

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – CAMPUS BOTUCATU

**“Análise da expressão de genes oncogênicos
selecionados do KSHV em células endoteliais TIVE-LTC
co-cultivadas com células linfóides Jurkat com e sem
expressão constitutiva da proteína tat do HIV-1”**

MARIANA LETICIA MATIAS

Acadêmica

ANA PAULA FERRAZ DA SILVA

Orientadora

PROF. DR. DEILSON ELGUI DE OLIVEIRA

Co-orientador

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, UNESP Campus Botucatu,
como exigência parcial para a obtenção
do título de Bacharel em Ciências
Biomédicas.

Botucatu, SP

Dezembro de 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Matias, Mariana Leticia.

Análise da expressão de genes oncogênicos selecionados do KSHV em células endoteliais TIVE-LTC co-cultivadas com células linfóides Jurkat com e sem expressão constitutiva da proteína tat do HIV-1 / Mariana Leticia Matias. – Botucatu : [s.n.], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas)
- Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Ana Paula Ferraz da Silva

Coorientador: Deilson Elgui de Oliveira

Capes: 40105008

1. Kaposi, Sarcoma de. 2. HIV (Vírus). 3. Endotélio.

Palavras-chave: Células endoteliais; Co-cultivo; Cultura celular; Expressão gênica; qPCR; TAT; Vírus associado ao sarcoma de Kaposi; Vírus da imunodeficiência humana.

DEDICATÓRIAS

Dedico este trabalho:

Aos meus pais José e Elisabete que sempre acreditaram no meu potencial e me deram forças para seguir em frente e nunca desistir, apesar dos obstáculos existentes durante toda a minha trajetória. Vocês são a minha vida. Amo vocês!

Às minhas grandes amigas Marcela e Laís que sempre estiveram ao meu lado, tanto nos bons momentos como também nos ruins. Agradeço pelos conselhos dados e pela paciência que tiveram comigo ao longo desses 4 anos morando juntas! Vocês são minhas irmãzinhas de coração e quero tê-las sempre perto de mim!

Ao meu namorado Luiz Fernando que ouviu com paciência as minhas preocupações e angústias. Obrigada por me compreender e estar ao meu lado nas horas mais difíceis. Te amo, meu amor!

Aos meus familiares que me apoiaram e sempre tiveram muito orgulho de mim. Vocês são a minha fortaleza e o melhor presente que Deus poderia ter me dado.

Principalmente à Deus que é a base de tudo pra mim. Sem Ele nada seria.

MUITO OBRIGADA!

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Deilson Elgui de Oliveira por ter me orientado de uma maneira singular. O entusiasmo e amor pelo seu trabalho despertou em mim a vontade de ser uma pesquisadora. Espero um dia ser tão competente como você.

À Ana Paula Ferraz da Silva por também ter me orientado e me ajudado tanto. Tenha certeza que sem o seu auxílio e sua paciência ao longo dessa jornada eu jamais conseguiria alcançar todos os meus sonhos. Nunca esquecerei a sua generosidade e amizade ao me ensinar. Você é um grande exemplo pra mim. Obrigada!

Aos membros do grupo que me auxiliaram, em especial à minha amiga Nathália que passou pelas mesmas experiências e desafios que eu e, mesmo assim, encontrou tempo para me ajudar em tantas coisas. Você foi fundamental nessa minha conquista!

MUITO OBRIGADA, DE CORAÇÃO!

“Análise da expressão de genes oncogênicos selecionados do KSHV em células endoteliais TIVE-LTC co-cultivadas com células linfóides Jurkat com e sem expressão constitutiva da proteína tat do HIV-1”

SUMÁRIO

1	RESUMO	7
2	INTRODUÇÃO	8
2.1	Herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi/Herpesvírus humano tipo 8.	8
2.2	Biologia do KSHV	10
2.3	Vírus da imunodeficiência humana	16
2.4	Interação KSHV e HIV-1	18
3	OBJETIVOS.....	20
3.1.1	Objetivo Geral	20
3.1.2	Objetivo Específico	20
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1	Detalhamento da Metodologia.....	21
4.2	Cultura celular	21
4.3	Avaliação da expressão dos transcritos do KSHV.	22
5	RESULTADOS.....	24
5.1	Cultura celular	24
5.2	Análise de expressão gênica	26
6	DISCUSSÃO.....	35
7	CONCLUSÕES	37
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

ÍNDICE DE TABELAS, QUADROS E FIGURAS

Tabela 1: Concentração inicial de TIVE-LTC, Jurkat e Jurkat-tat estabelecidas para os experimentos de co-cultivo.....	25
Tabela 2: Concentração de células viáveis e taxa de viabilidade celular das células TIVE-LTC mantidas ou não em co-cultivo com Jurkat ou Jurkat-tat durante 48, 72 ou 96h.....	26
Quadro 1 - Sequências dos oligonucleotídeos para a análise da expressão dos 5 genes do KSHV em estudo por qPCR.	23
Figura 1 – Delineamento geral do estudo.	21
Figura 2: Gráfico de amplificação de segmento da ORF 26 a partir de amostras de DNA da curva-padrão do genoma do KSHV por qPCR. Para fins de análise dos resultados do experimento dos períodos de 48, 72 e 96 horas, respectivamente, foi estabelecido o limiar de fluorescência normalizada (threshold) de 0,2; adicionalmente, os 10 primeiros ciclos de amplificação foram ignorados. Abaixo de cada gráfico está representada a eficiência slope (M) e r^2 de cada reação.	28
Figura 3: Análise dos dados obtidos com as reações de qPCR para os genes vFLIP, LANA, vGPCR, Rta e K1 do KSHV, após 48h de co-cultivo com a Jurkat ou Jurkat-tat. (A) Expressão diferencial dos transcritos dos genes estudados do KSHV nas TIVE-LTC co-cultivadas por 48 horas com Jurkat ou Jurkat-tat. A expressão de GAPDH foi utilizada para normalização dos resultados e as análises foram realizadas utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (B) Média dos ΔCt normalizados pelo GAPDH.....	30
Figura 4: Análise dos dados obtidos com as reações de qPCR para os genes vFLIP,, LANA, vGPCR, RTA e K1 do KSHV, após 72h de co-cultivo com a Jurkat ou Jurkat-tat. (A) Expressão diferencial dos transcritos dos genes estudados do KSHV nas TIVE-LTC co-cultivadas por 72 horas com Jurkat ou Jurkat-tat. A expressão de GAPDH foi utilizada para normalização dos resultados e as análises foram realizadas utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (B) Média dos ΔCt normalizados pelo GAPDH.....	32
Figura 5: Análise dos dados obtidos com as reações de qPCR para os genes vFLIP, LANA, vGPCR, RTA e K1 do KSHV, após 96h de co-cultivo com a Jurkat ou Jurkat-tat. (A) Expressão diferencial dos transcritos dos genes estudados do KSHV nas TIVE-LTC co-cultivadas por 96 hcom Jurkat ou Jurkat-tat. A expressão de GAPDH foi utilizada para normalização dos resultados e as análises foram realizadas utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (B) Média dos ΔCt normalizados pelo GAPDH.....	33

1 Resumo

O Herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV), ou Herpesvírus Humano tipo 8 (HHV-8), é o agente etiológico do sarcoma de Kaposi (SK), uma neoplasia maligna vascular. O ciclo biológico do KSHV apresenta duas fases, denominadas ciclo latente e ciclo lítico (ou produtivo). O ciclo latente é marcado pela expressão de um número reduzido de genes virais, com destaque para LANA e vFLIP. No ciclo lítico ocorre a replicação do genoma viral e a produção de novas partículas virais infecciosas; dentre seus principais produtos destacam-se as proteínas Rta, vGPCR e K1. LANA, vFLIP, vGPCR e K1 apresentam propriedades oncogênicas relatadas na literatura, enquanto Rta têm papel importante na regulação da transição entre os ciclos lítico e latente do KSHV. O KSHV é requerido para o desenvolvimento do SK. No entanto, a infecção pelo vírus não é suficiente para o desenvolvimento da doença. Por outro lado, sabe-se que o HIV é um co-fator importante, que favorece o desenvolvimento dessa neoplasia. Sugere-se que a proteína tat do HIV-1 amplifica a infectividade do KSHV, hiper-regulando a expressão de diferentes genes herpesvirais e colaborando para o crescimento e sobrevivência de células endoteliais que compõem as lesões do SK. A fim de contribuir para um melhor entendimento dos efeitos da proteína tat do HIV-1 em células infectadas pelo KSHV, o presente trabalho descreveu eventuais alterações na expressão dos genes codificadores de vFLIP, LANA, vGPCR, Rta e K1 em células endoteliais de veia umbilical humana imortalizada pela telomerase e infectada pelo KSHV a longo prazo (TIVE-LTCs) expostas à proteína tat do HIV-1 produzida por células linfóides T (CLTs) em co-cultivo. Células Jurkat contendo ou não vetor da proteína tat do HIV-1 foram utilizadas como CLTs e co-cultivadas com TIVE-LTCs por 48, 72 e 96 horas. Após extração do RNA total das TIVE-LTCs, a quantificação da expressão gênica de vFLIP, LANA, vGPCR, Rta e K1 em nível transcricional foi efetuada pela reação em cadeia da PCR quantitativa acoplada a transcrição reversa (qRT-PCR). As análises dos experimentos demonstraram que em 48h ocorreu diminuição na expressão diferencial de todos os genes analisados, exceto Rta e K1, enquanto que em de 72 e 96h não foram observadas alterações importantes, exceto para vFLIP, que teve sua expressão aumentada em 96h. Em síntese, é possível sugerir que as alterações significantes que ocorreram em 48h e não se manteve nos demais períodos avaliados se devem a uma possível dinâmica do KSHV na presença da proteína tat do HIV-1.

2 Introdução

2.1 Herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi/Herpesvírus humano tipo 8.

Em 1994, um grupo de cientistas americanos identificou uma nova sequência de DNA viral em lesões do sarcoma de Kaposi (*Kaposi's Sarcoma* – KS) provenientes de pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus* – HIV). O novo vírus, denominado herpesvirus associado ao sarcoma de Kaposi (*Kaposi's Sarcoma Associated Herpesvirus* – KSHV), ou herpesvírus humano tipo 8 (*Human Herpesvirus type 8* – HHV-8), foi classificado como membro da família *Herpesviridae*, subfamília *Gammaherpesvirinae*, gênero *Rhadnovirus*, sendo o primeiro desse gênero a infectar humanos¹. O KSHV é formado por nucleocapsídeo icosaédrico com aproximadamente 125nm de diâmetro e 162 capsômeros, envolto por envelope de bicamada lipídica. O nucleocapsídeo abriga DNA de dupla fita com cerca de 124-230kb, o qual se mantém na forma epissomal durante a fase de latência e linear na fase lítica do ciclo biológico viral².

O genoma do KSHV é bastante similar ao do herpesvírus saimiri (*Herpesvirus Saimiri* - HVS)³, com o qual compartilha 68 genes, localizados em regiões intercaladas de genes únicos. Originalmente nomeados como sequências abertas para leitura (*Open Reading Frames* - ORFs), esses genes estão anotados com o prefixo “ORF” seguido de numeração que cresce da esquerda para a direita ao longo do genoma viral⁴. A partícula do KSHV possui pelo menos 89 ORFs. Embora várias estejam presentes em outros vírus da família *Herpesviridae*, o KSHV possui um número significativo de ORFs únicas, não encontradas em nenhum outro herpesvirus. Essas ORFs únicas são nomeadas com o prefixo “K” seguido de um número que varia de 1 a 15, cuja designação se dá de acordo com a sua localização no genoma viral. Muitos desses genes sintetizam proteínas homólogas a proteínas humanas com participação na transdução de sinais e controle da proliferação celular⁵.

Até o momento, KSHV está consistentemente implicado na etiopatogenia do SK, do Linfoma de Efusão Primária (*Primary Effusion Lymphoma* – PEL) e da doença de Castleman Multicêntrica (*Multicentric Castleman Disease* – MCD)⁶. O SK é uma neoplasia maligna vascular, descrita pela primeira vez em 1872 por Moritz Kaposi, um dermatologista húngaro⁷. As lesões da doença são constituídas por células fusiformes com propriedades imunofenotípicas compartilhadas com células endoteliais, notadamente endotélio linfático⁸. Atualmente são descritas quatro formas clínico-

epidemiológicas principais do SK (clássico, endêmico africano, associado a AIDS e iatrogênico), distinguidas de acordo com a agressividade da lesão, mortalidade e morbidade, além de fatores de risco individuais, incluindo idade, sexo e etnia⁹.

O SK clássico se apresenta como lesões cutâneas isoladas, geralmente localizadas nas extremidades do corpo¹⁰. Acomete predominantemente indivíduos do sexo masculino com idade superior a 50 anos, sendo mais comum no Mediterrâneo e Europa Oriental⁴. O SK endêmico africano é predominante na África Oriental e Central, acometendo principalmente crianças na pré-puberdade; possui um envolvimento maior dos linfonodos, de modo a ser mais severo que o SK clássico¹¹. Já o SK associado à síndrome da imunodeficiência adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome - AIDS*) é a forma mais agressiva da doença, podendo se espalhar por linfonodos e vísceras¹². A forma iatrogênica está relacionada à supressão da imunidade após terapia para manutenção do enxerto em pacientes transplantados e pode sofrer remissão com mudanças no regime de drogas imunossupressoras¹².

