspondentes à TAT recombinante foram excisadas e descoradas em solução contendo 50% (v/v) de acetonitrila (25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 8,5) durante 12 h a 25°C, seguido de extração extraídos em lavagens sequenciais com solução de 0,1% (v/v) ácido trifluoroacético e 50% (v/v) acetonitrila (25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 8,5).

As amostras foram diluídas na razão de 1:1 à matrix [ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico 10mg/mL em acetonitrila 50% (v/v) com 0.1% (v/v) de ácido trifluoroacético] e aplicadas à placa de MALDI (MTP 384 target plate, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Após as amostras secarem completamente em temperatura ambiente, a placa foi inserida no equipamento MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics) e análises de espectrometria de massas realizada de modo automatizado utilizando o software FlexControl 3.3, conforme o protocolo reportado por Rossi e colaboradores (2017). Os espectros de fragmentação foram analisados através do software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics) e a identificação da proteína realizada pelo método Peptide Mass Fingerprint (PMF) com a utilização da ferramenta MASCOT 2.4.00 (Matrix Science, Boston, MA) utilizando a base de dados obtida do website UniProt Knowledgebase [entrada UniProtKB - P69697 (TAT\_HV1B1)]. Os parâmetros utilizados para a identificação da proteína foram a oxidação da metionina a carbamidometilação

da cisteína como modificações variável e fixa, respectivamente; peptídeos trípticos com ausência de um único fragmento; tolerância de erro entre 100–200 ppm; carga do peptídeo 1 H<sup>+</sup>. A validação da identificação de TAT recombinante utilizou o score global do *software* MASCOT correspondente à significância estatística de  $p < 0,05$ .

#### 4.3 CULTIVO CELULAR E ESTIMULAÇÃO COM TAT RECOMBINANTE

Os procedimentos experimentais realizados neste estudo utilizaram a linhagem BV-2 (Banco de Células do Rio de Janeiro, Cat. #0356) como modelo microglial, cultivadas conforme instruções do fornecedor. Essa é uma linhagem murina capaz de expressar a maioria dos genes pró-inflamatórios e níveis semelhantes de citocinas inflamatórias quando estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) e comparadas a culturas microgliais de tecido provenientes de humanos, de onde pode-se inferir ser uma boa alternativa para estudos *in vitro*, utilizada amplamente (HENN et al., 2009). As células foram mantidas em garrafas de 25 cm<sup>3</sup> em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma-Aldrich) adicionado de 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab) e 1% de solução 100 U/mL penicillina/estreptomicina - 0.125µg/mL anfotericina B (PSA, Sigma-Aldrich), com aclimação a 37° C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Para a realização dos ensaios, células foram semeadas em placas de cultura de 12 poços em densidade inicial de 0,5x10<sup>6</sup> células por poço e incubadas durante a noite para aderência celular nas condições de meio e aclimação já descritas.

Como controle negativo nos experimentos utilizou-se cultura celular sem estímulo e também cultura celular com adição de proteína TAT purificada inativada por calor (85°C por 45 minutos), uma vez que a temperatura é um agente desnaturante e essa perde sua função biológica, enquanto que endotoxinas são resistentes à temperatura. Para controle positivo de todos os experimentos, células foram estimuladas com LPS (*E. coli* O55:B5, Sigma-Aldrich, 1 µg/mL)

#### 4.4 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO

A dosagem de óxido nítrico (NO) seguiu o método de Griess. Para tanto, células foram estimuladas com a proteína TAT por 48h e então, 100 µL de sobrenadantes de cada condição experimental foram transferidos para placas de 96 cavidades com adição de 100 µL do reagente de Griess, [naftiletildenodiamino 0,1% (p/v) em ácido orto-fosfórico 5% (v/v) e sulfonamina p-aminobenzeno 1% (p/v) em ácido fosfórico 5% (v/v, Sigma-Aldrich), na proporção 1:1, misturadas imediatamente antes do uso]. As placas foram incubadas em temperatura ambiente



ao abrigo da luz por aproximadamente 10 minutos seguido da leitura da absorbância em 540 nm (Multileitora SpectraMax Paradigm). As concentrações de NO foram estimadas por regressão linear utilizando-se uma curva padrão de NaNO<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) solubilizado em meio DMEM.

#### 4.5 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR

Os níveis de apoptose de células BV-2 em diferentes condições experimentais foram avaliados através do FITC *Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD* (Biolegend, Cat. # 640922) conforme instruções do fabricante. Células foram submetidas à digestão por Tripsina 0,05% (Cultilab) por 3 minutos a 37° C, seguindo-se a inativação com a adição de SFB (3:1). O volume dos poços foi distribuído em tubos de citometria 12x75 mm e centrifugado a 350 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso em Annexin V Binding Buffer [10 mM Hepes (pH 7,4), 140 mM NaCl, 25 mM CaCl<sub>2</sub>] em concentração celular aproximada de 2,5 x10<sup>6</sup> células/mL. O procedimento foi repetido e o precipitado resultante suspenso em 100 µL de *Annexin V Binding Buffer*. Logo após, as amostras foram incubadas com 5 µL das soluções FITC (isotiocianato de fluoresceína) Annexin V e 7-AAD (7-Aminoactinomicina D) por 15 minutos à temperatura ambiente na ausência de luz. Ao final, 400 µL de *Annexin V Binding Buffer* foram adicionados a cada tubo e as células foram então adquiridas em Citômetro de Fluxo (BD FACSCanto II) após calibração e compensação fluorométrica do aparelho. As análises foram realizadas através do software *FlowJo-VX*, sendo consideradas em processo de apoptose as populações celulares presentes nos quadrantes inferior direito e superior direito em relação ao *gate* determinado.

A atividade metabólica de células viáveis foi ainda avaliada pelo método originalmente proposto por Mosmann (1983), adaptado para este trabalho. Para cada poço, foram adicionados 500 µL de solução MTT (3-[4,5-dimetiazol-2il]-2,5-difenil brometo de tetrazólio, 5mg/mL, Sigma) diluídos em DMEM estéril. Em seguida, células foram incubadas durante 4 horas a 37° C em 5% de CO<sub>2</sub>. Ao término da incubação, células foram centrifugadas a 300 x g durante 5 minutos e sobrenadantes removidos. A cada poço foi adicionado 1 mL de DMSO (dimetilsufóxido, Merck), sendo o conteúdo completamente misturado durante 10 minutos a temperatura ambiente em agitador orbital. A absorbância foi mensurada a 540 nm em espectrofotômetro (Multileitora SpectraMax Paradigm), e os dados obtidos expressos como porcentagens calculadas em relação às células sem tratamento.

#### 4.6 ANÁLISE DE SECREÇÃO DE CITOCINAS POR *CITOMETRIC BEAD ARRAY* - CBA

Os níveis de secreção de moléculas de resposta de ativação pós-estimulação foram analisados através da metodologia de dosagem CBA por meio do *CBA Mouse Inflammation kit* (BD Pharmingen, Cat. #552364), conforme instruções do fabricante. De forma resumida, sobrenadantes das células estimuladas conforme descrito na seção 4.2 foram coletados incubados previamente com microesferas revestidas com anticorpos específicos contra TNF- $\alpha$ , IL-6 e MCP-1 seguido da adição de anticorpos de detecção conjugados ao fluorocromo ficoeritrina (PE) e aquisição em citômetro de fluxo (FACS Canto II®, BD Pharmingen) após calibração e compensação fluorocromática do aparelho. Análises de intensidade de fluorescência, quantificação e demais parâmetros foram realizadas através do *FCAP Array™ Software* v. 3.0 (BD Pharmingen).

#### 4.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE CELULAR

Para determinar o padrão fenotípico das células BV-2 após estimulação com TAT, células foram submetidas à digestão por Tripsina 0,05% (Cultilab) durante 3 minutos em temperatura de 37°C. A reação foi inativada adicionando-se o Tripsina (0,05%, 3:1). O volume dos poços foi distribuído em tubos de citometria 12x75 mm e centrifugado a 350 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso em 1 mL de tampão FACS [1% BSA, 0,01% azida sódica em *Phosphate Saline Buffer* 1x (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4)]. O procedimento foi repetido e o precipitado resultante suspenso em 100  $\mu$ L de tampão FACS. Logo após, as amostras foram incubadas com os anticorpos PE anti-*mouse* CD206 (Biolegend, Cat. #141705, 0,5  $\mu$ g/10<sup>6</sup> células) e FITC (isotiocianato de fluoresceína) anti-*mouse* CD16/32 (Biolegend, Cat. #101305, 1  $\mu$ g/10<sup>6</sup> células) por 40 minutos a 4° C, seguido de lavagem com 1 mL de tampão FACS e centrifugação a 350 x g por 5 minutos a 4 °C. Ao final, as células foram suspensas em 200  $\mu$ L de tampão FACS e adquiridas em citômetro de fluxo (BD FACSCanto II) após calibração e compensação fluorocromática do aparelho. As análises foram realizadas através do software *FlowJo-VX*.

#### 4.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DA POLARIZAÇÃO MICROGLIAL E DO EIXO PERK DA VIA UPR

Após estimulação com TAT, células foram submetidas à digestão por Tripsina e o volume dos poços distribuído em microtubos estéreis livres de nucleases e centrifugados a 350 x g por 5 minutos. O precipitado celular resultante foi utilizado para extração do RNA total por

meio do *RNeasy Mini kit* (Qiagen) conforme instruções do fabricante. A cada microtubo foi adicionado 600  $\mu\text{L}$  do Buffer RLT fornecido pelo *kit* acrescido de 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol, sendo o precipitado homogeneizado através de aspiração por seringa e agulha *gauge* 20 (0.9 mm). Aos lisados celulares foi adicionado 1 volume de etanol 70% (Invitrogen, Applied Biosystems) e, após homogeneização por micropipeta, o volume dos microtubos foi transferido para colunas de purificação e centrifugados a 8.000 x g por 15 segundos em temperatura ambiente. O volume coletado foi desprezado e a cada coluna foi adicionado 700  $\mu\text{l}$  do Tampão RW1, com sequente centrifugação a 8.000 x g por 15 segundos. Em seguida, cada coluna foi submetida a nova etapa de lavagem com Tampão RPE, acrescido de etanol 96% (Invitrogen, Applied Biosystems), com centrifugação a 8.000 x g por 15 segundos. Ao fim das etapas de lavagem a coluna foi centrifugada novamente a 8.000 x g por 2 minutos a fim de evitar eventuais contaminações. A eluição do RNA total foi realizada através da adição de 50  $\mu\text{l}$  de água livre de nucleases à coluna seguida da centrifugação a 8.000 x g por 2 minutos em temperatura ambiente.

