

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

Análise da expressão de genes selecionados do herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV) em células TIVE-LTC expostas à proteína tat do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1)

ANA PAULA FERRAZ DA SILVA SANTOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira

BOTUCATU - SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

**Análise da expressão de genes selecionados do
herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV) em
células TIVE-LTC expostas à proteína tat do vírus da
imunodeficiência humana (HIV-1)**

ANA PAULA FERRAZ DA SILVA SANTOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira

BOTUCATU - SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Santos, Ana Paula Ferraz da Silva.

Análise da expressão de genes selecionados do herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV) em células TIVE-LTC expostas à proteína tat do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) / Ana Paula Ferraz da Silva Santos. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Deilson Elgui de Oliveira

Capes: 40105008

1. AIDS (Doença). 2. HIV (Virus).. 3. Tumores. 4. Produtos do gene tat do vírus da imunodeficiência humana. 5. Expressão gênica. 6. Reação em cadeia de polimerase.

Palavras-chave: AIDS; Expressão gênica; HIV-1; KSHV/HHV-8; Proteína tat recombinante.

Dedicatória

DEDICATÓRIA

Esta tese é dedicada com carinho:

Aos meus pais Olívio e Maria Helena que me deram a vida e me ensinaram a vive-la com dignidade, que iluminaram o meu caminho com afeto e dedicação, por todos os valores que me ensinaram, e principalmente por terem acreditado em meus sonhos e colaborado para que eles se realizassem.

“ Vocês deixaram seus sonhos para que eu sonhasse. Derramaram lágrimas para que eu fosse feliz. Vocês perderam noites de sono para que eu dormisse tranquila.

Acreditaram em mim, apesar dos meus erros” (Augusto Cury)

Ao meu filho Matheus, meu presentinho divino, fonte da minha felicidade, razão do meu viver. Ele é nó no meu cabelo, o esmalte descascado na minha unha, as olheiras no meu rosto. Ele é o valor do meu trabalho, a vontade de aprender, a minha força, a minha fraqueza, a emoção maior quando me olha. Ele é o meu ontem, o meu hoje, o meu amanhã. A minha dedicação, oração, minha gratidão...A minha vida!

Você foi o melhor resultado do meu doutorado!! A mamãe te ama muito!

“Ser mãe é assumir perante Deus o dom da criação, da doação e do amor incondicional.

Ser mãe é encarnar a divindade na Terra.” (autor desconhecido)

Ao meu esposo André, companheiro de todas as horas, que em todos os momentos difíceis permaneceu ao meu lado, me dando forças para superar os obstáculos. Obrigada por me compreender, respeitar, tolerar e por presentear-me com a família que sempre sonhei. Eu te amo muito!

“Eterno, é tudo que dura uma fração de segundo, mas com tamanha intensidade, que se petrifica, e nenhuma força jamais o resgata” (Carlos Drummond de Andrade)

As minhas irmãs Elaine, Edilaine e Fernanda, aos meus sobrinhos Lucas, Raphael, Felipe, Júlia e Vinícius e aos meus cunhados Gildo, Claudio e Valdeci, anjos enviados por Deus para me dar forças, amor e felicidade. Sem vocês nenhuma conquista teria valor, nenhuma vitória teria sentido! Eu amo vocês!

“O amor da família e a admiração dos amigos é muito mais importante do que a riqueza e os privilégios.” (Charles Kuralt)

*Agradecimentos
Especiais*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus por sempre estar presente em minha vida, iluminando a minha caminhada e permitindo que eu tenha forças, sabedoria, humildade, discernimento e fé para enfrentar os desafios.

“Enquanto houver a vontade de lutar haverá esperança de vencer”

(Santo Agostinho)

Ao meu orientador Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira pelos ensinamentos e pelo exemplo de dedicação a ciência.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Proc. Dr. 2009/18403-9) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ Proc. 471524/2011-5), pelos auxílios financeiros concedidos para a realização desta pesquisa.

À Pós-graduação em Patologia, em especial a Vania Soler e a Dra. Denise Fecchio e a Dra. Márcia Guimarães da Silva por todo o carinho, dedicação, auxílio oferecido a mim.