Diferenças relacionadas à epidemiologia e agressividade das diferentes formas da doença revelam que o KSHV é necessário, mas não é suficiente para o estabelecimento da neoplasia, sendo necessários co-fatores. Dentre estes merece destaque a infecção pelo HIV, ocasionando o SK-AIDS⁵. SK é a neoplasia mais comum associada à AIDS, acometendo principalmente homens homossexuais e bissexuais¹². Em pacientes infectados pelo HIV, o KSHV também está associado ao desenvolvimento do PEL, tipo raro de linfoma caracterizado por efusão contendo células malignas em diversas cavidades do corpo, tais como pericárdio, pleura e peritônio¹³.

O SK é composto por diversos tipos celulares, tais como células endoteliais, eritrócitos extravasados, células inflamatórias infiltradas e as células neoplásicas fusiformes⁹. A transformação celular que acarreta o desenvolvimento da célula fusiforme tem a participação de alguns produtos do KSHV, dentre os quais a proteína viral inibidora de FLICE (*viral FLICE inhibitory protein - v-FLIP*). A expressão isolada dessa proteína se associa a expressiva reorganização da actina, propiciando a aquisição da morfologia fusiforme. Essas células expressando apenas vFLIP, entretanto, não apresentam todas as características que definem uma célula transformada¹⁴.

Células fusiformes nas lesões de SK secretam elevada quantidade de citocinas, incluindo o fator básico de crescimento de fibroblastos (*basic Fibroblast Growth Factor -*

bFGF), interleucinas 1, 6 e 8, o fator de necrose tumoral (*Tumor Necrosis Factor* – TNF), interferon gama (*gamma interferon* – IFN- γ) e o fator de crescimento do endotélio vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor* – VEGF). Grande parte dessas citocinas apresenta propriedades pró-angiogênicas e são requeridas para o crescimento de células endoteliais *in vitro*⁹. Assim, o desenvolvimento e manutenção das lesões do SK *in vivo* presumivelmente cursam com desregulação desses fatores de crescimento no ambiente tumoral.

Estudos demonstraram que as células fusiformes equivalentes às presentes no SK foram detectadas em sangue periférico de indivíduos portadores do HIV e expressaram inúmeros marcadores de células endoteliais, tais como EN4, EN2/3, EN7/44, CD13, CD34, CD36, CD54, ELAM-1 e HLA-DR. Adicionalmente, células fusiformes expressam também moléculas de superfície características de endotélio linfático, incluindo VEGFR3 e podoplanina¹⁵. Os dados acumulados na literatura sugerem que o KSHV é capaz de infectar células-tronco do mesênquima fetal humano (*Human Fetal Mesenchymal Stem Cells*– MSCs) e células progenitoras hematopoiéticas (*Hematopoietic Progenitor Cells* - HPCs-CD34⁺). Essas células se diferenciam em linhagens de células B e monócitos, indicando forte relação com o aumento do risco da progressão do SK. Isso porque tanto MSCs como HPCs CD34⁺ podem ser reservatórios do KSHV e fornecer fontes contínuas de células infectadas pelo vírus^{16,17}.

2.2 Biologia do KSHV

Assim como os demais herpesvirus humanos, o ciclo biológico do KSHV apresenta duas fases distintas, denominadas ciclo latente e ciclo lítico (ou produtivo). De modo geral, ambas as fases são caracterizadas por programas de expressão gênica distintos⁴. O KSHV é capaz de infectar uma grande parcela da população e se manter latente por um longo período. A reativação do vírus, i.e., a transição do ciclo latente para o lítico, desencadeia a produção e liberação de novas partículas virais prontas para infectar novas células suscetíveis⁴.

O primeiro alvo da infecção pelo KSHV são os linfócitos B. Entretanto, já se demonstrou tropismo do vírus por amplo repertório de células humanas, incluindo células fusiformes, endoteliais, monócitos, epitélio glandular prostático e células sensoriais ganglionares da raiz dorsal². Nas células infectadas latentemente pelo KSHV não há produção de partículas virais infecciosas e o DNA viral é encontrado na sua

forma episomal, expressando número reduzido de genes virais. Nessa fase é observada a expressão de proteínas virais como a kaposina (ORFK12), v-FLIP (ORF71), vCyclin (ORF72) e o antígeno nuclear associado a latência (*Latency-Associated Nuclear Antigen*–LANA) (ORF73)¹⁸. LANA, vCyclin e vFLIP são expressas a partir de um mesmo locus policistrônico, sendo que a transcrição de suas mensagens é regulada por um mesmo promotor bidirecional, o qual controla a expressão de genes latentes para o lado esquerdo, e os líticos para o direito⁴.

A fase lítica, por sua vez, é marcada pela replicação de praticamente todo genoma viral, agora na forma linear. Nessa fase, ocorre a produção de novas partículas virais, ocasionando efeitos citopáticos na célula infectada. Dentre os produtos virais da fase lítica merecem destaque uma proteína viral homóloga ao receptor acoplado a proteína G (*viral G Protein–Coupled Receptor* - vGPCR), a proteína K1 (ORF-K1) e a proteína ativadora de replicação e transcrição (*Replication and Transcription Activator* - RTA).

A transformação celular é o principal acontecimento na carcinogênese. No SK, a aquisição do fenótipo maligno por células infectadas pelo KSHV de linhagem endotelial pode ocasionar instabilidade cromossômica¹⁹, com reflexos na expressão gênica celular. Tanto produtos virais expressos na fase latente como na lítica do ciclo de vida do KSHV tem sido implicados na transformação celular induzido pelo vírus. No ciclo latente, determinados produtos atuam essencialmente modulando a sobrevivência e proliferação das células infectadas, enquanto que as proteínas de ciclo líticas parecem ter particular importância em mecanismos parácrinos de estimulação celular por fatores de crescimento e com atividade pró-angiogênicas, essenciais para o desenvolvimento tumoral⁴.

Situada na ORF73, LANA possui 222-234 kDa e 1162 aminoácidos. Estruturalmente essa proteína é dividida em três domínios: região N-terminal rica em serina/treonina, prolina e resíduos básicos; região altamente polimórfica rica em ácido glutâmico, ácido aspártico, glutamina e leucina e região C-terminal rica em resíduos hidrofóbicos²⁰. LANA é a principal proteína expressa durante o período latente de infecção, atuando na manutenção do genoma viral na célula infectada. Adicionalmente, LANA é capaz de modular diversas vias de sinalização intracelular, incluindo GSK-3 β (*Glycogen Synthase Kinase*), Rb e STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) e interferir com a atividade de p53. LANA exerce atividades importantes

na apoptose, na resposta imunitária, no crescimento, proliferação e transformação celulares.

Nesse sentido, a captura de GSK-3 β no núcleo da célula por LANA proporciona acúmulo da β -catenina no citoplasma, ocasionando progressão no ciclo celular, crescimento e proliferação celular²¹. Ao modular p53 em células transfectadas, LANA bloqueia sua função de ativador transcricional, fato que provoca aumento da resistência a apoptose dependente dessa proteína supressora tumoral²². LANA apresenta ainda a capacidade de inativar o gene de supressão tumoral de retinoblastoma (*RB1*), o que aumenta a expressão de genes dependentes dos fatores de transcrição da família E2F, responsáveis por induzir a transição da fase G1 para a S do ciclo celular²³. LANA ainda induz a expressão de IL-6²⁴ que, por meio de seus efeitos, ativa a via de sinalização STAT3. É também relatado que essa proteína promove a sobrevivência de células endoteliais primárias em cultura, bem como prolonga seu tempo de vida²⁵, o que pode ter a contribuição da regulação positiva que LANA exerce sob a expressão de telomerase por meio da interação com o fator transcricional Sp1²⁶.

Recentemente foi descrito que LANA atenua a resposta endotelial à estimulação do fator de necrose tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor alfa* – TNF- α), conseqüentemente inibindo a quimiotaxia dos neutrófilos. Num processo inflamatório, o recrutamento de neutrófilos depende da ativação de células do endotélio vascular por meio de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α . Após esta ativação, essa citocina provoca a secreção de outras citocinas como IL-8, a qual é capturada e apresentada no endotélio. Estabelecido o gradiente de IL-8 fora das células endoteliais, tal citocina funciona como guia da transmigração de neutrófilos sobre o endotélio em tecido inflamatório. Foi descrito que LANA é capaz de reduzir a expressão de IL-8 em células estimuladas pelo TNF- α , ocasionando, dessa maneira, a neutralização da quimiotaxia dos neutrófilos. Acredita-se que este é o primeiro estudo relacionado com a interferência de um produto de gene latente do KSHV e o recrutamento de neutrófilos. Tendo em vista que os neutrófilos são os principais agentes no processo de inflamação aguda, tal estudo procurou entender como este vírus, quando no estágio latente, é capaz de sobreviver durante a inflamação. Em suma, a expressão de LANA restringe a participação endotelial na quimiotaxia dos neutrófilos²⁷.

Estudos recentes demonstraram que inúmeras citocinas e alguns de seus receptores são regulados por componentes expressos na fase latente da infecção pelo KSHV. Nesse sentido, foi descrito que LANA é capaz de hiporregular a expressão do

receptor 1 de IL-22 (*Interleukin 22 receptor - IL22R1*), além de comprometer a resposta a estimulação dessa citocina. IL-22 é uma citocina que utiliza o IL22R1 como ligante e é produzida por meio da ativação de células T, além de estar envolvida com inúmeras respostas inflamatórias teciduais. IL-22 se liga a IL-22R1 e, posteriormente, IL-10R2 se liga a eles. Esse complexo é capaz de ativar importantes vias de sinalização como JAK/STAT, ERK e MAP quinase. Pode-se concluir que a redução dos níveis de IL-22R1 afeta a função da citocina a ele associado e que a baixa expressão desse receptor ocasiona um aumento na patogênese do SK²⁸.

A proteína latente v-FLIP (ORF71) do KSHV possui domínios efetores de morte que lhes permite interagir com proteínas adaptadoras, como a FADD (*Fas-Associated Death-Domain*) da via Fas/TNFR. Essa interação impede o recrutamento e ativação da caspase 8, a qual não interage com FADD, proporcionando o bloqueio da apoptose mediada pela proteína Fas²⁹. Outro mecanismo utilizado por v-FLIP para bloquear a morte celular programada é a indução de fatores de transcrição anti-apoptóticos, como o fator nuclear κ B (*Factor Nuclear kappa B - NF- κ B*). Essa ativação está relacionada à atividade biológica de células endoteliais primárias que expressam v-FLIP, a qual propicia o aspecto fusiforme da célula no SK. Inibidores da ativação de NF- κ B bloqueiam esse efeito, fato que reflete na reorganização do citoesqueleto de actina da célula e, conseqüentemente, a regressão da doença³⁰.

Além de prolongar a sobrevivência, alterar a morfologia das células endoteliais, aumentar o crescimento e proliferação celular e facilitar a perda da inibição por contato³¹, o papel de v-FLIP na ativação de NF κ -B pode colaborar com a manutenção da latência do KSHV³². É descrito que a ativação de NF κ -B modifica o balanço entre expressão de genes de ciclo latente e de ciclo lítico do KSHV, sendo esse controle um evento crucial na patogênese do SK e de outras doenças associadas ao vírus³⁰.

Estudos recentes mostraram ainda que vFLIP afeta a proliferação celular por meio da diminuição do nível de expressão de proteínas que regulam o ciclo celular como as proteínas de inibição de ligação do DNA 2 e 3 (*Inhibitor of DNA binding - Id2 e Id3*), bem como as ciclinas E e A. As proteínas de inibição de ligação do DNA são consideradas reguladores negativos das vias de diferenciação e reguladores positivos na proliferação celular³³.

A entrada no ciclo lítico é controlada pela proteína Rta do KSHV (ORF-50)³⁴. Trata-se de proteína altamente fosforilada, com 691 aminoácidos e 73.7 kDa de massa molecular. Essa proteína é homóloga às Rtas do EBV (*Epstein-Barr Virus*), do HVS

(*Herpes Simplex Virus*), do RRV (*Ross River Virus*) e do MHV68 (*Murid Herpesvirus 68*). A Rta tem atividades características das proteínas que participam como fatores de transcrição. Além de regular sua própria expressão com a colaboração do fator de transcrição Oct-1, Rta é necessária e suficiente para acionar todo o programa lítico em células latentes infectadas pelo KSHV, resultando na expressão ordenada de proteínas virais e morte de células hospedeiras³⁹. No entanto, foi descrito que alguns miRNA codificados pelo KSHV como, por exemplo, miR-K12-7 e miR-k12-9, são capazes de interagir diretamente com o Rta e outros genes regulados por ele, inibindo a sua expressão e, conseqüentemente, contribuindo para o estágio de latência viral³⁵. Além disso, é descrita a interação entre Rta e LANA por um mecanismo de retroalimentação, de modo que LANA inibe a replicação lítica viral por meio da repressão da expressão ou antagonismo da função de Rta³⁶.