Em sequência à extração, uma etapa adicional de purificação foi realizada através do *kit DNase I Amplification Grade* (Invitrogen, Applied Biosystems). Para tanto, 5  $\mu\text{l}$  de 10x DNase I *reaction buffer* e 1  $\mu\text{l}$  de DNase I *Amp Grade* 1 U/ $\mu\text{l}$  foram adicionados às amostras de RNA. Amostras então foram mantidas por 15 minutos à temperatura ambiente seguido da adição de 5  $\mu\text{l}$  de solução de EDTA 25 mM e incubação a 65°C por 10 minutos. Ao final do protocolo, as amostras de RNA foram quantificadas em espectrofotômetro e armazenadas a -80° C.

A síntese do cDNA foi realizada por meio do *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific) conforme o protocolo do fabricante. As amostras foram processadas simultaneamente e as reações foram realizadas a partir da concentração fixa de 0,5  $\mu\text{g}$  de RNA total. A cada microtubo foram adicionados o volume correspondente à concentração determinada de RNA, seguido da adição do *RT Mastermix* composto de 10x RT *Buffer*, 25x dNTP Mix (100 mM), 10x RT *Random Primers* e *MultiScribe Reverse Transcriptase*, com o volume final da reação ajustado em 20  $\mu\text{L}$  com água livre de nucleases. As reações de transcriptase reversa foram realizadas em termociclador (Mastercycle Gradient, Eppendorf) nas seguintes temperaturas: 25° C por 10 minutos, seguido de 37°C durante 120 minutos e término em 85° C por 5 minutos.

Por fim, as análises de expressão transcricional foram realizadas utilizando a técnica de qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*). As reações foram realizadas com a adição de 7,5  $\mu\text{L}$  de FastSYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1:1 de cDNA (1:2), 0,3

$\mu$ M de cada iniciador e água livre de nucleases em volume final de 15  $\mu$ l por poço em placas de 96 cavidades. Os iniciadores para genes de referência e marcadores de polarização fenotípica foram sintetizados pela empresa Integrated DNA Technologies (IDT, Inc., Iowa, USA) nas sequências apresentadas no Quadro 1.

Gene	Sequência (5' – 3')	Referência
ATF4	<i>Fw.</i> TGAGGCTCTGAAAGAGAAGGCAGA <i>Rv.</i> AGCACAAAGCACCTGACTACCCTA	(JUKNAT et al., 2012)
Arg-1	<i>Fw.</i> CACAGTCTGGCAGTTGGAAG <i>Rv.</i> GGGAGTGTGATGTCAGTGTG	(CHAKRABORTY et al., 2015)
BiP	<i>Fw.</i> GCTTCGTGTCTCCTCCTGAC <i>Rv.</i> TAGGAGTCCAGCAACAGGCT	(SOWERS et al., 2018)
CHOP	<i>Fw.</i> AGCGACAGAGCCAGAATAAC <i>Rv.</i> CAGGTTCTGCTTTCAGGTGTGG	**
GADD34	<i>Fw.</i> AGGACCCCAGATTCTCTA <i>Rv.</i> AGGTAGGGACCCAGCTTCTC	(ITO et al., 2015)
HPRT	<i>Fw.</i> TTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG <i>Rv.</i> GATTCAACTTGCCTCATCTTAGGC	(DOS SANTOS et al., 2018)
XBP-1s	<i>Fw.</i> ACACGCTTGGGAATGGACAC <i>Rv.</i> CCATGGGAAGATGTTCTGGG	(KIM et al., 2016)
XBP1-u	<i>Fw.</i> TCCGCAGCACTCAGACTATGT <i>Rv.</i> ATGCCCAAAGGATATCAGACTC	(TSUCHIYA et al., 2018)

**Quadro 1.** Sequência dos iniciadores utilizados para análise transcricional de marcadores da polarização microglial M1/M2 e de moléculas da via UPR. \* *Hypoxanthine phosphoribosyltransferase*, gene utilizado como referência endógena de expressão. \*\* iniciadores desenvolvidos para o presente trabalho.

As reações foram realizadas no termociclador *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 95° C por 10 segundos seguido de 40 ciclos de desnaturação em 95°C por 15 segundos e hibridização/extensão a 60°C por 1 minuto. A especificidade das reações foi confirmada pela análise de curvas de dissociação (60-95° C, 0,3° C/s), realizada após as etapas de amplificação. Análises de eficiência dos iniciadores utilizados foram realizadas por meio da construção de curva de diluição seriada a partir de uma mistura de amostras de cDNA e calculada utilizando o valor de inclinação da reta. Os resultados obtidos foram analisados por uso do programa *StepOnePlus Software v.2.3* e os níveis de expressão relativa calculados por meio do método de Pfaffl (2004).

#### 4.9 INIBIÇÃO DO EIXO PERK DA VIA UPR

Os ensaios para a análise do envolvimento das respostas de estresse do RE na ativação microglial induzida por TAT empregaram o inibidor farmacológico específico para PERK (GSK2606414, Calbiochem, Cat. #1337531-89-1). GSK2606414 foi adicionado em cultura em concentrações e condições experimentais padronizadas e diluído em solvente apropriado, aliquotado e congelado conforme instruções do fabricante.

#### 4.10 ANALISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos foram tabulados e sumarizados por meio de medidas de estatística descritiva. A significância estatística foi avaliada pelo teste t de Student para a análise entre dois grupos e a múltipla análise entre variáveis foi realizada por meio do método ANOVA de uma via, considerando  $P \leq 0,05$ .

### **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### 5.1 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE TAT E PURIFICAÇÃO

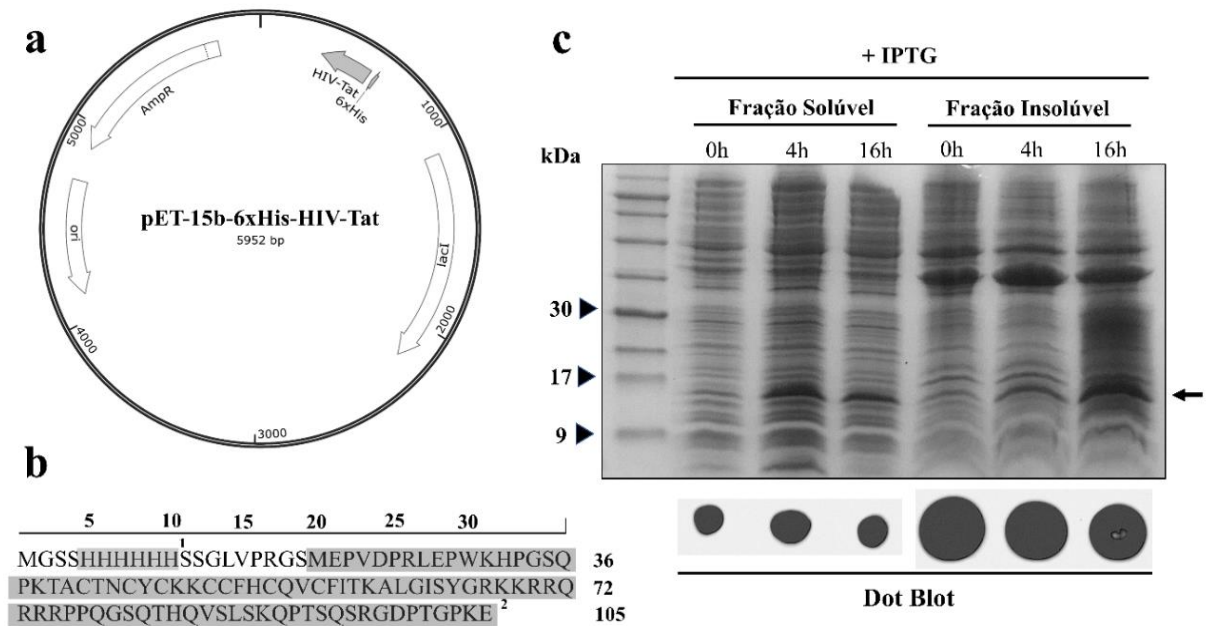
Verificando o perfil de expressão em gel de poliacrilamida após indução com IPTG de ambas as frações, solúvel e insolúvel (Figura 3, c), é possível observar bandas correspondentes ao peso molecular de TAT (11,4 kDa) nos tempos de 0, 4 e 16 horas. O mesmo resultado pode ser verificado pela realização de Dot blot, no qual buscou-se proteína de interesse por meio de marcação com anticorpo anti-His. A proteína TAT recombinante pode ser observada em todos os tempos em ambas as frações extraídas das bactérias transformadas, confirmando a expressão de TAT recombinante. O tempo escolhido foi de 16 horas pós-indução de expressão para

maximizar

a

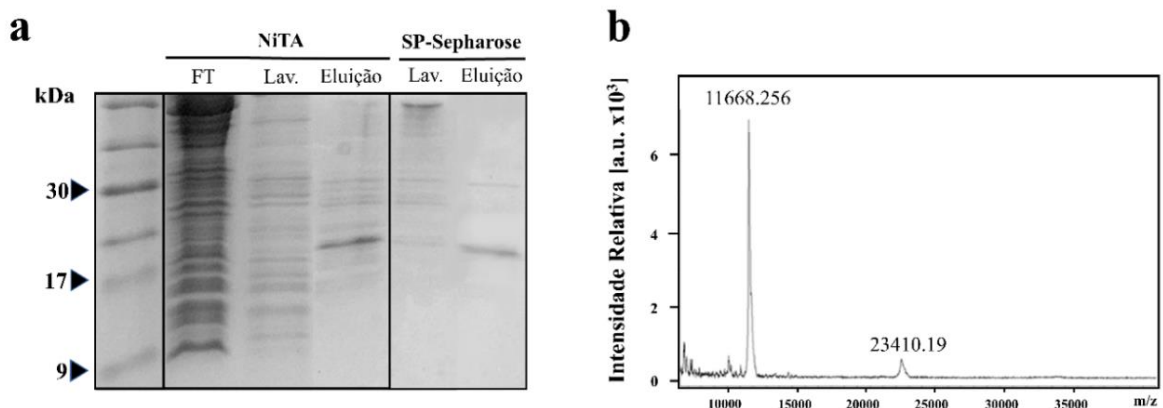
quantidade

produzida.