Aos amigos, Celene, Cristina, Marquinhos e Fernando por todos os momentos de descontração, pelos conselhos e pela amizade.

Aos amigos, Marina, Renata, Natacha e Rafael pelo companheirismo, pela troca de conhecimentos e pelo auxílio nos experimentos. Em especial agradeço a Suzane, por todos os momentos que trabalhamos juntas, pelos ensinamentos que colaboraram com o meu crescimento intelectual e profissional.

Em especial agradeço a Annie, pela grande e inesquecível amizade construída, pelos almoços deliciosos, pelas risadas, desabafos, conselhos, pelo ombro amigo... Obrigada por ter feito parte da minha vida! Já sinto saudade de nossa amizade!

À minha irmã de coração Ana Paula (E.coli), que a tantos anos está presente em minha vida, vibrando com as minhas vitórias e dando forças nas derrotas. Agradeço imensamente a Deus pelos nossos caminhos terem se cruzados! Obrigada pela amizade sincera.

As meninas do TOXICAN, em especial a Rafaela (Rafa) e a Viviane (Vivi) por todos os momentos de descontração, pela conversas e principalmente pelas palavras amigas na hora que mais precisei! Adoro vocês!

AGRADECIMENTOS

Aos meus eternos amigos: Márcia, Mixirica e Ana Luiza, Cristiana, Oscar e Thiago, Karin, Athanásio e Bruno, Adriana e Bruno. Pessoas maravilhosas com quem eu compartilhei tantos momentos bons de minha vida, que me ensinaram o verdadeiro sentido da palavra “amigo”, que me fizeram acreditar na amizade pura e verdadeira. Tenham certeza que cada um de vocês tem um lugarzinho especial dentro do meu coração!! Obrigada por sempre torcerem por mim e acreditarem em meu potencial!

A todas as pessoas aqui não mencionadas, mas que tornaram esse trabalho possível e sempre me apoiaram e torceram pelas minhas conquistas.

MUITO OBRIGADA!

“Talvez não Tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

“Análise da expressão de genes selecionados do herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV) em células TIVE-LTC expostas à proteína tat do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1)”

SUMÁRIO

1	Revisão da Literatura	14
1.1	Sarcoma de Kaposi	14
1.2	Herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi.....	15
1.3	Infecção pelo HIV e aids.....	19
1.4	Interação KSHV e HIV-1.....	24
2	Objetivos.....	27
2.1	Objetivo Geral	27
2.2	Objetivos específicos.....	27
3	Referências Bibliográficas.....	28
4	Manuscrito	35
5	Anexos.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos de Transativação. Figura de Karn & Stoltzius, 2012. (62)	22
Figura 2: Autorregulação da transcrição do HIV-1 por tat. Figura de Karn & Stoltzius, 2012. (62) .	23

Revisão da Literatura

1 Revisão da Literatura

1.1 Sarcoma de Kaposi

Descrito em 1872 pelo dermatologista húngaro Moritz Kaposi (1), o Sarcoma de Kaposi (SK) é uma neoplasia maligna angioproliferativa com importante reação inflamatória. Essa neoplasia decorre de infecção pelo Herpesvírus Humanos tipo 8 (*Human Herpesvirus Type 8* - HHV-8), também denominado Herpesvírus Associado ao Sarcoma de Kaposi (*Kaposi Sarcoma-associated Herpesvirus* - KSHV) (2). Atualmente são descritas quatro formas clínico-epidemiológicas principais da doença: SK clássico, SK endêmico africano, SK iatrogênico e o SK associado a aids. A agressividade da lesão, mortalidade e morbidade, além de fatores individuais como idade, sexo e etnia são alguns elementos que possibilitam distinguir os tipos de SK (3).