A Rta é capaz de transativar diretamente os promotores de muitos genes do KSHV com potencial atividade na patogênese de doenças associadas ao vírus, incluindo K12, vIL-6, vMIP-1, vIRF-1, vGPCR e K1⁴, os quais geram produtos que impedem o controle do crescimento e fisiologia normal das células, fato essencial na otimização do meio celular mais adequado para a replicação do DNA viral. A ativação de IL-6 celular e o bloqueio da apoptose mediada pelo p53, que compete pela ligação com o CBP (*CREB Binding Protein*), confirmam que Rta também aciona vias celulares de controle de crescimento³⁷.

A vGPCR (ORF74 do KSHV) é outra proteína presente no ciclo lítico, homóloga viral do receptor para IL-8³⁸, a qual colabora com a morte da célula infectada. Alguns fatores presentes nessas células afetadas podem influenciar no comportamento de células adjacentes que não estão infectadas, mas que podem apresentar vias como MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) e NFκ-B ativadas, ocasionando o aumento da expressão de genes envolvidos na proliferação, sobrevivência e transformação celular. vGPCR também aumenta a expressão de citocinas que atuam como fatores de crescimento com atividade autócrina ou parácrina, tais como IL-6, IL-1β, IL-8, GM-CSF, TNF-α, VEGF, bFGF e MCP-1, reguladores importantes de fenômenos como a proliferação celular, angiogênese e inflamação, essenciais na patogênese do SK³⁹.

Células experimentalmente transfectadas com vGPCR possuem uma regulação positiva de muitos genes celulares, inclusive o fator de crescimento de endotélio vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor* - VEGF), que apresenta reconhecida atividade angiogênica⁴⁰. Entretanto, em doenças associadas ao KSHV, a expressão de

vGPCR tem sido relatada em apenas uma pequena população de células de tumores em animais transgênicos e em poucos outros tecidos, sugerindo que a formação de tumores mediada por vGPCR é possivelmente relacionada à reativação espontânea do ciclo lítico.

Recentemente, foi descrita uma função de vGPCR na via de sinalização denominada TSC/mTOR/HIF, ocasionando uma cascata de reações causadas pelo aumento da secreção de VEGF. A amplificação angiogênica pelo vGPCR envolve a secreção de citocinas angiogênicas e inflamatórias por células que expressam vGPCR, as quais podem atuar em células adjacentes. Essas citocinas ativam de maneira parácrina quinases como AKT, ERK, p38 e IKK β responsáveis por fosforilar TSC1 e 2 da via de sinalização, os quais se tornam capazes de ativar mTOR, uma enzima com atividade quinase. Essa ativação ocasiona uma hiperregulação do fator de indução a hipóxia (*Hypoxia Inducible Factor* - HIF), um fator transcricional que promove neovascularização e remodelamento vascular capaz de provocar o aumento da transcrição e secreção de VEGF e, conseqüentemente, uma desregulação na angiogênese⁴¹. Salienta-se que essa proteína viral é capaz de regular tanto genes do ciclo lítico como do latente⁴².

Outro trabalho publicado recentemente demonstrou que a expressão de vGPCR em células endoteliais, *in vivo* e *in vitro*, induz aumento na permeabilidade paracelular e remodelamento de junções celulares dependente de caderina. Células endoteliais que expressam vGPCR interagem com a via de sinalização PI(3)K γ /Rac, resultando na desorganização morfológica das junções de aderência e aumento da permeabilidade vascular, juntamente com a fosforilação e internalização da molécula de adesão denominada caderina. *In vitro*, foi descoberto ainda que vGPCR modula o perfil da caderina nas junções celulares, sugerindo que uma célula que expressa vGPCR é capaz de modificar inúmeras células endoteliais vizinhas que não expressam tal gene. Com isso, ao focar na caderina modulada, possivelmente serão identificados pontos relevantes na regulação da integridade vascular que podem se tornar potenciais alvos na terapia contra diversas patologias caracterizadas por alterações na permeabilidade vascular⁴³.

Digno de nota, em células endoteliais primárias a quinase de adesão focal (*Focal Adhesion Kinase* – FAK) torna-se ativa após a expressão de vGPCR. Além de deflagrar a ativação das vias ERK, NF- κ B e AP-1, também moduladas por vGPCR,

FAK é essencial para motilidade celular, possivelmente contribuindo no potencial de invasão tumoral nas células infectadas pelo KSHV⁴⁴.

A ORF-K1, por sua vez, codifica a glicoproteína de membrana K1, induzida particularmente durante a replicação lítica do KSHV⁴⁵. A proteína K1 é também denominada proteína variável que contém ITAM (*Variable ITAM-containing Protein - VIP*) em virtude de possuir domínio equivalente ao receptor imunitário de ativação baseada em tirosina (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif - ITAM*), com papel na ativação de linfócitos. Estruturalmente K1 possui três domínios: o N-terminal extracelular, o transmembrana e o C-terminal citoplasmático, adjacente ao ITAM.

Em linfócitos B, K1 ativa as vias de sinalização da fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3K), Akt, Vav e Syk-quinases, estimulando a atividade transcricional de NFAT e NFκB, responsáveis pela sobrevivência das células, além de fomentar a produção de citocinas inflamatórias que regulam a resposta imunitária⁴⁶. Outra importante função de K1 é induzir a regulação negativa do receptor de superfície de células B (*B cell receptor - BCR*), o que pode inibir a apoptose, como consequência da sinalização de BCR⁴⁷. Já em células endoteliais e epiteliais, a expressão de K1 induz a secreção de fatores angiogênicos e de invasão tecidual (e.g, VEGF e metaloproteínase-9, respectivamente⁴⁸, bem como o crescimento e imortalização de células endoteliais primárias⁴⁹.

2.3 Vírus da imunodeficiência humana

O HIV pertence à família *Retroviridae* e ao gênero *Lentivirus*. Possui 100nm de diâmetro e é envolto por envelope constituído por membrana lipoproteica. São descritos dois tipos virais, denominados HIV-1 e HIV-2. O HIV-1 é o principal agente causador da AIDS no mundo, enquanto que o HIV-2 está restrito a algumas regiões da África Central e Ocidental⁵⁰.

O HIV-1 é composto por duas fitas iguais de RNA de cadeia simples e possui os três principais genes retrovirais, gag, pol e env. Gag codifica proteínas estruturais do núcleo, como p24, p7 e p6, e da matriz, como a p17. Já o gene env codifica glicoproteínas do envelope, dentre elas gp120 e gp41. O gene pol codifica enzimas cruciais na replicação viral, incluindo a transcriptase reversa, que converte RNA viral em DNA, a integrase, que incorpora o DNA viral no genoma do hospedeiro, e a protease, a qual cliva os precursores das proteínas gag e pol em seus componentes maduros⁵¹.

O HIV-1 também apresenta um repertório de genes acessórios e de regulação cujos produtos têm importante papel no controle da replicação viral. Dentre eles destaca-se tat (*Transactivator of Transcription*), proteína expressa precocemente após a infecção pelo HIV-1 e que promove a expressão de diferentes genes retrovirais e celulares. A proteína rev (*Regulator of Expression of the Virion*) participa no transporte de todas as mensagens processadas e do RNA genômico retroviral do núcleo para o citoplasma.

A proteína viral R (*viral protein R - vpr*) permite que o DNA reverso transcrito consiga se estabelecer no núcleo de células que não estão no processo de divisão, tais como macrófagos. A proteína viral U (*viral protein U - vpu*), por sua vez, auxilia no brotamento das partículas virais. O fator de infectividade viral (*Virus infectivity factor - vif*) amplifica o potencial infeccioso do retrovírus. Por fim, o denominado fator negativo (*negative factor - nef*) participa na transdução de sinais celulares e efetua a regulação de receptores CD4 na superfície da célula infectada, permitindo brotamento das novas partículas retrovirais⁵².

Todas essas proteínas retrovirais possuem papéis cruciais no ciclo biológico do HIV-1, o qual pode ser dividido em seis etapas. A primeira é caracterizada pela ligação e entrada do vírus na célula susceptível; na segunda ocorre a degradação da cápsula viral; a terceira é marcada pela transcrição reversa do genoma retroviral; na quarta há a integração do DNA pró-viral no genoma da célula infectada; na quinta ocorre a síntese e montagem das proteínas retrovirais; e finalmente, na sexta etapa, há o brotamento das novas partículas retrovirais e sua liberação⁵⁰.

O envelope retroviral é essencial para a entrada do HIV-1 na célula-alvo e depende da ligação da gp120 com a molécula CD4, a qual é expressa em aproximadamente 60% dos linfócitos T circulantes, em precursores de linfócitos T, monócitos/macrófagos, eosinófilos, células dendríticas e células da microglia do sistema nervoso central. Essa molécula atua como co-receptor da molécula de classe II do complexo de histocompatibilidade (*Class II major histocompatibility complex - MHCII*) durante o processo de reconhecimento da célula T pelo antígeno. Na ligação de gp120 com CD4, o envelope viral sofre modificações conformacionais, expondo domínio específico da gp120 que é capaz de se ligar a receptores de quimiocina na membrana celular (e.g. CXCR4 ou CCR5)⁵⁰.

Atualmente, aproximadamente 17 tipos de ligantes que funcionam como co-receptores para o HIV foram identificados, sendo o CXCR4 e CCR5 os mais comuns.

CXCR4 é expresso em linfócitos T, enquanto que CCR5 pode ser observado em monócitos, células dendríticas e linfócitos T ativados. A ligação da gp120 com a molécula CD4 e ao receptor de quimiocina proporciona uma maior estabilidade durante o ataque do vírus, tornando viável a entrada da região N-terminal de gp41 na membrana celular. Essa ligação permite a fusão das membranas do envelope viral e da célula alvo, proporcionando a entrada do capsídeo viral. Posteriormente, o RNA viral é liberado no citoplasma da célula alvo e convertido em DNA pro-viral e inserido no DNA do hospedeiro por meio da ação da transcriptase reversa e da integrase, respectivamente⁵³.

Após a sua integração ao DNA do hospedeiro, inicia-se a síntese das proteínas virais que serão utilizadas para a montagem de novas partículas retrovirais, que deverão ser capazes de executar o ciclo biológico do HIV em outras células susceptíveis. A protease auxilia na maturação de novas partículas virais clivando moléculas precursoras denominadas gp160, nas proteínas gag, pol, gp120 e gp41, de modo tornar as partículas virais capazes de infectar outras células suscetíveis⁵⁰.

O estágio final da doença causada pela infecção pelo HIV é a AIDS propriamente dita. A progressão da infecção se deve a propriedades do próprio retrovírus e da resposta imunitária do hospedeiro. O equilíbrio entre esses dois fatores determina a patogenicidade da infecção e o desenvolvimento da doença. Durante a AIDS o número e a qualidade dos linfócitos T CD₄⁺ no organismo infectado diminui progressivamente, possibilitando o surgimento de infecções oportunistas e algumas doenças neoplásicas. Dentre estas, destacam-se o sarcoma de Kaposi e linfomas⁵⁴, ambos os cânceres em que a infecção do hospedeiro pelo KSHV tem papel importante em sua etiopatogênese.

2.4 Interação KSHV e HIV-1

O KSHV é agente necessário, porém insuficiente para o desenvolvimento do SK, posto que apenas uma pequena parcela da população infectada por tal vírus desenvolve a doença. Co-fatores como infecção pelo HIV-1 e imunossupressão iatrogênica aumentam drasticamente o risco de surgimento de doenças relacionadas à infecção pelo KSHV. Nos indivíduos infectados pelo KSHV a chance de surgirem lesões de SK é muito maior em pessoas co-infectadas pelo HIV-1 do que com outros tipos de imunossupressão, sugerindo que o HIV-1 possui uma ação direta na biologia do KSHV e na transformação celular favorecida por esse vírus³⁹.

Estudos demonstraram que a co-infecção com KSHV pode modular a replicação do HIV-1 pela interação direta entre os dois vírus em nível molecular⁵⁵, ou por efeitos secundários resultantes de fatores celulares em resposta a infecção³⁹. Estudos *ex vivo* demonstraram que a proteína tat do HIV-1 estimula monócitos a secretarem IL-8 e Gro α , duas quimiocinas pró-angiogênicas, potencializando o surgimento das células neoplásicas do SK associado a AIDS⁵⁶. Adicionalmente, tat amplifica a infectividade do KSHV por facilitar a invasão da matriz extracelular e aumentar a concentração dessas partículas virais na superfície celular. O HIV-1 proporciona ainda aumento da replicação dessas partículas virais por induzir a liberação de oncostatina-M (OSM) e interferon- γ ⁵⁷.

Diversos produtos do KSHV, tanto do ciclo lítico como do latente, interagem com proteínas do HIV-1. LANA interage com a proteína tat, ativando-a e proporcionando a reativação do ciclo latente do KSHV⁵⁸. Por outro lado, a expressão de Rta do KSHV aumenta a infectividade pelo HIV-1 em diversos tipos celulares⁵⁹, pela ação sinérgica com tat ou mesmo melhorando a dispersão do retrovírus pelo organismo, favorecendo também a progressão da doença.