**Figura 3.** Sistema de expressão procariota de TAT baseado no vetor pET-15b. **a.** Representação gráfica do plasmídeo pET-15b-6xHis-HIV-TAT codante para TAT recombinante (Genone). **b.** Representação do produto gênico do inserto clonado em pET-15b indicando o motivo peptídico de afinidade 6xHis1 e a sequência teórica de TAT HXB22. **c.** Perfil de expressão proteica em gel de poliacrilamida e identificação imunocromatográfica do epítipo 6xHis por Dot Blot das frações solúvel e insolúvel de *E. Coli* BL21(DE3) transformadas com pET-15b-6xHis-HIV-TAT em 0, 4 e 16 horas após indução com IPTG.

Prosseguiu-se assim para a etapa de purificação da proteína de interesse. A primeira etapa foi realizada em coluna de níquel (Ni-NTA) e em seguida por uma coluna de troca catiônica (SP-Sepharose) e resolvida em gel SDS PAGE 16%, cuja observação pode ser feita na Figura 4 a.



**Figura 4.** Purificação de TAT expressa em *E.coli* BL21(DE3). **a.** Purificação da fração solúvel da proteína TAT recombinante realizada com coluna NiNTA, seguida de purificação da eluição em coluna SP-Sepharose com resolução em gel SDS-PAGE 16%. **b.** Espectro de massa (MALDI-TOF) de fração eluída de coluna SP-Sepharose, apresentando os picos correspondentes à forma monomérica e dimérica de TAT recombinante.

A cepa *E. coli* BL21(DE3) destaca-se como sendo proeminente em aplicações de expressão de proteínas recombinantes por ser amplamente conhecida, de boa relação custo/benefício, e aliado ao vetor de expressão pET-15b, apresentam um sistema sólido de expressão de proteínas recombinantes (GRÄSLUND et al., 2008; SØRENSEN; MORTENSEN, 2005).

No presente trabalho, a expressão da proteína TAT recombinante em 16h foi confirmada pela resolução das proteínas em gel SDS-PAGE 16% através da detecção de bandas correspondentes à altura da proteína TAT (11,4 kDa). Em adição à essa técnica de confirmação da produção de TAT recombinante por meio da visualização de bandas, buscou-se também confirmar qualitativamente por meio da técnica de dot-blot, a qual se assemelha à técnica de *Western blot* por utilização de anticorpos na busca por proteínas, garantindo especificidade no resultado (STOTT, 1989). Optou-se por realizar a purificação da fração solúvel, proveniente do lisado bacteriano, pois a presença de agregados proteicos presente no citoplasma ou periplasma bacteriano que formam as frações insolúveis têm função biológica comprometida, conforme reportado por Siddappa e colaboradores (2006).

Uma limitação ao purificar proteínas recombinantes em *E. coli* é a copurificação de lipopolissacarídeo (LPS), um constituinte da membrana de bactérias Gram-negativas. LPS é caracterizado como um PAMP (*Pathogen-associated molecular pattern*) e potente ativador de macrófagos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Visando não comprometer o presente estudo, incluiu-se no tampão de lavagem A Triton X-100 2%, que possui a função de interagir com o componente lipídico A da endotoxina por meio de suas micelas e assim separar-se da fase aquosa enquanto TAT está ligada à coluna (SIDDAPPA et al., 2006). A eluição final da coluna de afinidade por níquel é realizada com Tampão B, que contém 1 M de imidazol e compete pela afinidade ao níquel da coluna. As etapas de purificação da coluna de Ni-NTA (Figura 4, a) foram resolvidas em gel SDS-PAGE 16% e na faixa de eluição final pode-se observar uma banda correspondente ao peso molecular da proteína TAT (~11,4 kDa) e demais bandas, sendo necessária uma segunda etapa de purificação, resultado semelhante encontrado por Siddappa e colaboradores (2006).

A segunda etapa foi realizada utilizando uma coluna de troca de íons (SP-Sepharose), que se fundamenta na diferença de ponto isoelétrico das proteínas para separá-las via pH ou força iônica (CUMMINS; DOWNLING; O'CONNOR, 2010). O ponto isoelétrico da sequência de TAT empregada no vetor de expressão foi calculado utilizando a ferramenta Peptstats (MADEIRA et al., 2019) e foi calculado em 10,4, enquanto que a maioria dos pontos

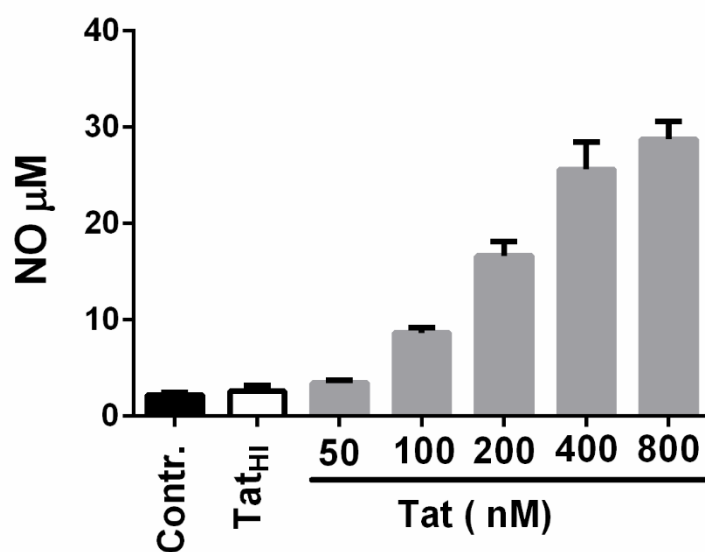
isoeletricos das proteínas de *E. coli* está abaixo de 6 (LINK; ROBISON; CHURCH, 1997). A resolução em gel da lavagem e da eluição da coluna de troca catiônica (Figura 4, a) revelou bandas correspondentes ao peso molecular da proteína TAT e, no eluído final, outra banda de peso molecular de aproximadamente 23 kDa, que se infere ser TAT em sua forma dimérica, segundo resultados semelhantes encontrados por Siddappa e colaboradores (2006).

Como estratégia de caracterização da proteína purificada, empregou-se a técnica de MALDI-TOF, revelada na Figura 4 b. Observou-se um pico de intensidade de 11,668 e outro, de intensidade menor de tamanho 23,410, caracterizados como a proteína TAT recombinante e sua forma dimérica, em alto grau de pureza, demonstrando a eficácia da estratégia de purificação empregada, assim como descrito por Siddappa e colaboradores (2006), embora os picos de massa encontrados sejam diferentes por utilização de diferentes cepas do vírus na expressão da proteína. O rendimento final calculado para 16 horas de indução foi de 580 ug/L, e assim pôde-se prosseguir para as etapas posteriores do presente estudo.

## 5.2 TAT MODULA A SECREÇÃO DE MARCADORES INFLAMOGÊNICOS DE FORMA TEMPO-DEPENDENTE

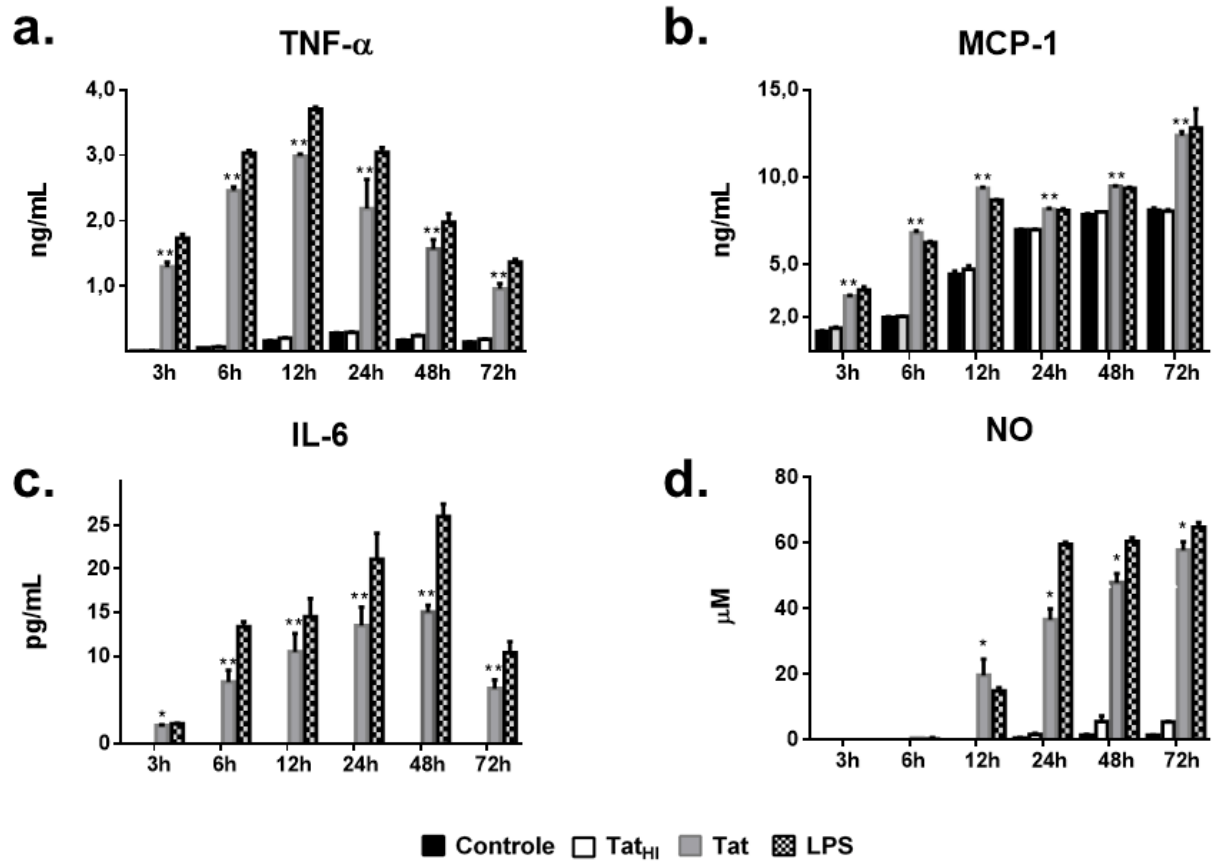
Para explorar a relação dose/resposta que a proteína é capaz de induzir, avaliou-se a quantidade de NO secretada pelas células em 48h por meio de reagente de Griess utilizando concentrações crescentes de TAT (Figura 5). Assim, demonstrou-se que a proteína é internalizada e desencadeia mecanismos intracelulares envolvidos na produção de óxido nítrico e dessa forma, padronizou-se a concentração de TAT em 400 nM para os ensaios seguintes.





**Figura 5.** Secreção de óxido nítrico em células microgliais estimuladas com diferentes concentrações de TAT recombinante após 48h, avaliada por reagente de Griess. Contr.: células sem tratamento, TAT<sub>HI</sub>: TAT desnaturada a 85°C por 45 minutos.