O SK clássico tipicamente se manifesta como lesões cutâneas isoladas, geralmente localizadas em membros inferiores, plantas dos pés e tornozelo; raramente acomete órgãos internos e nódulos linfáticos (4). Esse tipo de SK atinge predominantemente homens com idade superior a 50 anos, sendo mais comum no Mediterrâneo e próximo ao Leste Europeu (3). O SK endêmico africano é predominante na África Oriental e Central, acometendo principalmente crianças levando ao comprometimento de vísceras e nódulos linfáticos, de modo a ser mais severo que o SK clássico (5). O SK iatrogênico está relacionado à imunossupressão terapêutica para manutenção do enxerto em pacientes transplantados e pode sofrer remissão espontânea com mudanças no regime de drogas imunossupressoras. O SK associado à síndrome da imunodeficiência adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome* - aids), por sua vez, ocorre em indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (*Human immunodeficiency virus* – HIV) e é a forma mais agressiva da doença, com lesões multifocais e progressão rápida, que podem se espalhar por linfonodos e vísceras (6).

As lesões do SK são compostas por células endoteliais típicas, eritrócitos extravasados, células inflamatórias infiltradas e as células neoplásicas fusiformes as quais apresentam imunofenótipo endotelial, notadamente endotélio linfático (7). O microambiente inflamatório no SK é dado pela ação de várias citocinas inflamatórias, muitas delas secretadas pelas células fusiformes, incluindo o fator básico de crescimento de fibroblastos (*basic Fibroblast Growth Factor* - bFGF),

interleucinas 1 (*Interleukin 1 - IL-1*), 6 (*Interleukin 6 - IL-6*) e 8 (*Interleukin 8 - IL-8*), o fator de necrose tumoral (*Tumor Necrosis Factor – TNF*), interferon gama (*gamma interferon – IFN- γ*); fatores proangiogênicos, como o fator de crescimento do endotélio vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF*), fator de crescimento derivado de plaquetas (*Platelet-derived growth factor - PDGF*); e quimiocinas, como a proteína quimiotática para monócitos 1 (*Monocyte chemotactic protein-1 -MCP-1*) (3). A desregulação desses mediadores químicos acarreta a sobrevivência e propagação das células fusiformes, colaborando com o desenvolvimento do SK.

Além do SK, a infecção pelo KSHV também está associada ao desenvolvimento da doença de Castleman Multicêntrica (*Multicentric Castleman Disease – MCD*) e do Linfoma de Efusão Primária (*Primary Efusion Lymphoma – PEL*) (8–10). A MCD é um raro distúrbio linfoproliferativo policlonal de células B, que acomete os centros germinativos dos nódulos linfáticos e é acompanhado de proliferação vascular com intensidade variável. Também denominado linfoma de cavidades, o PEL perfaz aproximadamente 4% de todos os linfomas não-Hodgkin (*non-Hodgkin's lymphoma – NHL*) e é caracterizado pela proliferação de linfócitos B neoplásicos em cavidades corporais, tais como o espaço pleural, pericárdico e peritoneal. Tanto a MCD como o PEL são mais frequentes em indivíduos portadores do HIV, nos quais se expressam de maneira biologicamente mais agressiva (11).

1.2 Herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi

Diversos vírus foram inicialmente cogitados como agentes etiológicos do SK, incluindo o citomegalovírus (*Cytomegalovirus - CMV*), os herpesvirus humanos tipos 6 e 7 (*Human Herpesvirus Type 6 - HHV-6* e *Human Herpesvirus Type 7 - HHV-7*) e o vírus do papiloma humano (*Human papillomavirus - HPV*) (12). A partir da análise de espécimes biológicos de pacientes com a síndrome de imunodeficiência humana adquirida (aids), em 1994 Chang e colaboradores isolaram um novo herpesvírus, denominado herpesvirus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV) (13). Atualmente o KSHV é detectado em praticamente todos os casos de SK, independentemente da forma clínica (14). Taxonomicamente conhecido como herpesvirus humano tipo 8 (HHV-8), o KSHV é um herpesvírus da subfamília *Gammaherpesvirinae* da qual também fazem parte o vírus de Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus - EBV*) e o herpesvírus saimiri (*Herpesvirus saimiri - HVS*).

O KSHV pertence ao gênero *Rhadnavirus*, assim como o HVS, mas é o primeiro vírus desse gênero a ter humanos como hospedeiros naturais. Tipicamente os herpesvírus gama são linfotrópicos e durante a infecção podem propiciar o aparecimento de células linfoides atípicas, com elevada capacidade de proliferação celular (14).