No KS associado a AIDS, o HIV-1 e sua proteína tat induzem citocinas inflamatórias, que podem aumentar a susceptibilidade celular à infecção pelo KSHV, além de colaborar com o crescimento e sobrevivência de células endoteliais que compõem as lesões⁶⁰. Tat também pode hiper-regular a expressão de genes líticos do KSHV como o vGPCR, responsável pela angiogênese, um dos mecanismos sugeridos para explicar a maior agressividade do SK associado a AIDS quando comparado as outras formas da doença⁶¹. Também a proteína vpr do HIV-1 aumenta a expressão de genes do KSHV⁶². Em estudo publicado por Mercader e colaboradores, foi demonstrado que a replicação do HIV-1 aumentou significativamente quando as células infectadas pelo HIV-1 foram submetidas ao co-cultivo com células KSHV positivas⁵⁵.

No SK associado a AIDS, o HIV-1 provavelmente aumenta a patogenicidade e agressividade do KSHV por várias maneiras, incluindo a imunossupressão, condicionamento das células-alvo e do microambiente tecidual (favorecendo a infecção e replicação herpesviral) ou por meio de efeitos diretos na sua expressão gênica ou replicação⁵⁴. Entretanto, ainda há poucos estudos acerca da interação do KSHV e do HIV-1 na carcinogênese, inclusive pelo fato desses vírus apresentarem tropismo celular distintos e aspectos peculiares em seus ciclos biológicos, dificultando o estudo das interações. A fim de contribuir para um melhor entendimento dos efeitos da interação

entre células infectadas pelo KSHV e pelo HIV-1 na patogênese do SK o presente trabalho visa descrever as eventuais alterações na expressão de genes selecionados do KSHV infectando células endoteliais humanas em co-cultivo com células linfóides expressando a proteína tat do HIV-1.

3 Objetivos

3.1.1 Objetivo Geral

O presente estudo visa explorar a hipótese de que a proteína tat do HIV-1 regula, de maneira parácrina, a expressão de genes do KSHV com propriedades oncogênicas em células endoteliais de veia umbilical humana imortalizada pela telomerase e infectada pelo KSHV a longo prazo (*Telomerase-immortalized human umbilical vein endothelial cell line – Long Term KSHV infected TIVE-LTCs*).

3.1.2 Objetivo Específico

- Avaliar em diferentes momentos a expressão transcricional *in vitro* de cinco genes do KSHV (vFLIP, LANA, vGPCR, Rta e K1) em células TIVE-LTCs co-cultivadas com células Jurkat expressando constitutivamente a proteína tat do HIV-1 (Jurkat-tat).
-

4 Material e Métodos

4.1 Detalhamento da Metodologia

O presente trabalho baseia-se em modelo de co-cultivo de TIVE-LTCs com células linfóides T (CLTs) (Jurkat e Jurkat-tat). A Jurkat-tat é linhagem de células Jurkat que constitutivamente expressa a proteína tat do HIV-1. A Figura 1 apresenta o desenho geral do estudo, cujas etapas experimentais são detalhadas a seguir.

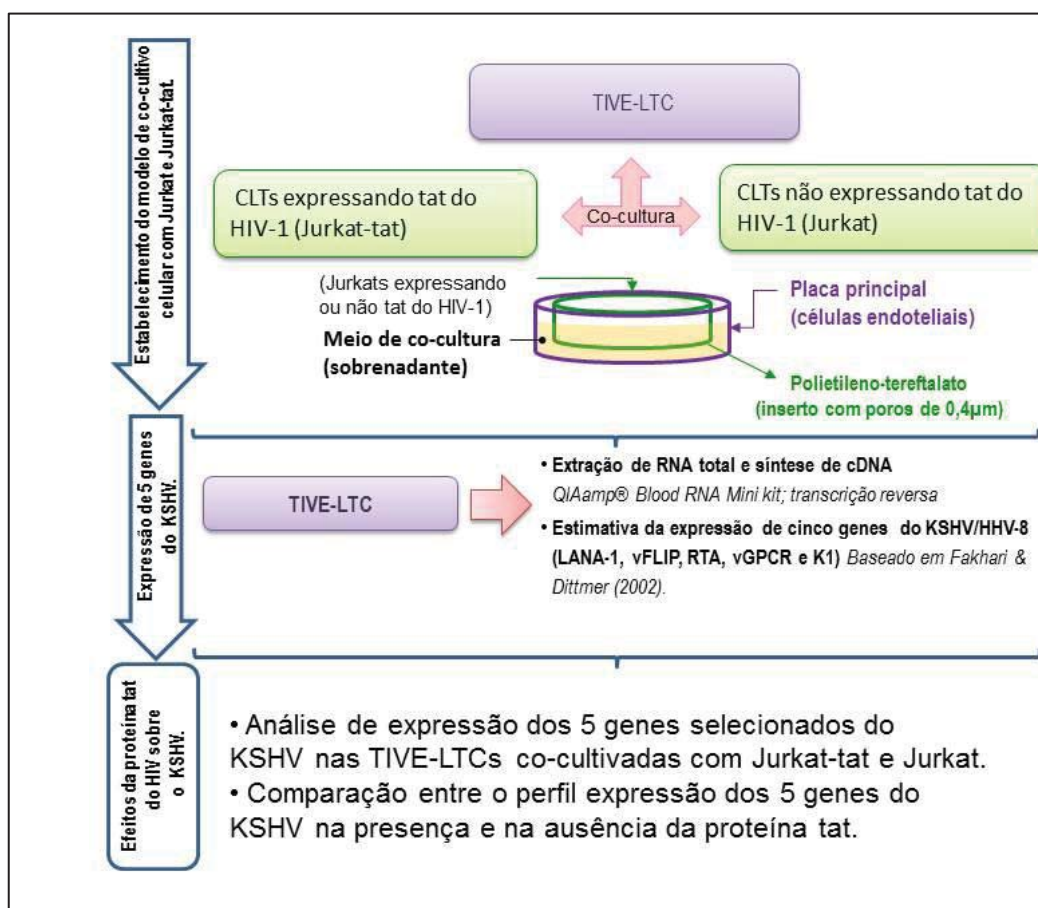


Figura 1 – Delineamento geral do estudo.

4.2 Cultura celular

No desenvolvimento desse estudo foram utilizadas células TIVE-LTCs, gentilmente cedidas pela Dra. Ethel Cesarman (*Weill Medical School, Cornell University, NY, USA*). Como CLTs foram utilizadas as linhagens Jurkat, cedida pelo Dr. Rui Curi, do Instituto de Ciências Biomédicas – USP e Jurkat-tat que apresenta expressão constitutiva da proteína tat do HIV-1. As células Jurkat-tat foram obtidas junto ao *AIDS Research and Reference Reagent Program (AIDS Reagents)* da Divisão

de AIDS do Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas dos EUA (*National Institute of Allergy and Infectious Diseases - NIAID*).

Todas as linhagens de células utilizadas foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) acrescido de 10% de soro fetal bovino (*Fetal bovine serum – FBS*) inativado por calor e 0,6% de gentamicina (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA) e mantidas em estufa a 37°C com 5% CO₂.

O co-cultivo foi realizado empregando o sistema de isolamento físico semi-permeável *BDFalcon™* (*Beckson-Dickson*, San Jose, CA, USA) em placa de 6 poços em meio DMEM com 10% FBS e 0,6% de gentamicina e mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂. As células Jurkat e as Jurkat-tat foram mantidas em suporte (*inserts*) que têm como base membranas de polietilenotereftalato com poros de 0,4 µm. Esses suportes foram colocados em contato com a cultura de TIVE-LTCs e o co-cultivo foi mantido em períodos de 48, 72, e 96 horas.

4.3 Avaliação da expressão dos transcritos do KSHV.

As TIVE-LTCs foram submetidas à análise da expressão em nível transcricional de 5 genes do KSHV pré-selecionados após a exposição às células Jurkat ou Jurkat-tat nos 3 períodos estabelecidos (48h, 72h e 96h). O RNA total das TIVE-LTCs foi então extraído utilizando o sistema *QIAamp® Blood RNA Mini kit* (*Qiagen*, Valencia, CA, USA), conforme protocolo do fabricante. Após a extração, as amostras de RNA total obtidas foram tratadas com 1µL de DNase (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA) e quantificadas por microespectrofotometria UV utilizando o equipamento *Nano Vue* (*GE Healthcare*, Little Chalfont, UK). Posteriormente foi sintetizado DNA complementar (cDNA) para execução da Reação em Cadeia da Polimerase acoplada a transcrição reversa (*Reverse Transcription-coupled Polymerase Chain Reaction – RT-PCR*) empregando a enzima *SuperScript II RT®* (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA).

A quantificação da expressão gênica de vFLIP, LANA, vGPCR, Rta e K1 foi efetuada por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) utilizando *SYBR Green® PCR Master Mix* (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA) em termociclador Rotor-Gene 6000 (*Corbett Research*, Mortlake, Austrália). Em cada reação foram utilizados 4 µL do cDNA das TIVE-LTCs para cada condição e período estabelecido, 12,50 µL do reagente *SYBR® Green* e iniciadores na concentração final de 0,30 µM. O perfil de ciclagem foi 50°C - 2 min, 94°C - 5 min, seguido de 40 ciclos de 94°C - 60s e 57°C - 60s e 72°C - 60s. As sequências dos

iniciadores utilizadas no presente estudo foram retiradas do trabalho publicado por Fakhari & Dittmer⁶³ e estão detalhadas no Quadro 1.

Quadro 1 - Sequências dos oligonucleotídeos para a análise da expressão dos 5 genes do KSHV em estudo por qPCR.

Alvo	Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')*
Genes do ciclo lítico viral		
vGPCR (ORF74)	KSHVOK14-vGPCR.S	TGGCCCAAACGGAGGATCCTAG
	KSHVOK14-vGPCR.A	AGTTTCATTCCAGGATTCATCATC
RTA (ORF50)	KSHVO50-RTA.S	CACAAAAATGGCGCAAGATGA
	KSHVO50-RTA.A	TGGTAGAGTTGGGCCTTCAGTT
K1 (ORFK1)	KSHVORFK1.S	AAACAACGTGACTCAAACAAAACA
	KSHVORFK1.A	TCTTCCGTGCACAAATCGTG
Genes do ciclo latente viral		
LANA (ORF73)	KSHV073.S	GCTTGGTCCGGCTGACTTAT
	KSHV073.A	TGCAGTACCGCCCATGG
v-FLIP (ORF71)	KSHV071-vFLIP.S	TTTCCCCTGTTAGCGGAATGT
	KSHV071-vFLIP.A	CTAAGTGAAGCAGGTCGCGC
Gene humano (controle)		
GAPDH	GAPDH.S	GCTCCCTCTTTCTTGCAGCAAT
	GAPDH.A	TACCATGAGTCCTCCACGATAC
Curva-Padrão		
ORF26	ORF26.S	TCCACCATTGTGCTCGAATCCAAC
	ORF26.A	ACACCAACAGCTGCTGCAGAATAG

*Sequências descritas por Fakhari & Dittmer (2002)⁶³

Os valores de expressão dos transcritos do KSHV analisados foram normalizados com base na análise concomitante da expressão do gene codificador da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase* - GAPDH; GeneID: 2597). O cálculo da expressão diferencial dos genes do KSHV selecionados foi efetuado pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ ⁶⁴.

Para testar a qualidade das reações de qPCR realizadas, foi preparada curva-padrão a partir da diluição seriada na proporção de 1:10 de amostras comerciais de DNA genômico viral, derivado de linhagem de células KS-1 de linfoma de efusão primário (*Primary Effusion Lymphoma* – PEL). As diluições foram preparadas de modo a serem geradas alíquotas de DNA viral em concentrações de 50×10^{-3} ng/ μ L à 50×10^{-6} ng/ μ L. As amostras da curva-padrão bem como as equivalentes aos experimentos de

co-cultivo, o GAPDH de cada amostra e o controle negativo da reação (*No template Control* – NTC; sem DNA) foram analisadas em duplicatas.

Cada reação fornece dados sobre a linearidade e inclinação da reta (R^2 e *slope* - M, respectivamente) e eficiência. A regressão linear da curva-padrão permite a obtenção de valores do R^2 e *slope*; a partir deste é também possível calcular a eficiência da reação, cujo valor ideal deve estar entre 90-100% (alcançado quando o *slope* oscila entre -3.1 e -3.6). A quantidade de DNA viral nas amostras-teste é calculada a partir de seu ciclo limiar (*Threshold cycle* - Ct).

5 Resultados

5.1 Cultura celular

Antes do co-cultivo das TIVE-LTCs com células Jurkat ou Jurkat-tat, foi estimada a quantidade de células endoteliais para que o plaqueamento propiciasse confluência aproximada de 90% em 48, 72 e 96 horas após o início do co-cultivo. Para tanto, as TIVE-LTCs foram plaqueadas e observadas a cada 24h subjetivamente quanto à confluência em microscópio invertido (*Nikon*).