Para os próximos ensaios, as células foram estimuladas por 3, 6, 12, 24, 48 e 72h para diferentes condições e analisadas posteriormente para diferentes parâmetros. Os marcadores de ativação microglial M1 TNF- $\alpha$ , MCP-1 e IL-6 foram avaliados por meio de dosagem CBA e a dosagem de óxido nítrico (NO) foi realizada por utilização do reagente de Griess, com sobrenadantes dos poços coletados nos tempos de 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após estímulo, apresentados na Figura 6.



**Figura 6.** Níveis de secreção das moléculas de resposta de ativação microglial analisados 3, 6, 12, 24, 48 e 72h pós-estimulação com 400nM de proteína TAT recombinante do HIV-1. **a.** TNF- $\alpha$  **b.** MCP-1. **c.** IL-6. **d.** NO. O controle positivo foi realizado com 1 $\mu$ g/mL de lipopolissacarídeo (LPS). TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-6 foram analisadas por meio da técnica de dosagem de CBA (*Cytometric Bead Array*) e os níveis de NO foram avaliados conforme protocolo adaptado para Teste de Griess. A significância estatística é representada por \* e \*\*, p<0,05 e p<0,01 respectivamente. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Foram detectados níveis significativos de NO apenas em 12h quando BV-2 foram estimuladas com TAT, com níveis crescentes nos seguintes tempos avaliados, acompanhando o controle positivo LPS, conforme observa-se na Figura 6 d. Óxido nítrico é um gás difundível pela membrana plasmática com diversas funções: no sistema nervoso age como neurotransmissor importante em longos potenciais de ação, no sistema imune está relacionado à destruição de patógenos pela criação de um ambiente tóxico (BISHOP; ANDERSON, 2005). Em excesso, NO produzido pela micróglia é um dos contribuintes da neurotoxicidade em inflamações agudas e crônicas (LIU; GAO; HONG, 2003). Há evidência de que níveis em micromolar de NO gerados durante uma resposta imune podem levar a danos na respiração celular pela interação com a enzima citocromo oxidase (BROWN, 2007). A capacidade de induzir a produção de NO é bem reportada na literatura científica, com dano ao SNC

indiretamente pela indução de apoptose em astrócitos e toxicidade causada por micróglia (BRUCE-KELLER et al., 2001; POLAZZI; LEVI; MINGHETTI, 1999; PUGLIESE et al., 2005).

O pico de produção de TNF- $\alpha$  com estímulo de TAT foi detectado em 12 horas, e aqui, valores semelhantes para LPS foram encontrados, com pico de produção também em 12 horas, decrescendo até 72 horas. Assim, pode-se inferir que a produção de TNF- $\alpha$  pelo modelo microglial escolhido tende a ocorrer apenas no início de um estímulo, reforçando os dados encontrados de que a micróglia é a primeira linha de defesa e fonte de citocinas no SNC (LIU; GAO; HONG, 2003; RAO; RUIZ; PRASAD, 2014). TNF- $\alpha$  é uma citocina sinalizadora que liga-se em receptores extracelulares e resulta na ativação de fatores de transcrição de genes envolvidos na produção de mediadores inflamatórios e também na ativação de cascata apoptótica, destacando-se como uma molécula-chave na neurotoxicidade, podendo levar à perda de neurônios (COLTON; WILCOCK, 2010). No estudo de Jin e colaboradores (2012), a ativação microglial por estímulo de TAT foi determinada por níveis de TNF- $\alpha$  mensurados em 12h. Em um estudo *in vivo* analisando cérebros de pacientes com aids, 5 de 7 apresentaram níveis elevados de TNF- $\alpha$  (TYOR et al., 1992). Utilizando também um modelo microglial *in vitro*, Bruce-Keller e colaboradores (2001) demonstraram aumento na produção de TNF- $\alpha$  quando estimuladas com 50 e 100 nM de TAT, e níveis maiores não significativos 200 nM em 18 horas pós-estímulo, sugerindo que altas concentrações de TAT induzem apenas moderada ativação microglial, mas ainda capazes de causar neurotoxicidade pela produção radicais livres ao longo do tempo. No entanto, não foram avaliadas concentrações superiores a 200 nM e tempos posteriores a 24h. Acredita-se que a produção de TNF- $\alpha$  induzida por TAT em macrófagos e em monócitos seja dependente das vias de sinalização envolvendo o fator de transcrição NF- $\kappa$ B (HERBEIN et al., 2010; PUGLIESE et al., 2005), e dada a origem e funcionalidades semelhantes entre micróglia e macrófagos, pode-se inferir que também esteja envolvido na micróglia. Ainda, o estudo de Fine e colaboradores (1996) mostrou que a liberação de TNF- $\alpha$  em doses não neurotóxicas pode inibir a captação de glutamato por astrócitos, deixando neurônios mais suscetíveis à injúria pela presença de glutamato extracelular. No contexto sistêmico, TNF- $\alpha$  pode agir sinergicamente com TAT e outras proteínas da inflamação para aumentar a produção de proteínas inflamatórias (BAGASHEV; SAWAYA, 2013; RAO; RUIZ; PRASAD, 2014).

A quimiocina MCP-1 apresentou níveis detectáveis em 3h pós estímulo, crescente atingindo o maior valor detectado em 72h, conforme observa-se na Figura 6 b. Quando estimuladas com

TAT, observa-se diferença significativa em sua secreção, corroborando dados encontrados por El-Hage e colaboradores (2005). Níveis de MCP-1 também podem ser observados nos controles negativos porque, segundo Deshmane e colaboradores (2009), esta quimiocina também é secretada constitutivamente.

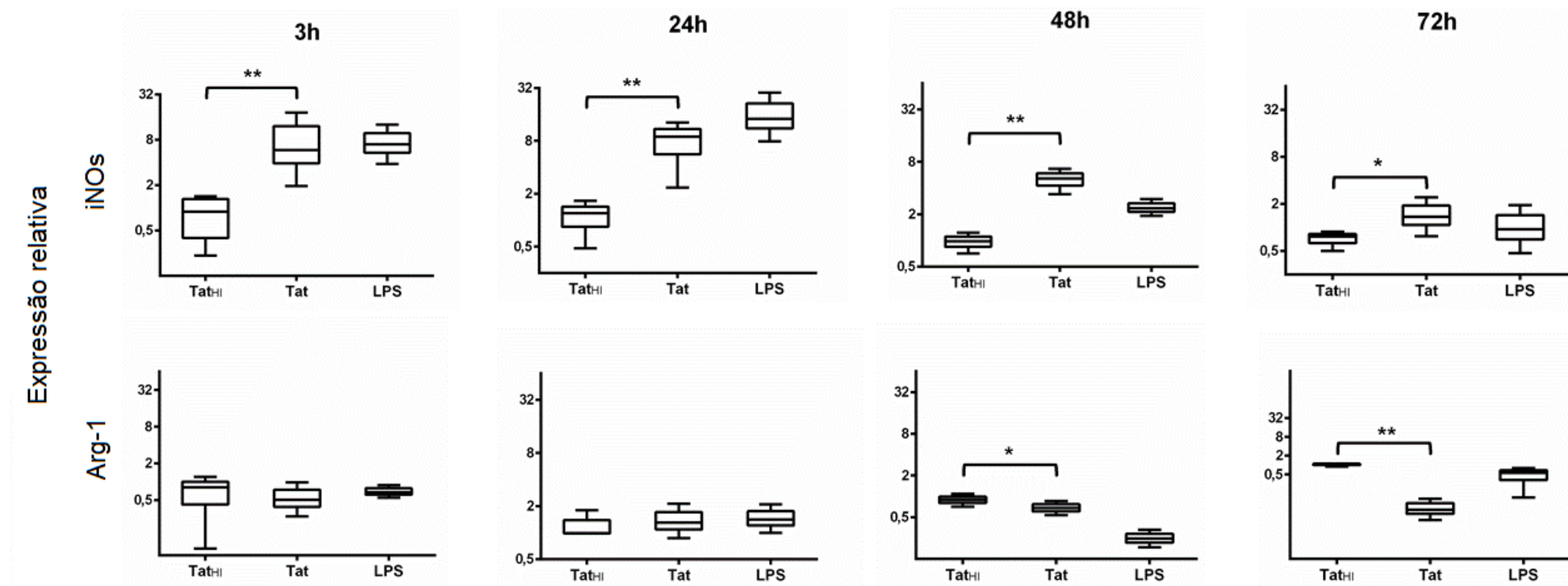
Durante a infecção por HIV-1, MCP-1 contribui para a chegada dessas células infectadas no SNC e também causa alterações na expressão de moléculas de adesão celular, alterando a permeabilidade da barreira hematoencefálica, detectados pelos altos níveis desta proteína encontrados no líquido cefalorraquidiano de pacientes HIV-1, dando suporte à hipótese de que a infecção provocada no SNC pelo vírus é mantida pela sua replicação em células monocíticas com a contribuição de MCP-1 no recrutamento das células (DESHMANE et al., 2009; DHILLON et al., 2008). Sugere-se também um papel de neuroproteção para MCP-1 pela intervenção na apoptose em células tratadas com TAT pela ativação de cascatas de sinalização de sobrevivência, demonstrando o papel pleiotrópico desta quimiocina (EUGENIN et al., 2006). Em um estudo com micróglia fetal humana, a proteína TAT também foi capaz de induzir a produção de MCP-1 e foram observadas alterações no citoesqueleto microglial para facilitar sua migração (EUGENIN et al., 2005). Ademais a investigação de Park e colaboradores (2001) sugere que a indução de MCP-1 por TAT envolva a via de sinalização de PKC (*Protein Kinase C*), bem como NF- $\kappa$ B (HERBEIN et al., 2010). Em análises do tecido cerebral de pacientes com doença de Alzheimer, Sokolova e colaboradores (2009) também encontraram altos níveis de MCP-1 e também níveis nos controles, sugerindo que em níveis regulatórios, a proteína pode ter um papel de reparo enquanto que em níveis crônicos pode causar neurodegeneração e ser importante no desenvolvimento da doença de Alzheimer.