A partícula viral do KSHV é composta por um nucleocapsídeo icosadeltaédrico de 100-120nm de diâmetro, envolto por um envelope lipídico no qual se inserem glicoproteínas virais. O genoma viral é formado por DNA linear de dupla fita, com cerca de 145 kb em sua região extensa única (*long unique region - LUR*), na qual estão codificados pelo menos 87 genes (15).

O KSHV se destaca pelo elevado número de produtos virais semelhantes a proteínas humanas com importante papel na proliferação, diferenciação, morte celular e modulação da resposta imunitária do hospedeiro. É o caso de pelo menos 11 de suas ORFs (*Open Reading Frame – ORF*) (15,16). O KSHV codifica, por exemplo, uma proteína homóloga ao receptor acoplado a proteína G humana (vGPCR; ORF-K14), um homólogo da interleucina 6 (vIL-6; ORF-K2), homólogos de quimiocinas CC semelhantes à interleucina 8 (vCCLs -1, -2, e -3; ORFs -K6, -K4, -K4.1, respectivamente), homólogos de fatores reguladores de interferon (vIRFs 1, 2, 3 e 4; ORF-K9, -K11.1, -K10.5 e -K10, respectivamente), um homólogo da ciclina D2 (vCyc; ORF-72), um homólogo semelhante a proteínas inibitórias da apoptose (*Inhibitory Apoptosis Proteins – IAPs*) (vIAP; ORF-K7), uma proteína anti-apoptótica semelhante à bcl-2 (vBcl-2; ORF-16), e um homólogo da proteína inibitória semelhante à FLICE (vFLIP; ORF-71/K13) (17).

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 distintos (18). Em células latentemente infectadas não ocorre produção de partículas virais, o DNA viral se estabelece como epissoma nuclear e um número reduzido de genes virais é expresso, como a Kaposina A (ORF-K12), v-FLIP (ORF-71), vCyc (ORF-72) e o antígeno nuclear associado a latência (*Latency-Associated Nuclear Antigen - LANA*) (ORF-73) (19). Na fase lítica o genoma do KSHV encontra-se linearizado, propiciando a expressão de praticamente todo o genoma viral e produção de novas partículas virais. A replicação lítica viral ocorre na orofaringe de humanos

infectados, provavelmente em linfócitos B de tonsilas (20). A transição entre as fases latente e lítica é regulada pelo ativador de replicação e transcrição (*Replication and Transcription Activator* – RTA; ORF-50), essencial e suficiente para a deflagração da fase lítica do ciclo biológico do KSHV (21). Além do RTA, dentre os produtos virais de fase lítica destacam-se a vGPCR (ORF-K14) e a proteína K1 (ORF-K1).

Tanto os produtos virais de fase latente como os de fase lítica podem desempenhar papel importante na transformação celular induzida pelo KSHV. Alguns produtos da fase latente atuam essencialmente estimulando proliferação e sobrevivência das células infectadas. Proteínas do ciclo lítico, por sua vez, subvertem a resposta imunitária do hospedeiro, atuando em mecanismos autócrinos e parácrinos de estimulação celular e favorecendo a inflamação e a angiogênese local, fenômenos críticos para o desenvolvimento tumoral (18).

A principal proteína do KSHV expressa durante o período de infecção latente é LANA (ORF-73), essencial para a segregação do genoma viral durante a divisão celular (22,23). LANA interfere na função de diversas proteínas celulares, ocasionando aumento na proliferação celular e resistência à apoptose. Por exemplo, LANA interage com a Aurora quinase B (*Aurora Kinase B* - AK-B), que atua na maturação dos centrossomos, organização do fuso mitótico, ancoragem das proteínas do fuso ao cinetocoro dos cromossomos e indução de fosforilação da oncoproteína survivina, o que culmina no aumento do número de cópias virais em células B KSHV-positivas (24). LANA contribui no estabelecimento da latência, por exemplo, recrutando correpressores transcricionais para a região promotora da ORF-50 (RTA), de modo a encerrar a expressão de genes de fase lítica e favorecer a manutenção de infecção latente pelo KSHV (25).