Inicialmente $4,5 \times 10^5$ TIVE-LTCs foram plaqueadas em placa de 6 poços. Nas primeiras 24h não houve aumento significativo no número de células na cultura. Entretanto, a partir de 48h a cultura alcançou a confluência esperada de aproximadamente 90%. Em outros poços na mesma placa foram plaqueadas 2×10^5 e 1×10^5 TIVE-LTCs e nesses casos a monocamada se estabeleceu por completo após 72h e 96h, respectivamente.

Com base nessas observações estabeleceu-se que as placas a serem analisadas em 48, 72 e 96h pós-início dos co-cultivos receberiam inicialmente $4,5 \times 10^5$, 2×10^5 e 1×10^5 células por poço, respectivamente. Tendo observações efetuadas sobre a proliferação *in vitro* de células Jurkat ou Jurkat-tat (experimentos efetuados previamente por outros membros do grupo de pesquisa) permitiram estabelecer que as quantidades iniciais dessas células no co-cultivo poderiam ser de 5×10^5 , 4×10^5 e 3×10^5 para as avaliações a serem efetuadas em 48, 72 e 96h, respectivamente, a fim de que o número dessas células fossem semelhantes no momento de análise.

Para avaliar as possíveis variações na expressão dos genes vFLIP, LANA, vGPCR, Rta e K1 do KSHV, na presença (constitutivamente expressa por células Jurkat-tat) ou ausência da proteína tat do HIV, 3 condições de co-cultivo foram

definidas: 1) cultivo apenas de TIVE-LTC, sem Jurkat ou Jurkat-tat; 2) co-cultivo de TIVE-LTC com Jurkat; 3) co-cultivo TIVE-LTC com Jurkat-tat. Todos os experimentos foram realizados em placas de 6 poços e insertos de co-cultivo, mesmo na condição 1, na qual os insertos não continham células.

Para a execução desse experimento foram utilizadas duas placas de 6 poços para cada momento de análise, i.e., 48, 72 e 96h. Para cada período as células TIVE-LTCs de cada condição (sem co-cultivo, com Jurkat ou com Jurkat-tat) foram crescidas em 4 poços de uma placa de 6 poços. Subsequentemente foram unidos 2 poços de cada condição (a fim de se aumentar a quantidade de RNA total extraído das TIVE-LTCs), de modo a serem obtidas duplicatas experimentais para as análises de expressão gênica por RT-qPCR.

Pelo fato das TIVE-LTCs serem células aderentes, elas foram plaqueadas nas concentrações previamente indicadas (Tabela 1) em aproximadamente 5h antes da inserção do inserto vazio (Condição 1), contendo células Jurkat (Condição 2) ou Jurkat-tat (Condição 3). Durante as culturas as células em cada uma das condições foram mantidas em meio DMEM acrescido de 10% de FBS e 0,6% de gentamicina.

Tabela 1: Concentração inicial de TIVE-LTC, Jurkat e Jurkat-tat estabelecidas para os experimentos de co-cultivo.

Tempo de co-cultivo	TIVE-LTC (células/mL)	Jurkat ou Jurkat-tat (células/mL)
48h	$4,5 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$
72h	$2,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$
96h	$1,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$

Encerrados os períodos de 48, 72 e 96h, foram realizadas extrações de RNA total das TIVE-LTC nas 3 condições estabelecidas. Em todas as condições e em todos os períodos do experimento não foi notada variação importante no número de células viáveis e taxas de viabilidade celular *in vitro* (definidas pelas contagens manuais de células) (Tabela 2). Assim sendo, o co-cultivo com Jurkat ou Jurkat-tat *per se* não ocasionou citotoxicidade de células TIVE-LTC.

Tabela 2: Concentração de células viáveis e inviáveis, taxa de viabilidade celular de TIVE-LTCs mantidas ou não em co-cultivo com Jurkat ou Jurkat-tat durante 48, 72 ou 96h e coeficiente de variação percentual.

Período	Condição	Células viáveis* (células/mL)	CV ^a (%)	Células inviáveis* (células/mL)	Viabilidade (%)	CV ^b (%)
48h	TIVE-LTC	4,55x10 ⁵	0,77	1,75 x10 ⁵	92,8	1,50
	TIVE-LTC	4,60 x10 ⁵		1,25 x10 ⁵	94,8	
	TIVE-LTC+Jurkat	3,05 x10 ⁵	10,71	2,00 x10 ⁵	88,4	1,11
	TIVE-LTC+Jurkat	3,55 x10 ⁵		2,00 x10 ⁵	89,8	
	TIVE-LTC+Jurkat-tat	5,45 x10 ⁵	8,96	1,75 x10 ⁵	93,9	0,52
	TIVE-LTC+Jurkat-tat	4,80 x10 ⁵		1,50 x10 ⁵	93,2	
72h	TIVE-LTC	3,25 x10 ⁵	19,84	1,75 x10 ⁵	90,3	5,78
	TIVE-LTC	2,45 x10 ⁵		0,25 x10 ⁵	98,0	
	TIVE-LTC+Jurkat	3,70 x10 ⁵	19,58	1,00 x10 ⁵	94,9	3,51
	TIVE-LTC+Jurkat	2,80 x10 ⁵		1,50 x10 ⁵	90,3	
	TIVE-LTC+Jurkat-tat	2,70 x10 ⁵	2,66	0,50 x10 ⁵	96,4	0,73
	TIVE-LTC+Jurkat-tat	2,60 x10 ⁵		0,50 x10 ⁵	96,3	
96h	TIVE-LTC	3,80 x10 ⁵	52,2**	1,75 x10 ⁵	91,6	4,95
	TIVE-LTC**	1,75 x10 ⁵		1,50 x10 ⁵	85,4	
	TIVE-LTC+Jurkat	5,25 x10 ⁵	28,3	1,75 x10 ⁵	93,7	1,64
	TIVE-LTC+Jurkat	3,50 x10 ⁵		0,75 x10 ⁵	95,9	
	TIVE-LTC+Jurkat-tat	6,45 x10 ⁵	20,7	1,25 x10 ⁵	96,3	0,22
	TIVE-LTC+Jurkat-tat	4,80 x10 ⁵		1,00 x10 ⁵	96,0	

* Células contadas pelo método de exclusão de azul-tripan. ** Durante o período de co-cultivo dessa condição foi necessário descartar um poço em virtude de contaminação por fungo, o que ocasionou redução do número de células para continuidade do experimento. ^a Coeficiente de variação percentual (concentração celular). ^b Coeficiente de variação percentual (taxa de viabilidade)

5.2 Análise de expressão gênica

Para a análise de expressão dos 5 genes selecionados do KSHV, foi empregada a amplificação por qPCR do cDNA produzido a partir do RNA total extraído das células TIVE-LTCs, com análise concomitante da expressão do transcrito do GAPDH para fins de normalização da expressão gênica. Para atestar a eficiência das reações de qPCR e possibilitar comparações entre diferentes reações, em todas as reações executadas também foram amplificados segmentos da ORF-26 do KSHV (que codifica uma proteína do capsídeo viral) a partir de amostras de DNA em curva-padrão gerada por diluição seriada (base 10) de amostra comercial do genoma viral. Em cada reação

foram utilizados 4 μ L de cDNA. Os parâmetros da reação foram descritos na seção de material e métodos.

A Figura 2 representa os gráficos de amplificação da ORF 26 da curva-padrão realizadas nas reações de qPCR para as amostras de cDNA das TIVE-LTCs equivalentes aos 3 períodos de co-cultivos avaliados. Em todas as reações, utilizando limiar de fluorescência (*threshold*) de 0,2, a amostra mais concentrada apresentou Ct de aproximadamente 18.5, enquanto que a menos concentrada obteve Ct ao redor de 28.5, mantendo variação de aproximadamente 3 ciclos entre os pontos da curva. Nota-se também que todas as amostras alcançaram um mesmo patamar máximo de limiar de fluorescência, cujo valor está em torno de 1,50. Por fim, as reações realizadas apresentaram valores semelhantes de eficiência, *slope* (M) e linearidade da reta (R^2), o que possibilitou a comparação das expressões diferenciais de cada gene, obtidas a partir de diferentes reações.

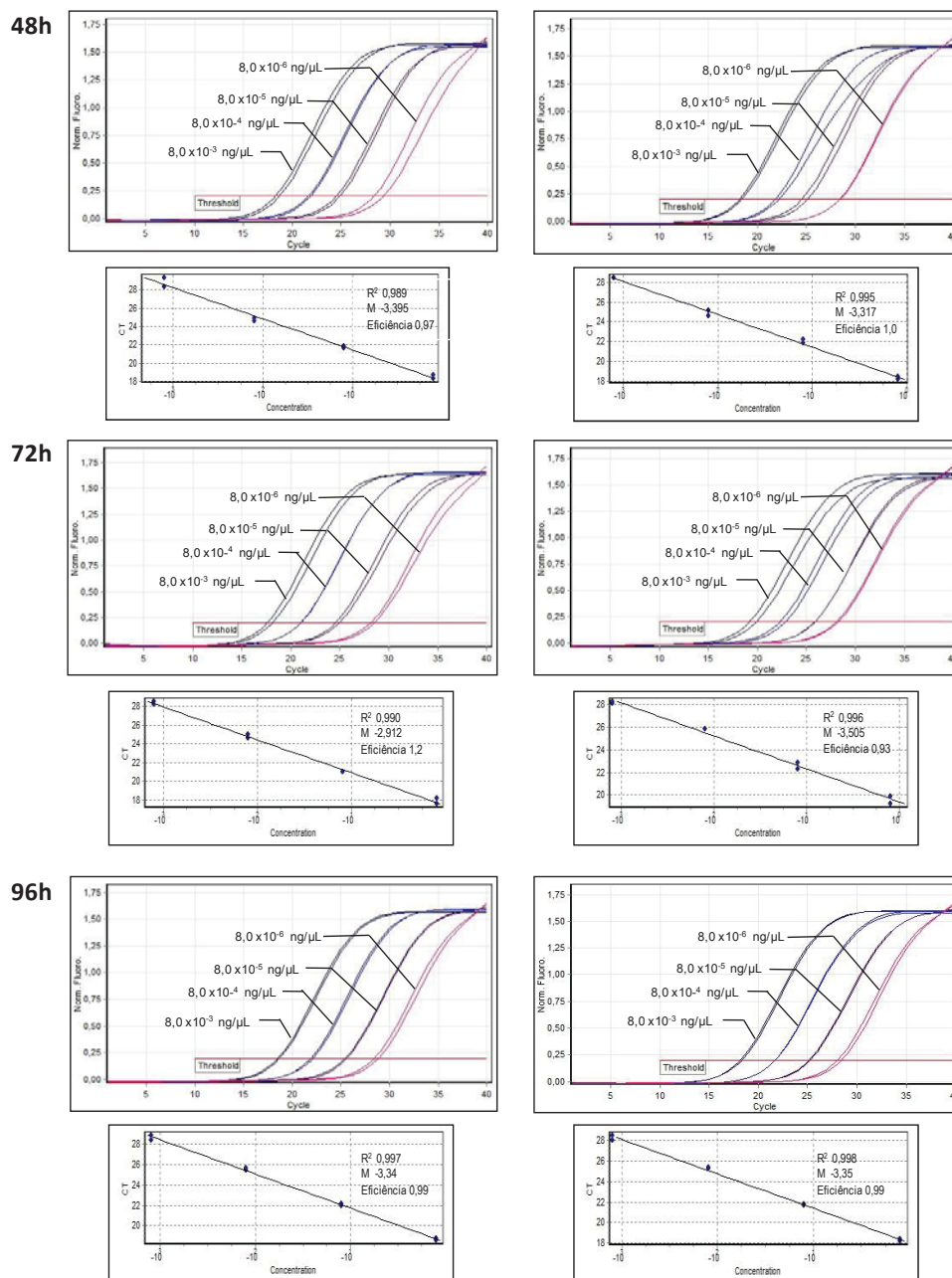


Figura 2: Gráfico de amplificação de segmento da ORF 26 a partir de amostras de DNA da curva-padrão do genoma do KSHV por qPCR. Para fins de análise dos resultados do experimento dos períodos de 48, 72 e 96 horas, respectivamente, foi estabelecido o limiar de fluorescência normalizada (threshold) de 0,2; adicionalmente, os 10 primeiros ciclos de amplificação foram ignorados. Abaixo de cada gráfico está representada a eficiência slope (M) e r^2 de cada reação.