Os níveis de IL-6 também são detectáveis nas primeiras 3h pós-estímulo com TAT com níveis crescentes, mas divergindo do controle positivo LPS (Figura 6, c). Esta citocina é envolvida com a fase aguda inflamatória, promovendo a síntese de mediadores inflamatórios, como a diferenciação de células  $T_{naive}$  em células  $T_{h17}$ , mas possui um papel pleiotrópico no sistema imune, sendo capaz de ativar os fatores de transcrição STAT1, envolvido na polarização M1, podendo atuar em conjunto a outras proteínas formando complexos (KIMURA; KISHIMOTO, 2010; LOCATI; MANTOVANI; SICA, 2013). Em astrócitos, TAT é capaz de induzir a produção de IL-6, também mediada por NF- $\kappa$ B, além de outro fator de transcrição, AP-1 (NOOKALA; KUMAR, 2014). No presente estudo, acredita-se que a expressão de IL-6 esteja relacionada a um fenótipo microglial clássico, em conjunto com as outras moléculas induzidas por TAT. Dessa forma, os dados reunidos e apresentados até aqui estão em acordo

com a literatura, demonstrando que quando estimuladas com TAT, a micróglia é responsiva nas primeiras horas, secretando os fatores que são chave no processo neuroinflamatório e estes contribuirão, por sua vez, na neurodegeneração observada nas HAND (DHEEN; KAUR; LING, 2007; KEMPURAJ et al., 2016; VARGAS et al., 2005).

### 5.3 TAT MODULA A EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES DE ATIVAÇÃO MICROGLIAL

Orihuela e colaboradores (2016) afirmam que diferentes estados de polarização microglial envolvem diferentes estados metabólicos e bioenergéticos, através das diferentes atividades desenvolvidas pelas células nos seus estados polarizados. Assim, a enzima *iNOs* (*inducible Nitric Oxide synthase*) é responsável pela erupção de NO por micróglia e astrócitos em resposta a injúrias no SNC deslocando o metabolismo celular de L-arginina e criando um ambiente citotóxico, sendo sua expressão caracterizante do perfil M1 (BISHOP; ANDERSON, 2005). Sob o estado de polarização M2, o metabolismo de L-arginina é dirigido para a síntese de poliaminas para funções de reparo tecidual por Arginase-1, (*Arg-1*) e, portanto, a avaliação da expressão desses genes é um aspecto relevante na caracterização fenotípica microglial modulada por TAT. A expressão de *iNOs* e *Arg-1* em diferentes tempos após estimulação com TAT foi avaliada por meio da técnica RT-qPCR e os resultados estão dispostos na Figura 7. TAT levou a uma indução de *iNOs* em quantidades significativas já em 3h e nos demais tempos seguintes, apesar de apresentar decréscimo a partir de 48h, e TAT não levou a expressão de *Arg-1* em nenhum tempo avaliado (Figura 7). Os resultados encontrados de TAT se assemelham ao controle positivo LPS, o qual também apresentou aumento de 3 para 24h e decréscimo de 24 para 72h, e em concordância com os relatos na literatura de que há um deslocamento do metabolismo de L-arginina e assim, estes genes podem ser considerados antagonistas (RATH et al., 2014).

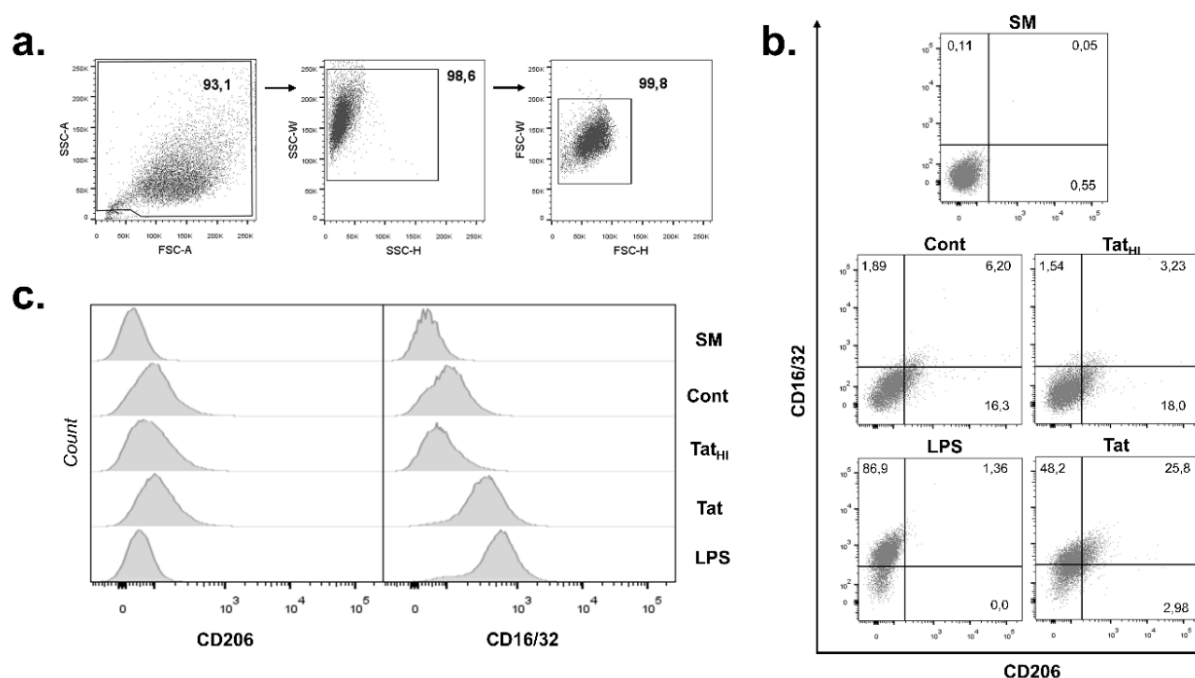


**Figura 7.** Expressão relativa dos genes iNOS e Arg-1 em células BV-2 ( $0,5 \times 10^6$ ) com TAT recombinante (400nM) avaliada em 3, 24, 48 e 72 horas pós-estímulo por uso da técnica RT-qPCR. Como controle positivo da estimulação utilizou-se de LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) e como controle negativo, TAT inativada por calor (TAT<sub>HI</sub>, 85°C durante 45 minutos, 400 nM). Os valores de significância estatística  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$  são representados por \* e \*\*, respectivamente. Resultado representativos de três experimentos independentes.

O papel suprarregulador de TAT sobre iNOs reportado aqui é amplamente conhecido na literatura científica (ADAMSON et al., 1999; HERBEIN et al., 2010; POLAZZI; LEVI; MINGHETTI, 1999). A indução da atividade de iNOs por TAT já foi reportada em cultura *in vitro* de astrócitos e culturas primárias de astrócitos humanos por Liu e colaboradores (2002), que destacam o dano que neurônios vizinhos podem ter em decorrência dessa liberação de NO, contribuindo para as HAND. Ainda, a grande produção de iNOs nos tempos detectados entra em acordo com os resultados encontrados para a secreção de NO discutidos previamente, já que uma vez produzida, iNOs é capaz de gerar grandes quantidades de NO detectáveis (RATH et al., 2014). O mediador NF- $\kappa$ B também parece ter um papel a desempenhar na transcrição de iNOS, em consenso com os dados discutidos anteriormente e na literatura científica de que este fator de transcrição tem papel fundamental no direcionamento celular para uma resposta que é inflamatória, auxiliando a síntese de mediadores inflamatórios (KIM et al., 2007). Assim, a secreção de NO discutida anteriormente pode ser confirmada aqui pela expressão da enzima responsável pela sua produção.

#### 5.4 TAT MODULA A EXPRESSÃO DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE CELULAR

Os receptores de superfície CD16/32 (Fc $\gamma$ RII/RIII) e CD206 são relatados como marcadores dos fenótipos M1 e M2, respectivamente, e utilizados na experimentação envolvendo a polarização de macrófagos e micróglia (ORIHUELA; MCPHERSON; HARRY, 2016; WU et al., 2018a). No presente estudo, células BV-2 foram estimuladas com TAT, LPS, TAT<sub>HI</sub> durante 48 horas e submetidas à marcação fluorométrica e adquiridas em citômetro de fluxo, conforme detalha a Figura 8.



**Figura 8.** Análise da expressão de CD16/32 e CD206 em células BV-2 por citometria de fluxo. **a.** Estratégia de *gates* utilizada, baseada na observação dos perfis de tamanho celular relativo (FSC) e granulosidade (SSC) para exclusão de *debris* celulares e *doublers*. **b.** Células BV-2 ( $0,5 \times 10^6$ ) foram tratadas com TAT (400 nM), TAT inativada por calor (TAT<sub>HI</sub>, 400 nM) ou LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 48 h e submetidas à marcação com anticorpos anti-CD16/32 e anti-CD206 conjugados à FITC e PE, respectivamente. **c.** Histogramas sobrepostos referentes à intensidade de fluorescência de células BV-2 após marcação com os anticorpos descritos. Cont: células não tratadas; SM: células sem marcação. Resultados representativos de três experimentos independentes.

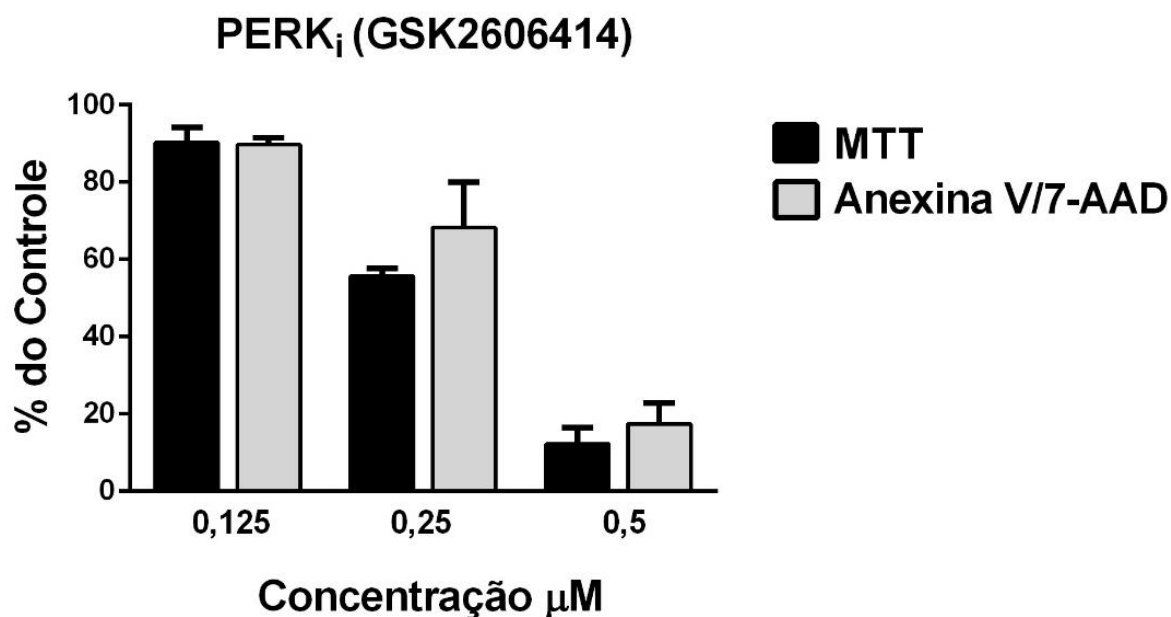
A estratégia de *gate* foi utilizada para selecionar o maior número de eventos possível, excluindo detritos e células duplicadas de acordo com parâmetros de área celular e volume (SSC-A) e granulosidade (FSC-A), representada na Figura 8 a. Observa-se que TAT induziu a expressão de CD16/32 nas células, evidenciada pela porcentagem de eventos positivos e medianas de intensidade de fluorescência (Figura 8, b, c). A diferença observada na expressão de LPS e TAT para CD16/32 pode estar relacionada a diferenças nas vias de sinalização intracelular envolvidas na ativação celular que estes indutores desencadeiam. Paralelamente, a presença do marcador CD206 não exibiu variação nos eventos analisados em TAT, em concordância com a indução observada por LPS. Ainda, a expressão de CD206 detectada em TAT<sub>HI</sub> e Controle Celular leva ao entendimento de que, em repouso, há alguma indução em direção ao fenótipo M2, visto que este pode facilitar a fagocitose de *debris* celulares e proteínas mal-dobradas e contribuir para uma homeostase do SNC (CHERRY; OLSCHOWKA; O'BANION, 2014; TANG; LE, 2015). Há evidência de que a expressão de CD16/32 facilite a infecção pelo HIV nas células, uma vez que este é um receptor fagocítico (FISCHER-SMITH et al., 2001; GRAZIANO; VICENZI; POLI, 2016). Desta forma, os dados observados até aqui