Outra proteína pertencente a fase latente de infecção é vFLIP (ORF-71), que é homóloga às FLIPs celulares, inibidoras de receptor de morte indutores da apoptose. vFLIP possui domínios efetores de morte que lhe permite interagir com proteínas adaptadoras como a FADD (*Fas-Associated Death-Domain*), da via Fas/TNFR. Essa interação impede o recrutamento de caspase 8 para FADD e sua ativação, proporcionando o bloqueio da apoptose mediada por Fas (26). vFLIP também bloqueia a apoptose por propiciar fosforilação do complexo de quinases I κ B, ocasionando acúmulo do fator nuclear κ B (*Factor Nuclear kappa B* - NF- κ B) no

núcleo celular, o que estimula a expressão de proteínas anti-apoptóticas (27–29). vFLIP pode ainda ativar o promotor da IL-8 por meio da indução da translocação nuclear das subunidades p65, c-Rel e p50 do NF- κ B, cuja interação com o AP-1 forma um complexo de ativação da transcrição com atividade no promotor da IL-8, culminando com aumento da expressão dessa citocina que promove angiogênese e atua como um fator de crescimento autócrino para essas células (30,31). A ativação de NF- κ B por vFLIP pode também modificar o balanço entre expressão de genes de ciclo latente e lítico do KSHV cruciais na patogênese do SK e de outras doenças associadas ao vírus (32,33).

A entrada no ciclo lítico é controlada pela proteína Rta (ORF-50) (34), formada por 691 aa e com 73.7 kDa. Rta é altamente fosforilada e expressa precocemente no ciclo biológico viral. Além de regular sua própria expressão, Rta é necessária e suficiente para interromper a latência e acionar o programa lítico em células latentemente infectadas pelo KSHV (35). Rta contribui para aumento da sobrevivência da célula infectada pelo KSHV por transativar o gene codificador da proteína antiapoptótica bcl-2. Assim, o KSHV se utiliza da via intrínseca da apoptose para prolongar a sobrevivência de células liticamente infectadas, maximizando a produção de partículas virais (34). Rta também favorece a replicação lítica por meio de estimulação de degradação proteossomal de vFLIP, de modo a restringir a ação desta na ativação de NF- κ B (36).

A vGPCR (ORF-K14) é uma proteína transmembrana presente no ciclo lítico, homóloga viral do receptor para IL-8 (37). Esse receptor deflagra sinalização em várias vias de sinalização, como PKC, PKB, Akt, NF- κ B, e MAPK, aumentando a expressão de genes envolvidos na proliferação, sobrevivência e transformação celular. A vGPCR também aumenta a expressão de citocinas e fatores de crescimento (e.g., IL-6, IL-1 β , IL-8, GM-CSF, TNF- α , VEGF, bFGF e MCP-1), reguladores importantes de fenômenos como a proliferação celular, angiogênese e inflamação (35). De maneira parácrina essas citocinas ativam AKT, ERK, p38 e IKK β , ocasionando hiper-regulação do fator de indução a hipóxia (*Hypoxia Inducible Factor* - HIF) mediada por mTOR. HIF induz aumento da transcrição e secreção de VEGF e, conseqüentemente, promove neovascularização e remodelamento vascular (38). vGPCR também pode induzir bcl-2 via PI3K/Akt, proporcionando aumento da sobrevivência das células latentemente infectadas pelo KSHV, além de torná-las mais susceptíveis aos efeitos proliferativos exercidos pelas citocinas

inflamatórias (39). A sobrevivência celular também é favorecida por vGPCR por meio da ativação da via NF- κ B, tanto em células do PEL como em linfócitos B primários de SK em pacientes HIV-negativos (40).