Para a análise da expressão gênica, foi utilizado o mesmo *threshold* definido para a curva-padrão da ORF-26 do KSHV (0,20), a partir do qual foi identificado o ciclo-limiar (Ct) para cada uma das amostras amplificadas. Tendo em vista que cada amostra foi avaliada em duplicatas, nas análises utilizou-se a média dos Cts obtidos das replicatas. Calcularam-se os deltas Cts (Δ Cts) dos cinco alvos para as amostras

TIVE-LTC somente, TIVE-LTC+Jurkat e TIVE-LTC+Jurkat-tat, nos 3 períodos avaliados. Esses cálculos foram efetuados a partir dos Cts médios das amostras subtraídos do Ct médio de seu respectivo normalizador GAPDH ($\Delta\text{Cts} = \text{Ct médio amostra} - \text{Ct médio GAPDH}$). Em seguida foram calculados para cada alvo os $\Delta\Delta\text{Cts}$ ($\Delta\Delta\text{Cts} = \Delta\text{Ct}_{\text{amostra LTC+Jurkat}} - \Delta\text{Ct}_{\text{amostra LTC somente}}$, $\Delta\Delta\text{Cts} = \Delta\text{Ct}_{\text{amostra LTC+Jurkat-tat}} - \Delta\text{Ct}_{\text{amostra LTC somente}}$ e $\Delta\Delta\text{Cts} = \Delta\text{Ct}_{\text{amostra LTC+Jurkat-tat}} - \Delta\text{Ct}_{\text{amostra LTC+Jurkat}}$). A fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ foi então empregada para calcular a expressão diferencial (*fold change*) de cada um dos 5 genes selecionados, nas diferentes relações estabelecidas entre as 3 condições de co-cultivo nos períodos de 48, 72 e 96h.

As Figuras 3, 4 e 5 apresentam os resultados de expressão diferencial dos 5 genes do KSHV nas 3 condições de períodos estabelecidos. São reveladas as expressões diferenciais entre as relações: TIVE-LTC+Jurkat vs TIVE-LTC somente (barra verde), que reflete o efeito do co-cultivo na expressão dos 5 genes do KSHV; TIVE-LTC+Jurkat-tat vs TIVE-LTC somente (barra roxa), que revela o efeito do co-cultivo acrescido da presença da proteína tat do HIV-1; e a relação TIVE-LTC+Jurkat-tat vs TIVE-LTC+Jurkat, que busca evidenciar um eventual efeito da proteína tat do HIV na expressão dos 5 genes do KSHV avaliados.

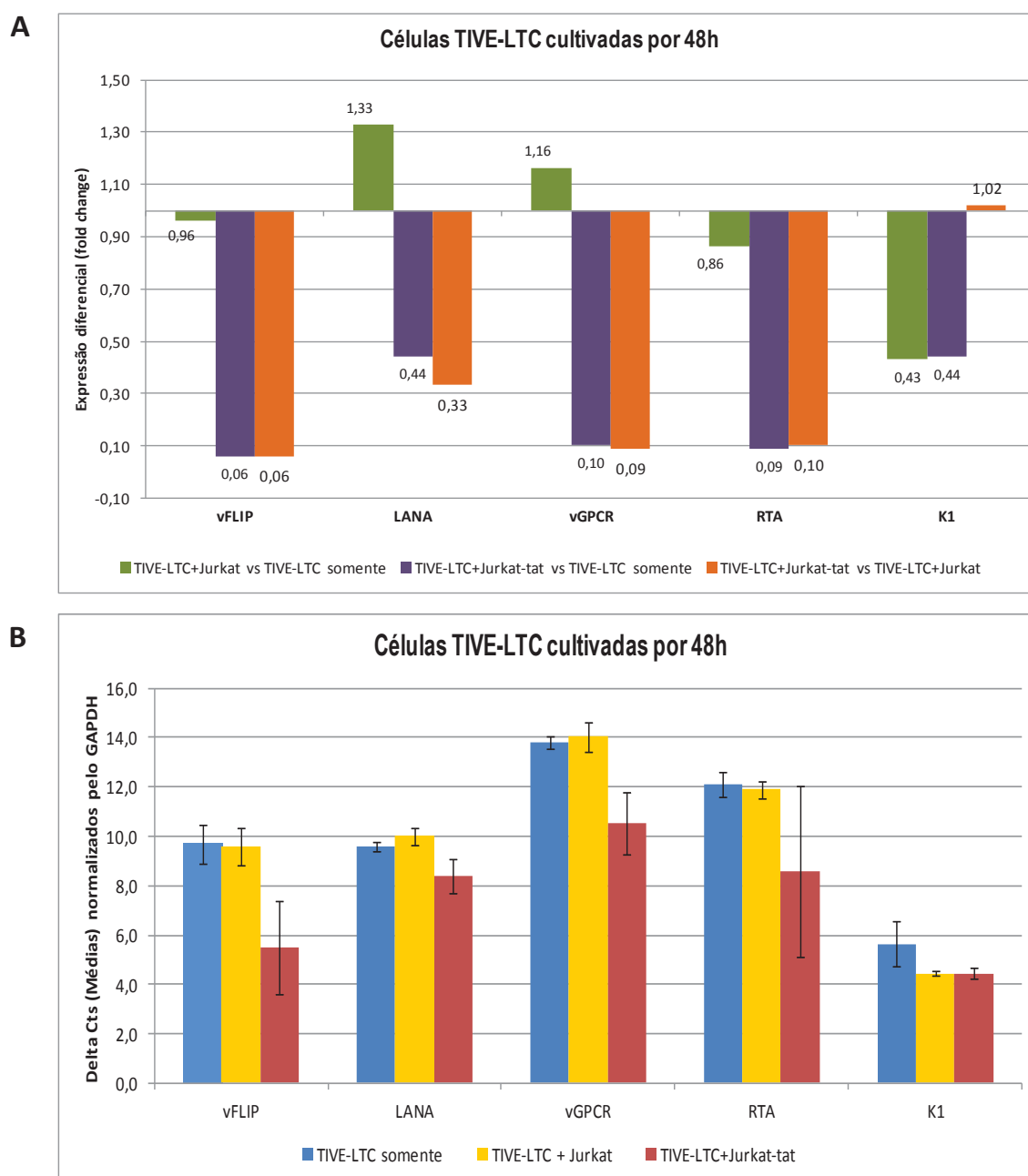


Figura 3: Análise dos dados obtidos com as reações de qPCR para os genes vFLIP, LANA, vGPCR, Rta e K1 do KSHV, após 48h de co-cultivo com a Jurkat ou Jurkat-tat. (A) Expressão diferencial dos transcritos dos genes estudados do KSHV nas TIVE-LTC co-cultivadas por 48 horas com Jurkat ou Jurkat-tat. A expressão de GAPDH foi utilizada para normalização dos resultados e as análises foram realizadas utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (B) Média dos ΔCt normalizados pelo GAPDH.

Na Figura 3A estão representados os resultados obtidos das TIVE-LTCs após 48h de co-cultivo com Jurkat ou Jurkat-tat. Nesse período observou-se que o co-cultivo das TIVE-LTCs, tanto com a Jurkat quanto com a Jurkat-tat, propiciou diminuição da expressão diferencial do gene de K1. Entretanto, não há variação na expressão diferencial de K1 quando se analisa a relação entre TIVE-LTC+Jurkat vs TIVE-

LTC+Jurkat-tat, sugerindo que possivelmente tat do HIV-1 não teve efeito sobre a expressão diferencial de K1 nesse período do presente modelo. Já para a expressão diferencial dos genes codificadores de LANA e vGPCR, enquanto o co-cultivo com Jurkat ocasionou discreto aumento de sua expressão diferencial, o co-cultivo com Jurkat-tat propiciou o efeito inverso. Digno de nota, a diminuição da expressão diferencial se tornou um pouco mais pronunciada na relação entre TIVE-LTC+Jurkat e TIVE-LTC+Jurkat-tat, suscitando efeito da proteína tat do HIV-1 como regulador negativo da expressão de LANA e vGPCR em TIVE-LTC em 48h. Para Rta e vFLIP do KSHV, em todas as condições avaliadas foi observada diminuição na expressão diferencial de seus respectivos genes. Assim sendo, podemos inferir que a proteína tat do HIV é responsável pela diminuição da expressão diferencial tanto dos genes latentes vFLIP e LANA como dos líticos vGPCR e Rta, com exceção do gene K1. A Figura 3B revela que não houve valores importantes de desvios-padrão dos Δ Cts normalizados de vFLIP, LANA, vGPCR e K1, conferindo maior confiabilidade aos dados de expressão diferencial obtidos para os respectivos genes. Para Rta, entretanto, a importante variação entre as réplicas explicitada pelo desvio-padrão compromete o resultado e requer nova avaliação em momento oportuno.

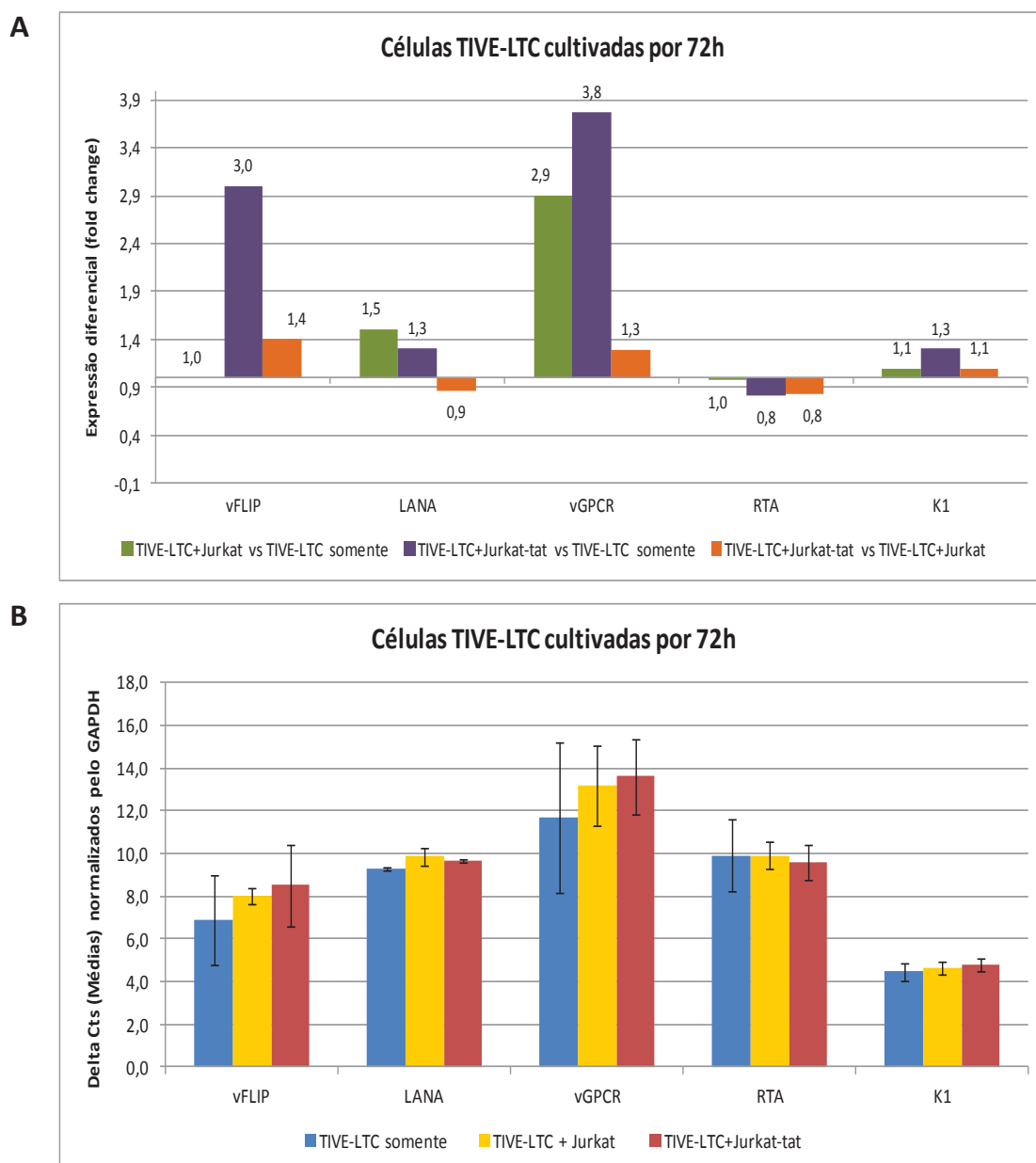


Figura 4: Análise dos dados obtidos com as reações de qPCR para os genes vFLIP,, LANA, vGPCR, RTA e K1 do KSHV, após 72h de co-cultivo com a Jurkat ou Jurkat-tat. (A) Expressão diferencial dos transcritos dos genes estudados do KSHV nas TIVE-LTC co-cultivadas por 72 horas com Jurkat ou Jurkat-tat. A expressão de GAPDH foi utilizada para normalização dos resultados e as análises foram realizadas utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (B) Média dos ΔCt normalizados pelo GAPDH.

Os resultados obtidos em 72h de co-cultivo de TIVE-LTCs com Jurkat ou Jurkat-tat estão apresentados na Figura 4A. O co-cultivo de TIVE-LTCs com Jurkat não alterou a expressão diferencial de vFLIP, Rta e K1. Adicionalmente, também o co-cultivo com Jurkat-tat não modificou substancialmente os níveis de expressão diferencial de LANA, Rta e K1. Por outro lado, os dados sugerem que o co-cultivo de TIVE-LTCs com Jurkat ou Jurkat-tat tenha aumentado a expressão diferencial do gene

lítico vGPCR. Para vFLIP, apenas o co-cultivo com Jurkat-tat proporcionou aumento na expressão diferencial. Na Figura 4B, entretanto, é possível observar valores relevantes nos desvios para os Δ Cts de vGPCR e vFLIP, o que impede considerar fidedignos e biologicamente relevantes os resultados de expressão desses genes nas TIVE-LTCs. Na relação entre TIVE-LTC+Jurkat-tat vs TIVE-LTC+Jurkat não foram notadas alterações significativas no nível de expressão diferencial de nenhum dos genes em questão, de modo que conclui-se que possivelmente não houve efeitos relevantes de tat do HIV-1 na expressão diferencial dos genes avaliados do KSHV em 72h de cultivo *in vitro*.