levam ao entendimento de que TAT modula a expressão de um fenótipo M1 nas células que difere do clássico ativador M1 microglial LPS, o que sugere uma interação intracelular de TAT multifacetada.

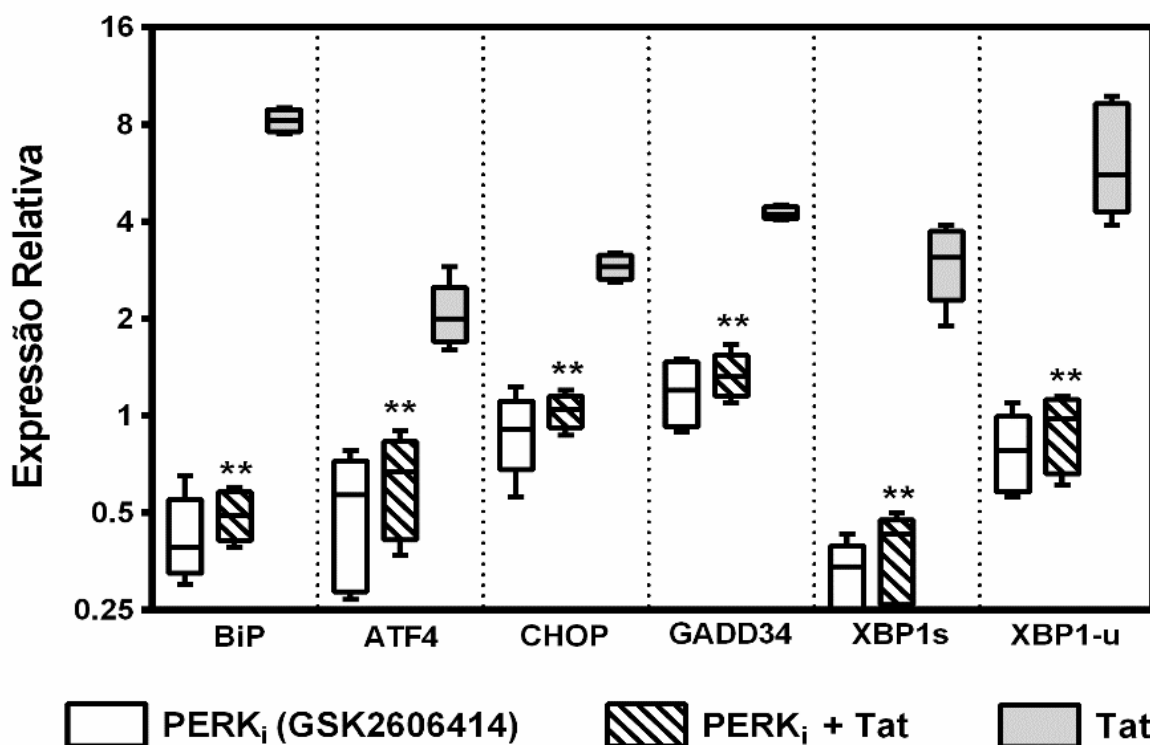
### 5.5 A MODULAÇÃO DO PERFIL M1 POR TAT ENVOLVE O EIXO PERK DA VIA UPR

Em resposta ao estresse no RE causado pelo acúmulo de proteínas que leva também ao mal-dobramento destas, o eixo PERK é deflagrado visando atenuar a tradução. Uma vez demonstrado no presente estudo e corroborado pela literatura científica que TAT leva as células microgliais a exibirem um perfil de ativação clássico, buscou-se investigar a potencial modulação do eixo PERK da via UPR na ativação microglial observada. Para isto, empregou-se o uso de o inibidor farmacológico de PERK GSK2606414, que dirige-se ao sítio ligante de ATP da proteína e é considerado um potente inibidor (MAHAMEED et al., 2019). Foi construída uma curva de concentração em 48h com valores utilizados em literatura (0,125 – 0,5  $\mu$ M) para determinar uma concentração não citotóxica (JIANG et al., 2017). A avaliação da morte celular nas concentrações de inibidor utilizadas foi realizada por ensaio MTT e citometria de fluxo utilizando os marcadores Anexina V/7-AAD. Anexina V liga-se a fosfatidilserina, um fosfolípido de membrana que em fases iniciais de apoptose é externalizado na membrana, e 7-AAD é um intercalante de DNA, portanto, só há marcação se houver permeabilidade na célula, o que indica fases finais de apoptose. O ensaio MTT baseia-se na conversão de sais de tetrazólio em cristais de formazan, refletindo a atividade mitocondrial das células. Os resultados estão mostrados na Figura 9. Pode-se observar que a concentração de 0,125  $\mu$ M foi a que levou a maior viabilidade nas 48h sob tratamento com o inibidor farmacológico, confirmado por ambas as técnicas utilizadas e em literatura (JIANG et al., 2017; MAHAMEED et al., 2019). Portanto, padronizou-se essa concentração para os próximos experimentos.



**Figura 9.** Perfil de viabilidade de células BV-2 após tratamento com o inibidor farmacológico do eixo PERK da via UPR. Células BV-2 ( $0,5 \times 10^6$ ) foram tratadas com concentrações crescentes de GSK2606414 (PERK<sub>i</sub>) por 48 h e a viabilidade celular em cada situação experimental avaliada por ensaio MTT e intensidade de fluorescência dos marcadores Anexina V/7-AAD por citometria de fluxo. Resultados representativos de três experimentos independentes e expressos como médias de porcentagens em relação ao controle celular sem tratamento  $\pm$  desvio-padrão.

A expressão de genes relacionados envolvidos no eixo PERK foi avaliada por meio de RT-qPCR em células microgлияis em 48h sob estímulo da proteína TAT recombinante com adição do inibidor do braço PERK estando os resultados dispostos na Figura 10. Observa-se que a concentração utilizada de GSK2606414 foi suficiente para inibir a expressão das moléculas BiP, ATF4, CHOP, GADD34 e XBP, envolvidas na cascata de sinalização deflagrada pela ativação de PERK, ao passo que TAT foi capaz de sobreexpressá-las. Na adição do inibidor sob estímulo de TAT houve supressão das moléculas, portanto, pode-se inferir que TAT modula o eixo PERK da via UPR em células microgлияis. Em linfócitos T, TAT modula a via UPR e contribui para levar às células a apoptose, ativando os três eixos de maneira tempo-dependente (CAMPESTRINI; SILVEIRA; PINTO, 2018). A modulação da via UPR pela proteína TAT do HIV-1 também foi reportada em astrócitos, onde observou-se altos níveis de BiP, XBP-1 e eIF2 $\alpha$  e em tecido cerebral *in vivo* de pacientes apresentando HAND (FAN; HE, 2016). Outro estudo relata a participação do eixo PERK em células endoteliais cerebrais quando estimuladas com TAT na apoptose celular (MA et al., 2016).

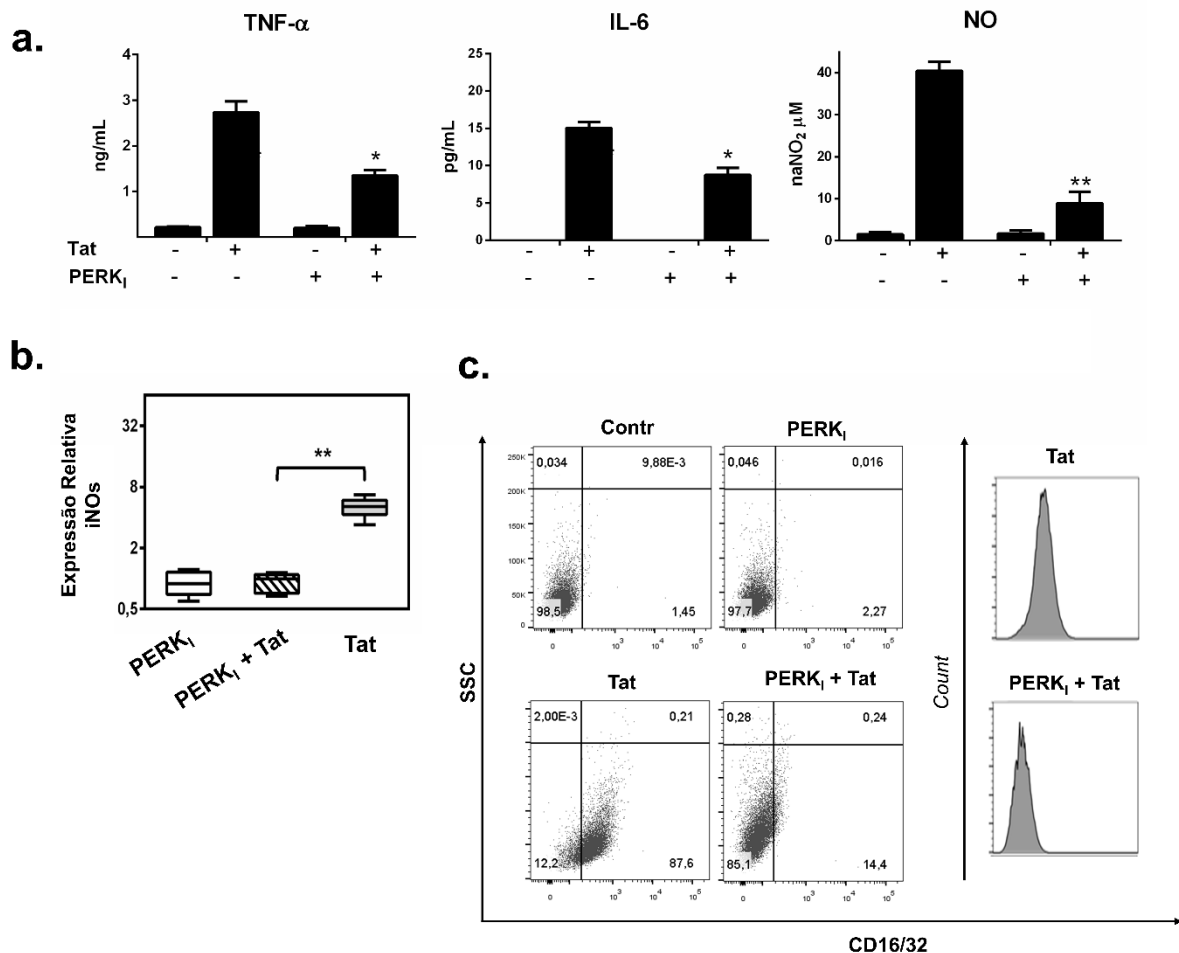


**Figura 10.** Efeito na expressão de componentes do inibidor do eixo PERK da via UPR induzida por TAT em células BV-2. Células BV-2 ( $0,5 \times 10^6$ ) foram tratadas com TAT (400 nM) na presença ou ausência do inibidor químico de PERK (PERK<sub>i</sub>, GSK2606414, 0,125  $\mu$ M). Os níveis de expressão gênica de moléculas relacionadas à via UPR foram analisados após 48h por RT-qPCR. Resultados representativos de três experimentos independentes e considerados estatisticamente relevantes em relação ao grupo celular tratado com TAT ( $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$ ).

A próxima etapa teve como objetivo por fim caracterizar a ativação microglial observada no presente trabalho em paralelo à atividade do eixo PERK da via UPR. Células BV-2 foram estimuladas com TAT e todos os marcadores encontrados no presente trabalho até aqui foram submetidos a avaliação quando na presença do inibidor de PERK em 48h. Resultados estão dispostos na Figura 11. As citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e NO tiveram sua secreção significativamente reduzida na presença de TAT com inibidor (Figura 11, a). Consoante com os níveis detectados da chaperona BiP na Figura 10, pode-se inferir que pela produção de diversas proteínas durante a ativação microglial induzida por TAT, a micróglia é responsiva à alta demanda de enovelamento proteico.

A participação da via UPR na ativação microglial clássica também pode ser salientada pela expressão de iNOs, que também foi suprimida quando PERK é inibido na presença de TAT (Figura 10, b). O estudo de Guo e colaboradores (2010) demonstra que XBP1 em sua forma processada (XBP1s) se liga ao promotor do gene iNOs *in vivo* e *in vitro*, aumentando sua expressão. Neste estudo, TAT levou à expressão de iNOs (Figura 7), e paralelamente, à expressão de XBP1 em sua forma processada e não-processada (Figura 10). Enfim, a expressão

do marcador CD16/32 também foi diminuída na presença do inibidor de PERK (Figura 11, c), demonstrada pela diminuição da quantidade de eventos positivos na população de células estimuladas com TAT e tratadas com GSK2606414. Assim, os resultados encontrados permitem levar a conclusão de que TAT modula o eixo PERK da via UPR durante a ativação microglial pró-inflamatória observada.



**Figura 11.** Efeito do inibidor do braço PERK da via UPR sobre a ativação induzida por TAT em células BV-2. **a.** Células BV-2 ( $0,5 \times 10^6$ ) foram tratadas com TAT (400 nM) na presença ou ausência do inibidor químico de PERK (PERK<sub>i</sub>, GSK2606414, 0,125  $\mu$ M) por 48h e sobrenadantes submetido à análise da expressão das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 por CBA e liberação de NO pelo método de Griess. **b.** Análise da expressão relativa de iNOS por RT-qPCR em células BV-2. Resultados considerados estatisticamente relevantes em relação ao controle tratado com TAT<sub>HI</sub> ( $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$ ). **c.** Células nas condições experimentais descritas foram marcadas com anticorpos anti-CD16/32 conjugados à FITC e analisadas por citometria de fluxo. Os números dos quadrantes denotam a porcentagem dos eventos. Os histogramas sobrepostos representam a intensidade de fluorescência de células BV-2 após marcação. Contr: células não tratadas. Resultados representativos de três experimentos independentes. Resultados expressos como média mais desvio-padrão e considerados estatisticamente relevantes em relação ao controle sem tratamento ( $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$ ).

## 6 SUMÁRIO DE RESULTADOS

- a) TAT recombinante foi expressa e purificada livre de endotoxinas, com sua identidade confirmada por ensaio imunocromatográfico e espectrometria de massas;
- b) TAT induziu a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 e NO de maneira tempo-dependente pós estímulo nas células microgliais;
- c) TAT induziu a expressão de iNOS de maneira tempo-dependente pós-estímulo nas células microgliais
- d) TAT induziu a expressão de CD16/32 em 48 horas pós-estímulo;
- e) A expressão das moléculas BiP, CHOP, XBP-1, GADD34, e ATF4 pertencentes ao eixo PERK da via UPR foram suprimidas quando este foi inibido nas células estimuladas com TAT;
- f) A expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 e NO, iNOs e CD16/32 foi suprimida quando o eixo PERK da via UPR foi inibido em células estimuladas com TAT;

## 7 CONCLUSÃO

Este trabalho empregou uma estratégia de expressão e purificação de TAT recombinante eficiente para o cumprimento do principal objetivo. TAT recombinante induziu a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 e NO de maneira tempo-dependente, além de iNOs e CD16/32, que são moléculas características de um estado pró-inflamatório clássico microglial, denominado M1. Paralelamente, foi demonstrado que TAT interage com a via UPR aumentando a expressão de moléculas envolvidas no eixo PERK de sinalização, sendo que quando este foi inibido, sob estímulo de TAT, a expressão das moléculas da ativação microglial avaliadas foi suprimida. Assim, a inibição de um braço de uma via celular importante na infecção pelo HIV por um fator viral circulante pode representar um potencial alvo terapêutico, tendo em vista a neuroinflamação e suas injúrias provocadas no ambiente neuronal amplamente relatadas, ainda que haja poucos estudos investigando a importância biológica do estresse no RE nas HAND.

## 8 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H; PILLAI, S. Imunidade inata. In: ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed., Saunders, 2015. Cap. 4. p. 137-211.

ADAMSON, D. C. et al. Rate and severity of HIV-associated dementia (HAD): Correlations with Gp41 and iNOS. **Molecular Medicine**, v. 5, n. 2, p. 98–109, 1999.

BAGASHEV, A.; SAWAYA, B. E. Roles and functions of HIV-1 Tat protein in the CNS: an overview. **Virology Journal**, v. 10, n. 358, p. 1–20, 2013.

BANKS, W.; ERCAL, N.; OTAMIS PRICE, T. The blood-brain barrier in neuroAIDS. **Current HIV Research**, v. 4, n. 3, p. 259–266, 2006.

BISHOP, A.; ANDERSON, J. E. NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological. **Toxicology**, v. 208, n. 2, p. 193–205, 2005.

BORSA, M. et al. HIV infection and antiretroviral therapy lead to unfolded protein response activation. **Virology Journal**, v. 12, n. 77, p. 1–11, 2015.

BROWN, G. C. Nitric oxide and mitochondria. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 1024–1033, 2007.

BRUCE-KELLER, A. J. et al. Pro-inflammatory and pro-oxidant properties of the HIV protein Tat in a microglial cell line: attenuation by 17 $\beta$ -estradiol. **Journal of Neurochemistry**, v. 78, n. 6, p. 1315–1324, 2001.

CAMPESTRINI, J.; SILVEIRA, D. B.; PINTO, A. R. HIV-1 Tat-induced bystander apoptosis in Jurkat cells involves unfolded protein responses. **Cell Biochemistry and Function**, p. 1–10, 2018.

CASELLA, G. et al. IL4 induces IL6-producing M2 macrophages associated to inhibition of neuroinflammation in vitro and in vivo. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 139, p. 1–10, 2016.

CASELLI, E. et al. Short communication: activating Transcription Factor 4 (ATF4) promotes HIV Type 1 activation. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 28, n. 8, p. 907–912, 2012.

CHAKRABORTY, A. et al. The E3 ubiquitin ligase Trim7 mediates c-Jun/AP-1 activation by Ras signalling. **Nature Communications**, v. 6, n. 6782, p. 1–12, 2015.

CHERRY, J. D.; OLSCHOWKA, J. A.; O'BANION, M. K. Are “resting” microglia more “M2”? **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 594, p. 2–5, 2014.

CLIFFORD, D. B.; ANCES, B. M. HIV-Associated Neurocognitive Disorder (HAND). **Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 11, p. 976–986, 2013.

COLTON, C. A.; WILCOCK, D. M. Assessing activation states in microglia. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 9, n. 2, p. 174–191, 2010.

CUMMINS, P. M.; DOWNLING, O.; O'CONNOR, B. F. Ion-exchange chromatography: basic principles and application to the partial purification of soluble mammalian prolyl oligopeptidase. In: WALLS, D.; LOUGHRAN, S. T. **Protein Chromatography: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**. Springer Science Business Media, 2010. v. 681, p. 215–228.

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

DESHMANE, S. L. et al. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): an overview. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 29, n. 6, p. 313–326, 2009.

DHEEN, S. T.; KAUR, C.; LING, E.-A. Microglial activation and its implications in the brain diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 11, p. 1189–97, 2007.

DHILLON, N. K. et al. Roles of MCP-1 in development of HIV-dementia. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, n. 10, p. 3913–3918, 2008.

DOS SANTOS, P. F. et al. ISG15-induced IL-10 is a novel anti-inflammatory myeloid axis disrupted during active tuberculosis. **The Journal of Immunology**, v. 200, n. 4, p. 1434–1442, 2018.