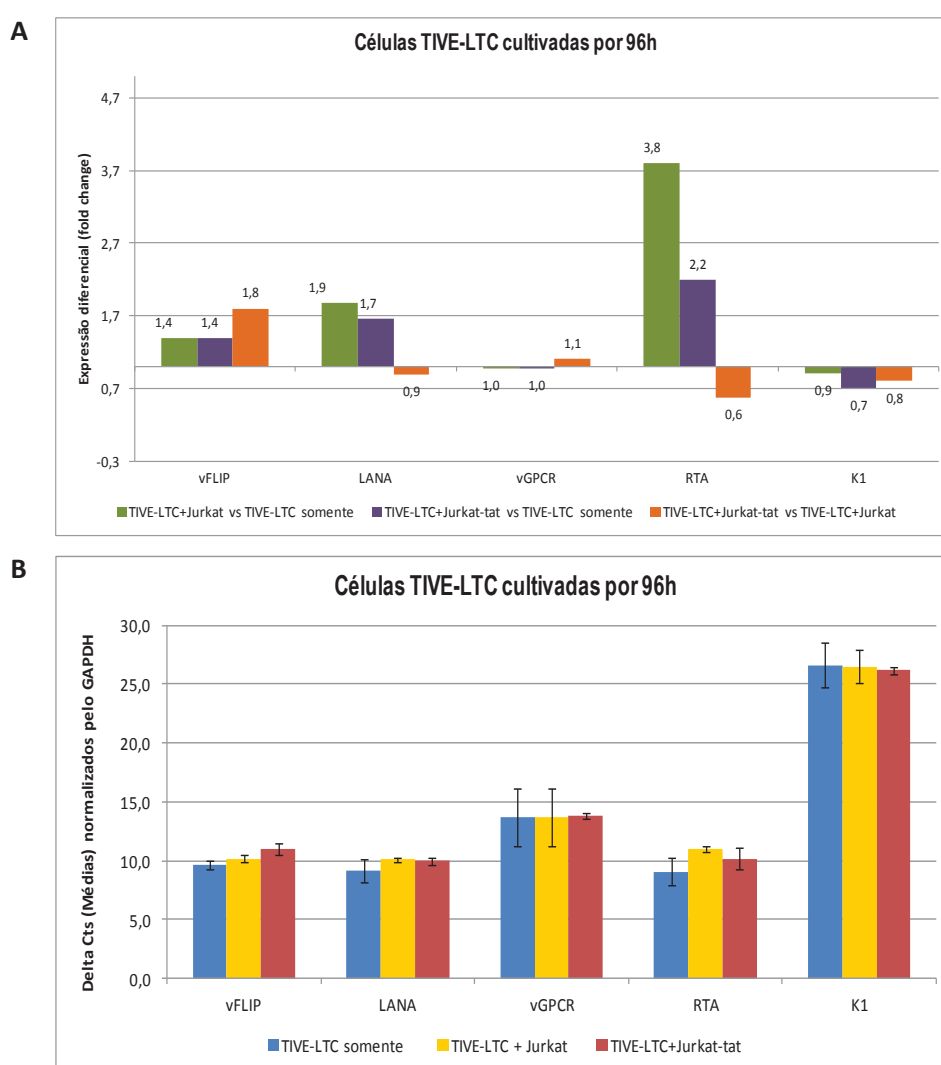


Figura 5: Análise dos dados obtidos com as reações de qPCR para os genes vFLIP, LANA, vGPCR, RTA e K1 do KSHV, após 96h de co-cultivo com a Jurkat ou Jurkat-tat. (A) Expressão diferencial dos transcritos dos genes estudados do KSHV nas TIVE-LTC co-cultivadas por 96 h com Jurkat ou Jurkat-tat. A expressão de GAPDH foi

utilizada para normalização dos resultados e as análises foram realizadas utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (B) Média dos ΔCt normalizados pelo GAPDH.

Em 96h de co-cultivo as expressões diferenciais dos genes de K1 e vGPCR basicamente não apresentaram alterações significativas em nenhuma das relações analisadas (Figura 5A). Para vFLIP, foi notado aumento relevante (1,8 vezes) na expressão diferencial na relação TIVE-LTC+Jurkat-tat vs TIVE-LTC+Jurkat. O co-cultivo de TIVE-LTCs com Jurkat ou Jurkat-tat ocasionou aumento da expressão diferencial dos genes codificadores de LANA e Rta, sendo maior para Rta. Por outro lado, é possível notar que praticamente não houve alteração na expressão diferencial dos genes codificadores de LANA, vGPCR, Rta e K1 na análise da relação TIVE-LTC+Jurkat-tat vs TIVE-LTC+Jurkat (Figura 5A). Saliente-se ainda que os resultados obtidos para vGPCR novamente apresentaram elevada variação, explicitada pelos desvios-padrão obtidos para os ΔCt s normalizados (Figura 5B). Em síntese, em 96h foi verificado um eventual efeito de tat produzida constitutivamente por células Jurkat-tat apenas na expressão diferencial do gene latente codificador da proteína vFLIP do KSHV.

Os dados anteriormente descritos ainda não foram submetidos a tratamento estatístico em virtude de que experimentos posteriores à redação da presente monografia serão realizados a fim de verificar a reprodutibilidade dos resultados obtidos.

6 Discussão

Tradicionalmente, divide-se o ciclo biológico do KSHV em duas fases, denominadas de ciclo latente e ciclo lítico (ou produtivo). O ciclo latente é marcado pela expressão de um número reduzido de genes virais, com destaque para vFLIP e LANA. No ciclo lítico ocorre a replicação do genoma viral e a produção de novas partículas virais infecciosas. Dentre os principais produtos de ciclo lítico do KSHV destacam-se as proteínas Rta, vGPCR e K1⁴.

O KSHV é necessário, porém insuficiente para o desenvolvimento do SK. No SK-AIDS o HIV-1 participa como um importante co-fator para o desenvolvimento e progressão da neoplasia. É descrito na literatura que algumas proteínas do HIV-1 são capazes de interagir com produtos do KSHV, proporcionando aumento da agressividade no SK-AIDS³⁹. A proteína tat do HIV-1, por exemplo, tem como uma de suas funções facilitar a permeabilidade da matriz extracelular, aumentando o poder de infecção pelo KSHV, além de aumentar a replicação e concentração desse vírus na superfície celular⁵⁷.

É descrito na literatura que inúmeros produtos do KSHV, tanto latentes quanto líticos, são capazes de interagir com a proteína tat do HIV-1. No presente estudo foi notada diminuição na expressão diferencial dos genes latentes vFLIP e LANA, bem como do gene lítico vGPCR, no co-cultivo das TIVE-LTCs com as Jurkat-tat por 48h. Nenhuma alteração na expressão diferencial dos genes analisados foi notada em 72h. Em 96h, houve aumento na expressão diferencial apenas de vFLIP, sem alterações significativas em nenhum dos outros genes virais analisados. Embora preliminares, esses dados sugerem que - no modelo experimental empregado - um eventual efeito da proteína retroviral tat nos genes avaliados do KSHV pode não ser perceptível durante todo o tempo de interação de células KSHV-positivas com células infectadas pelo HIV-1.

Não foram identificados na literatura estudos sobre a atuação de tat retroviral nos genes latentes vFLIP e LANA, estudados no presente trabalho. Nos resultados obtidos no presente estudo, é notável que tat provocou a diminuição das expressões diferenciais de vFLIP e LANA nas TIVE-LTCs mantidas em co-cultivo por um período de 48h e aumentou a expressão diferencial apenas de vFLIP em 96h de co-cultivo. Curiosamente, alguns estudos oferecem dados sobre a atuação de genes do KSHV na regulação de tat do HIV-1. Foi relatado que LANA pode ter papel na ativação da LTR do HIV-1, ocasionando aumento transcricional do HIV-1 e, conseqüentemente, de tat⁵⁸.

A transativação da LTR também pode ser efetuada por vFLIP, mediada pela ativação da via clássica de NF- κ B⁶⁵.

Em relação aos genes líticos do KSHV, sabe-se que vGPCR tem um importante papel na angiogênese, contribuindo na progressão do SK. Guo e colaboradores (2004) descreveram que vGPCR tem sua atividade potencializada pela tat do HIV-1⁶⁶. A fim de analisar se a tat teria efeito na tumorigênese mediada por vGPCR, nesse estudo foram realizados experimentos utilizando a linhagem celular GR3, que constitutivamente expressa vGPCR e desenvolve tumores em camundongos nude. Os autores concluíram que a proteína tat não aumenta a expressão do vGPCR, mas favorece sua tumorigênese por potencializar a sinalização intracelular deflagrada por esse gene lítico do KSHV⁶⁷. No presente estudo, em 48h foi notada diminuição da expressão diferencial de vGPCR nas células TIVE-LTCs cultivadas com Jurkat-tat, tanto quando comparadas com TIVE-LTC somente, como quando comparadas com TIVE-LTCs co-cultivadas com células Jurkat. Esse efeito, entretanto, não pode ser verificado em 72h, e não há variação na expressão diferencial de vGPCR nas células avaliadas em 96h de co-cultivo.

É sabido que a reativação do ciclo lítico do KSHV se deve essencialmente à atividade de Rta. Em trabalho publicado em 2002 utilizando linhagens de PEL demonstrou-se que a replicação do HIV-1 favorece a replicação lítica do KSHV. Sabe-se que embora a tat do HIV-1 possa induzir a replicação lítica do KSHV, ela necessita de outros fatores para ativar o promotor do gene de Rta e, conseqüentemente, favorecer a replicação do KSHV em PEL⁶⁷. No presente estudo, a avaliação da expressão diferencial de Rta em 48h não apresentou resultado fidedigno e não houve variação na expressão desse gene do KSHV em 72 e 96h.

O produto da ORF-K1 do KSHV interfere na inflamação, componente essencial na patogênese do SK. Samaniego e colaboradores (2000) demonstraram que K1 ativa a via do NF- κ B; na presença de tat os autores notaram efeito adicional na transcrição de genes NF- κ B-dependentes. Assim, aparentemente K1 do KSHV e tat do HIV-1 podem agir de maneira sinérgica para aumentar o processo inflamatório, favorecendo a progressão do SK⁶⁸. Os resultados obtidos a partir dos experimentos de co-cultivo do presente estudo indicam que a tat não alterou substancialmente a expressão diferencial de K1 em nenhum dos momentos avaliados.

Em síntese, os dados preliminares obtidos sinalizam no sentido da existência de efeito parácrino da proteína tat do HIV-1 na regulação de genes do KSHV. Entretando,

esses resultados devem ser analisados à luz das características e limitações do modelo experimental utilizado. Adicionalmente, é importante notar que os efeitos sugeridos possivelmente são modificados ao longo do tempo, de acordo com o momento do ciclo biológico do KSHV na célula endotelial infectada, ou mesmo oscilações na produção de tat pelas células Jurkat-tat com as quais células TIVE-LTCs foram co-cultivadas. Os dados preliminares apresentados serão acrescidos de resultados de novos experimentos, a fim de se averiguar sua consistência e eventualmente confirmar a interferência suspeitada de tat sobre a regulação dos genes do KSHV selecionados no modelo de co-cultivo de células TIVE-LTCs com células Jurkat expressando ou não constitutivamente a proteína tat do HIV-1.