EL-HAGE, N. et al. Synergistic increases in intracellular Ca<sup>2+</sup>, and the release of MCP-1, RANTES, and IL-6 by astrocytes treated with opiates and HIV-1 Tat. **Glia**, v. 50, n. 2, p. 91–106, 2005.

EUGENIN, E. A. et al. HIV-1 Tat protein induces a migratory phenotype in human fetal microglia by a CCL2 (MCP-1)-dependent mechanism: possible role in NeuroAIDS. **Glia**, v. 49, n. 4, p. 501–510, 2005.

EUGENIN, E. A. et al. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in HIV-1 Tat-stimulated astrocytes and elevation in AIDS dementia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 9, p. 3438–3443, 2006.

FAN, Y.; HE, J. J. HIV-1 Tat induces unfolded protein response and endoplasmic reticulum stress in astrocytes and causes neurotoxicity through glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) activation and aggregation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 43, p. 22819–22829, 2016.

FINE, S. M. et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$  inhibits glutamate uptake by primary human astrocytes. Implications for pathogenesis of HIV-1 dementia. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 26, p. 15303–15306, 1996.

FISCHER-SMITH, T. et al. CNS invasion by CD14+/CD16+ peripheral blood-derived monocytes in HIV dementia: Perivascular accumulation and reservoir of HIV infection. **Journal of NeuroVirology**, v. 7, n. 6, p. 528–541, 2001.

GOTTLIEB, M. S. et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men. **The New England Journal of Medicine**, v. 305, n. 24, p. 1425–1431, 1981.

GRÄSLUND, S. et al. Protein production and purification. **Nature Methods**, v. 5, n. 2, p. 135–146, 2008.

GRAZIANO, F.; VICENZI, E.; POLI, G. Plastic restriction of HIV-1 replication in human macrophages derived from M1/M2 polarized monocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 100, n. 5, p. 1147–1153, 2016.

GUO, F. J. et al. XBP1U inhibits the XBP1S-mediated upregulation of the iNOS gene expression in mammalian ER stress response. **Cellular Signalling**, v. 22, n. 12, p. 1818–1828, 2010.

HENN, A. et al. The suitability of BV-2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. **ALTEX - Alternatives for animal experimentation**, v. 26, n. 2, p. 83–94, 2009.

HERBEIN, G. et al. Macrophage signaling in HIV-1 infection. **Retrovirology**, v. 7, n. 1, p. 34, 2010.

HERBEIN, G.; VARIN, A. The macrophage in HIV-1 infection: from activation to deactivation? **Retrovirology**, v. 7, n. 33, p. 1–15, 2010.

ITO, S. et al. GADD34 inhibits activation-induced apoptosis of macrophages through enhancement of autophagy. **Scientific Reports**, v. 5, p. 8327, 2015.

JIANG, X. et al. Effects of GSK2606414 on cell proliferation and endoplasmic reticulum stress-associated gene expression in retinal pigment epithelial cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 5, p. 3105–3110, 2017.

JIN, J. et al. HIV-1 Tat-induced microglial activation and neuronal damage is inhibited via CD45 modulation: a potential new treatment target for HAND. **American Journal of Translational Research**, v. 4, n. 3, p. 302–315, 2012.

JUKNAT, A. et al. Differential transcriptional profiles mediated by exposure to the cannabinoids cannabidiol and  $\Delta$  9-tetrahydrocannabinol in BV-2 microglial cells. **British**



**Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 8, p. 2512–2528, 2012.

KEMPURAJ, D. et al. Neuroinflammation induces neurodegeneration. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Spine**, v. 1, n. 1, p. 1–15, 2016.

KIM, J. BIN et al. Inhibition of LPS-induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by poncirin through the NF- $\kappa$ B inactivation in RAW 264.7 macrophage cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 12, p. 2345–2351, 2007.

KIM, R. S. et al. The XBP1 arm of the Unfolded Protein Response induces fibrogenic activity in hepatic stellate cells through autophagy. **Scientific Reports**, v. 6, n. 39342, p. 1–9, 2016.

KIMURA, A.; KISHIMOTO, T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. **European Journal of Immunology**, v. 40, p. 1830–1835, 2010.

KRAFT-TERRY, S. D. et al. HIV-1 neuroimmunity in the era of antiretroviral therapy. **Neurobiology of Disease**, v. 37, n. 3, p. 542–548, 2010.

KRUGER, N. J. The Bradford method for protein quantitation. In: WALKER, J. M. (Ed.). **The Protein Protocols Handbook**. 2. ed. New Jersey: Humana Press, 2002. p. 15–22.

LI, W. et al. Role of Tat protein in HIV neuropathogenesis. **Neurotoxicity Research**, v. 16, n. 3, p. 205–220, 2009.

LINK, A. J.; ROBISON, K.; CHURCH, G. M. Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of Escherichia coli K-12. **Electrophoresis**, v. 18, p. 1259–1313, 1997.

LIU, B.; GAO, H. M.; HONG, J. S. Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: Role of neuroinflammation. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 8, p. 1065–1073, 2003.

LIU, X. et al. Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Tat induces nitric-oxide synthase in human astroglia. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 42, p. 39312–9, 2002.

LOCATI, M.; MANTOVANI, A.; SICA, A. Macrophage Activation and Polarization as an Adaptive Component of Innate Immunity. In: **Advances in Immunology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. v. 120p. 163–184.

MA, R. et al. HIV Tat-mediated induction of human brain microvascular endothelial cell apoptosis involves endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 1, p. 132–142, 2016.

MADEIRA, F. et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. **Nucleic acids research**, v. 47, n. W1, p. W636–W641, 2019.

MAHAMEED, M. et al. The unfolded protein response modulators GSK2606414 and KIRA6 are potent KIT inhibitors. **Cell Death and Disease**, v. 10, n. 4, 2019.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000prime reports**, v. 6, n. 13, p. 1–13, 2014.

MIRON, V. E.; FRANKLIN, R. J. M. Macrophages and CNS remyelination. **Journal of Neurochemistry**, v. 130, n. 2, p. 165–171, 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

NOOKALA, A. R.; KUMAR, A. Molecular mechanisms involved in HIV-1 Tat-mediated induction of IL-6 and IL-8 in astrocytes. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, n. 1, p. 214, 2014.

ORIHUELA, R.; MCPHERSON, C. A.; HARRY, G. J. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, n. 4, p. 649–665, 2016.

PARK, I. W.; WANG, J. F.; GROOPMAN, J. E. HIV-1 Tat promotes monocyte chemoattractant protein-1 secretion followed by transmigration of monocytes. **Blood**, v. 97, n. 2, p. 352–358, 2001.

PFAFFL, M. W. Quantification strategies in real-time PCR. In: BUSTIN, S. (Ed.). **A-Z of quantitative PCR**. Internatio ed. p. 87–112. 2004.

POLAZZI, E.; LEVI, G.; MINGHETTI, L. Human immunodeficiency virus type 1 tat protein stimulates inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in microglial cultures. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 58, n. 8, p. 825–831, 1999.

PUGLIESE, A. et al. A review of HIV-1 Tat protein biological effects. **Cell Biochemistry and Function**, v. 23, n. 4, p. 223–227, 2005.

RAO, V. R.; RUIZ, A. P.; PRASAD, V. R. Viral and cellular factors underlying neuropathogenesis in HIV associated neurocognitive disorders (HAND). **AIDS research and therapy**, v. 11, n. 1, p. 13, 2014.

RATH, M. et al. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 532, p. 1–10, 2014.

ROSSI, G. B. et al. Comparison of Grain Proteome Profiles of Four Brazilian Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 34, p. 7588–7597, 2017.

RÖSZER, T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. **Mediators of inflammation**, v. 2015, p. 1–16, 2015.

SARLUS, H.; HENEKA, M. T. Microglia in Alzheimer's disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 9, p. 3240–3249, 2017.

SIDDAPPA, N. B. et al. Transactivation and signaling functions of Tat are not correlated: biological and immunological characterization of HIV-1 subtype-C Tat protein. **Retrovirology**, v. 3, p. 1–20, 2006.

SOKOLOVA, A. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 plays a dominant role in the chronic inflammation observed in alzheimer's disease. **Brain Pathology**, v. 19, n. 3, p. 392–398, 2009.

SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 115, n. 2, p. 113–128, 2005.

SOWERS, C. R. et al. The protein kinase PERK/EIF2AK3 regulates proinsulin processing not via protein synthesis but by controlling endoplasmic reticulum chaperones. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 14, p. 5134–5149, 2018.

STOTT, D. I. Immunoblotting and dot blotting. **Journal of Immunological Methods**, v. 119, n. 2, p. 153–187, 1989.

TANG, Y.; LE, W. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 2, p. 1181–1194, 2015.

TSUCHIYA, Y. et al. IRE1-XBP1 pathway regulates oxidative proinsulin folding in pancreatic  $\beta$  cells. **Journal of Cell Biology**, v. 217, n. 4, p. 1287–1301, 2018.

TYOR, W. R. et al. Cytokine expression in the brain during the acquired immunodeficiency syndrome. **Annals of Neurology**, v. 31, n. 4, p. 349–360, 1992.

UNAIDS. **Relatório Informativo - Atualização global da aids 2019**Un aids. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[https://unaid.org.br/wp-content/uploads/2017/12/UNAIDSBR\\_FactSheet.pdf](https://unaid.org.br/wp-content/uploads/2017/12/UNAIDSBR_FactSheet.pdf)>.

VARGAS, D. L. et al. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. **Annals of Neurology**, v. 57, n. 1, p. 67–81, 2005.

WALTER, P.; RON, D. The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. **Science**, v. 334, n. 6059, p. 1081–1086, 2011a.

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

WANG, Y. et al. M1 and M2 macrophage polarization and potentially therapeutic naturally occurring compounds. **International Immunopharmacology**, v. 70, p. 459–466, maio 2019.

WU, F. et al. Simvastatin alters M1/M2 polarization of murine BV2 microglia via Notch signaling. **Journal of Neuroimmunology**, v. 316, p. 56–64, 2018a.

WU, X. et al. HIV-1 Tat increases BAG3 via NF- $\kappa$ B signaling to induce autophagy during HIV-associated neurocognitive disorder. **Cell Cycle**, v. 0, n. 0, p. 15384101.2018.1480219, 2018b.

YOSHIDA, H. ER stress and diseases. **FEBS Journal**, v. 274, n. 3, p. 630–658, 2007.

ZHANG, L.; WANG, A. Virus-induced ER stress and the unfolded protein response. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n. December, p. 1–16, 2012.

ZHONG, J. et al. The role of endoplasmic reticulum stress in autoimmune-mediated beta-cell destruction in type 1 diabetes. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, p. 1–12, 2012.