7 Conclusões

- No presente modelo de co-cultivo de TIVE-LTCs com células Jurkat ou Jurkat-tat, os resultados obtidos em 48h sugerem que a proteína tat do HIV-1 ocasionou diminuição da expressão dos genes latentes codificadores de vFLIP e LANA, além do gene lítico codificador de vGPCR.
 - Em 72h a proteína tat do HIV-1 não provocou alteração na expressão dos genes latentes e líticos avaliados.
 - As análises efetuadas em 96h sugerem modificação apenas na expressão diferencial do gene latente codificador de vFLIP do KSHV.
 - Em síntese, é possível sugerir que alterações consideráveis ocorreram em 48h, mas não se mantiveram nos demais períodos avaliados. Tal comportamento está provavelmente relacionado à dinâmica do ciclo biológico do KSHV nas células TIVE-LTCs, ou oscilações na produção de tat pelas células Jurkat-tat durante o co-cultivo.
-

8 Referências Bibliográficas

- ¹ Chang Y, Cesarman E, Pessin M S, et. al. Identification of herpesvirus-like DNA sequence in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*. 1994; 266(5192): 1865-9.
 - ² Edelman D C. Human herpesvirus 8 – A novel human pathogen. *J. Virol* 2005; 2(78): 1-32.
 - ³ Fickenscher H, Fleckenstein B. Herpesvirussaimiri. *PhilosTrans R SocLond B Biol Sci*. 2001;356(1408):545–67.
 - ⁴ Lyubomir A D, Assen L D, Diana P, et. al. Molecular Genetics of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (Human Herpesvirus 8) Epidemiology and Pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003; 67(2):175-212.
 - ⁵ Russo J J, Bohenzky R A, Chien M C, et. al. Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc. Natl. Acad. Sci U S A*. 1996; 93:14862–14867.
 - ⁶ Gessain A, Sudaka A, Biere J, et. al. The Kaposi sarcoma-associated herpes-like virus (human herpesvirus type 8) DNA sequences in multicentric Castleman disease: is there any relevant association in non-human immunodeficiency virus-infected patients? *Blood*. 1996; 87:414-416.
 - ⁷ Kaposi M. Idiopathisches multiples Pigmentsarkom der Haut. *Arch Dermatol Syph*. 1872; 4:265-273.
 - ⁸ Beckstead J H, Wood G S, Fletcher V. Evidence for the origin of Kaposi's sarcoma from lymphatic endothelium. *Am. J. Pathol*. 1985; 119:294-300.
 - ⁹ Ensoli B, Sgadari C, Barillari G, et. al. Biology of Kaposi's sarcoma. *Eur. J. Cancer*. 2001; 37:1251–1269.
 - ¹⁰ Iscovich J, Boffetta P, Brennan P. Classic Kaposi's sarcoma as a first primary neoplasm. *Int. J. Cancer*. 1999; 80:173–177.
 - ¹¹ Antman K, Chang Y. Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med*. 2000; 342(14):1027-1038.
 - ¹² Sternbach G, Varon J. Moritz Kaposi: idiopathic pigmented sarcoma of the skin. *J Emerg Med*. 1995;13:671–4.
 - ¹³ Hengge U R, Ruzicka T, Tyring S K, et. al. Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 2: pathogenesis, Castleman's disease, and pleural effusion lymphoma. *Lancet infect Dis*. 2002; 2(6):344-52.
 - ¹⁴ Ganem D. KSHV Infection and the Pathogenesis of Kaposi's Sarcoma. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*. 2006; 1:273–96.
 - ¹⁵ Folpe A L, Veikkola T, Valtola R, et. al. Vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3): a marker of vascular tumors with presumed lymphatic differentiation, including Kaposi's sarcoma, kaposiform and Dabska-type hemangioendotheliomas, and a subset of angiosarcomas. *Mod Pathol*. 2000; 13(2):180-5.
 - ¹⁶ Parsons CH, Szomju B, Kedes DH. Susceptibility of human fetal mesenchymal stem cells to Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *Blood*. 2004;104:2736–8.
 - ¹⁷ Wu W, Vieira J, Fiore N, et. al. KSHV infection of human hematopoietic progenitor (CD34+) cells: persistence of infection during hematopoiesis in vitro and in vivo. *Blood*. 2006; 108(1):141-51.
-

-
- ¹⁸ Parravicini C, Chandran B, Corbellino M, et. al. Differential viral protein expression in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected diseases: Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castleman disease. *Am. J. Pathol.* 2000; 156:743–749.
- ¹⁹ Pan H, Zhou F, Gao S J. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induction of chromosome instability in primary human endothelial cells. *Cancer Res.* 2004; 64:4064–4068.
- ²⁰ Hu J, Garber A C, Renne R. The latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus supports latent DNA replication in dividing cells. *J. Virol.* 2002; 76(22):11677-87.
- ²¹ Fujimuro M, Hayward S D. The latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus manipulates the activity of glycogen synthase kinase-3beta. *J. Virol.* 2003; 77(14):8019-30.
- ²² Friborg J Jr, Kong W, Hottiger MO, et. al. p53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death. *Nature.* 1999; 402:889–94.
- ²³ Radkov S A, Kellam P, Boshoff C. The latent nuclear antigen of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus targets the retinoblastoma- E2F pathway and with the oncogene Hras transforms primary rat cells. *Nat. Med.* 2000; 6:1121–1127.
- ²⁴ An J, Lichtenstein AK, Brent G, et. al. The Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) induces cellular interleukin 6 expression: role of the KSHV latency-associated nuclear antigen and the AP1 response element. *Blood.* 2002;99:649–54.
- ²⁵ Watanabe T, Sugaya M, Atkins AM, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen prolongs the life span of primary human umbilical vein endothelial cells. *J. Virol.* 2003; 77:6188–96.
- ²⁶ Verma SC, Borah S, Robertson ES. Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus up-regulates transcription of human telomerase reverse transcriptase promoter through interaction with transcription factor Sp1. *J Virol.* 2004; 78:10348–59.
- ²⁷ Li X, Liang D, Lin X, et. al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded latency-associated nuclear antigen reduces interleukin-8 expression in endothelial cells and impairs neutrophil chemotaxis by degrading nuclear p65. *J. Virol.* 2011.
- ²⁸ Liao Q, Wu Y, et. al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded LANA down-regulates IL-22R1 expression through a cis-acting element within the promoter region. *PLoS One.* 2011; 6 (4):e19106.
- ²⁹ Djerbi M, Screpanti V, Catrina A I, et. al. The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors. *J. Exp. Med.* 1999; 190:1025–1032.
- ³⁰ de Oliveira D E, Ballon G, Cesarman E. NF-kappaB signaling modulation by EBV and KSHV. *Trends Microbiol.* 2010; 18(6):248-57. .
- ³¹ Sun Q, Zachariah S, Chaudhary PM. The human herpes virus 8-encoded viral FLICE-inhibitory protein induces cellular transformation via NF-kappaB activation. *J Biol Chem.* 2003;278:52437–45.
-

-
- ³² Grossmann C, Ganem D. Effects of NFkappaB activation on KSHV latency and lytic reactivation are complex and context-dependent. *Virology*. 2008; 375(1): 94-102.
- ³³ Li Y L, et. al. Human herpesvirus 8 viral FLICE-inhibitory protein retards cell proliferation via downregulation of Id2 and Id3 expression. *Mol Cell Biochem*. 2010; 343(1-2):83-9.
- ³⁴ Lukac DM, Renne R, Kirshner JR, et. al. Reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection from latency by expression of the ORF50 transactivator, a homolog of the EBV R protein. *Virology*. 1998; 252:304-12
- ³⁵ Lin X, Liang D, He Z, et. al. miR-K12-7-5p encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus stabilizes the latent state by targeting viral ORF50/RTA. *PLoS One*. 2011; 6 (1):e16224.
- ³⁶ Lan K, Kuppers DA, Verma SC, et. al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded latency-associated nuclear antigen inhibits lytic replication by targeting Rta: a potential mechanism for virus-mediated control of latency. *J Virol*. 2004; 78:6585-94.
- ³⁷ Gwack, Y, Hwang S, Byun H, et. al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus open reading frame 50 represses p53-induced transcriptional activity and apoptosis. *J. Virol*. 2001;75:6245-6248.
- ³⁸ Arvanitakis L, Geras-Raaka E, Varma A, et. al. Human herpesvirus KSHV encodes a constitutively active G-protein-coupled receptor linked to cell proliferation. *Nature*. 1997; 385:347-350.
- ³⁹ Greene W, Kuhne K, Ye F, et. al. Molecular biology of KSHV in relation to AIDS-associated oncogenesis. *Cancer Treat Res*. 2007; 133:69-127.
- ⁴⁰ Schwarz M, Murphy PM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor constitutively activates NF-kappa B and induces proinflammatory cytokine and chemokine production via a C-terminal signaling determinant. *J. Immunol*. 2001; 167:505-13.
- ⁴¹ Jham B C, Ma T, Hu J, et. al. Amplification of the Angiogenic Signal through the Activation of the TSC/mTOR/HIF Axis by the KSHV vGPCR in Kaposi's Sarcoma. *PLoS One*. 2011; 6 (4):e19103.
- ⁴² Cannon M, Cesarman E, Boshoff C. KSHV G protein-coupled receptor inhibits lytic gene transcription in primary-effusion lymphoma cells via p21-mediated inhibition of Cdk2. *Blood*. 2006;107:277-84.
- ⁴³ Dwyer J, Le Guelte A, Galan M E M, et. al. Remodeling of VE-cadherin junctions by the human herpes virus 8 G-protein coupled receptor. *Oncogene*. 2011; 30 (2):190-200.
- ⁴⁴ He M, Bakken T, Kassimova A, et. al. Focal adhesion kinase is required for KSHV vGPCR signaling. *Mol Carcinog*. 2011.
- ⁴⁵ Lagunoff M, Ganem D. The structure and coding organization of the genomic termini of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Virology*. 1997; 236:147-154.
- ⁴⁶ Wen K W, Damania B. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV): Molecular biology and oncogenesis. *Cancer Lett*. 2010; 289:140-150.
-

-
- ⁴⁷ Lee B S, Alvarez X, Ishido S, et. al. Inhibition of intracellular transport of B cell antigen receptor complexes by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K1, *J. Exp. Med.* 2000; 192:11–21.
- ⁴⁸ Wang L, Wakisaka N, Tomlinson CC, et. al. The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) K1 protein induces expression of angiogenic and invasion factors. *Cancer Res.* 2004; 64(8):2774–81.
- ⁴⁹ Wang L, Dittmer DP, Tomlinson CC, et. al. immortalization of primary endothelial cells by the K1 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Cancer Res.* 2006;66:3658–66.
- ⁵⁰ Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, et. al. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita.* 2010; 46(1):5-14.
- ⁵¹ Weiss R A. Getting to know HIV. *Trop Med Int Health.* 2000; 5(7):A10-5.
- ⁵² Emerman M, Malim M H. HIV-1 regulatory/accessory genes: Keys to unraveling viral and host cell biology. *Science.* 1998; 280:1880-4.
- ⁵³ Schwartz S A, Nair M P N. Current concepts in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999; 6(3):295-305.
- ⁵⁴ Brooks JT, Kaplan JE, Holmes KK, et. al. HIV-associated opportunistic infections-going, going, but not gone: the continued need for prevention and treatment guidelines. *Clin Infect Dis.* 2009;48:609-11.
- ⁵⁵ Mercader M, Nickoloff BJ, Foreman KE. Induction of human immunodeficiency virus 1 replication by human herpesvirus 8. *Arch Pathol Lab Med.* 2001; 125(6):785–9.
- ⁵⁶ Lane B R, Liu J, Bock P J, et. al. Interleukin-8 and growth-regulated oncogene alpha mediate angiogenesis in Kaposi's sarcoma. *J. Virol.* 2002; 76: 11570–11583.
- ⁵⁷ Aoki Y, Tosato G. HIV-1 Tat enhances Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) infectivity. *Blood.* 2004;104:810–4.
- ⁵⁸ Hyun TS, Subramanian C, Cotter M A, et. al. Latency-associated nuclear antigen encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with Tat and activates the long terminal repeat of human immunodeficiency virus type 1 in human cells. *J Virol.* 2001; 75:8761–71.
- ⁵⁹ Caselli E, Galvan M, Santoni F, et. al. Human herpesvirus-8 (Kaposi's sarcoma-associated virus) ORF50 increases in vitro cell susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Gen Virol.* 2003; 84(5):1123–31.
- ⁶⁰ Rubartelli A, Poggi A, Sitia R, et. al. HIV-1 Tat; a polypeptide for all seasons. *Immunol Today.* 1998; 19(12):543-45.
- ⁶¹ Feller L, Wood N H, Lemmer J. HIV-associated Kaposi sarcoma: pathogenic mechanisms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 104(4):521-9.
- ⁶² Huang LM, Chao MF, Chen MY, et. al. Reciprocal regulatory interaction between human herpesvirus 8 and human immunodeficiency virus type 1. *J Biol Chem.* 2001; 276:13427–32.
-

- ⁶³ Fakhari F D, Dittmer D P. Charting latency transcripts in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by whole-genome Real-time quantitative PCR. *J. Virol.* 2002; 76 (12):6213-23.
- ⁶⁴ Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta DeltaC(T)) Method. *Methods.* 2001; 25(4):402-8.
- ⁶⁵ Sun Q, Matta H, Chaudhary P M. Kaposi's sarcoma associated herpes virus-encoded viral FLICE inhibitory protein activates transcription from HIV-1 Long Terminal Repeat via the classical NF-kB pathway and functionally cooperates with Tat. *Retrovirology.* 2005; 2:9.
- ⁶⁶ Guo H G, Pati S, Sadowska M, et. al. Tumorigenesis by human herpesvirus 8 vGPCR is accelerated by human immunodeficiency virus type 1 Tat. *J. Virol.* 2004; 78(17):9336-42.
- ⁶⁷ Varthakavi V, Smith R M, Deng H, et. al. Human immunodeficiency virus type-1 activates lytic cycle replication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus through induction of KSHV Rta. *Virology.* 2002; 297(2):270-80.
- ⁶⁸ Samaniego F, Pati S, Karp J e, et. al. Human herpesvirus 8 K1-associated nuclear factor-kappa B-dependent promoter activity: role in Kaposi's sarcoma inflammation? *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2011; (28)15-23.
-