A proteína K1 (ORF-K1) é uma glicoproteína transmembrana de 289 aa e 46 kDa, expressa principalmente na fase lítica do ciclo biológico do KSHV (41). Estruturalmente K1 possui uma sequência peptídeo-sinal em sua região N-terminal, um domínio extracelular, um domínio transmembrana e uma curta cauda citoplasmática em sua região C-terminal, na qual se localiza um motivo de ativação baseada em tirosina de imunorreceptor (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif* - ITAM) (42). K1 assemelha-se ao receptor de linfócitos B (*B-cell Receptor* - BCR), podendo iniciar vias de sinalização e mobilização de cálcio intracelulares (43–45). Em células latentemente infectadas, LANA acarreta a supressão de K1 por se ligar à uma região de repetições terminais no promotor da ORF-K1, o que favorece a manutenção da latência (46). Por outro lado, Rta ativa a ORF-K1 ao se ligar ao seu promotor, de modo a reverter a supressão de K1 induzido por LANA e contribuindo assim para a reativação lítica do KSHV (47). Wang e colaboradores descreveram que a proteína K1 aumenta a secreção e expressão de VEGF e MMP-9 em células epiteliais e endoteliais, contribuindo para a angiogênese e a invasão tecidual (48). Além disso, tanto a expressão aumentada de VEGF como a própria K1 do KSHV hiper-regulam a via de sinalização PI3K/Akt (49–51), o que inibe a apoptose. Como a ativação da via de PI3K é crítica para a transformação de várias células humanas, é possível que sua ativação por K1 tenha papel na imortalização de células endoteliais e tumorigênese associada ao KSHV (49), favorecendo a disseminação viral e possivelmente contribuindo na patogênese do SK.

1.3 Infecção pelo HIV e aids

A aids propriamente dita é o estágio final da infecção pelo HIV, caracterizado por imunossupressão severa que proporciona um risco elevado do indivíduo em adquirir infecções oportunistas e neoplasias secundárias. O HIV é um retrovírus do gênero *Lentivirus*, sendo atualmente descritos dois tipos virais principais: o HIV-1 e o HIV-2. O HIV-1 é responsável pela maioria dos casos de aids no mundo; a infecção pelo HIV-2, por sua vez, é menos frequente e ocorre predominantemente em algumas regiões da África Ocidental e Central (52).

O genoma do HIV-1 é composto de duas moléculas idênticas de RNA de cadeia simples envoltas pelo capsídeo viral. Nelas estão codificadas os genes retrovirais básicos *GAG*, *POL* e *ENV*. *GAG* codifica proteínas estruturais p24, p7 e p6 e o p17 da matriz; *POL* codifica enzimas importantes para a replicação do HIV-1 como a transcriptase reversa, a integrase e a protease e *ENV* codifica glicoproteínas que se inserem no envelope e interagem com receptores na superfície da célula alvo (53). O HIV-1 possui ainda uma gama de outros genes, incluindo *TAT* (*Transactivator of Transcription*) e *REV* (*Regulator of Expression of the Virion*) que são expressos precocemente no ciclo biológico do HIV-1 e codificam proteínas regulatórias com papel fundamental na replicação viral. Quatro outros genes codificam proteínas acessórias: o fator negativo (*Negative Factor* – nef), a proteína viral R (*Viral Protein R* - vpr), a proteína viral U (*Viral Protein U* – vpu) e o fator de infectividade viral (*Virus Infectivity factor* – vif) (54).

Além do genoma viral, o nucleocapsídeo do HIV-1 contém uma transcriptase reversa (enzima DNA polimerase dependente de RNA), que propicia o início da replicação viral na célula infectada. Em decorrência da incorporação incorreta de bases, essa enzima é propensa a erros na produção do DNA complementar retroviral, de modo que o HIV-1 apresenta elevada taxa de mutação. Isso acarreta maior variabilidade genômica do vírus, com reflexos no diagnóstico, tratamento e prevenção da infecção retroviral, bem como nas investigações epidemiológicas (52).

As linhagens do HIV-1 podem ser classificadas em dois grupos: macrófago trópicas (M- Trópicas) infectam monócitos/macrófagos e subpopulações de células T de memória e a linfócito trópicas (T- Trópicas) infectam linfócitos T CD₄⁺. Os vírus da linhagem M-trópicas utilizam o receptor CCR5 e apresentam crescimento *in vitro* relativamente lento e são prevalentes principalmente durante a fase assintomática da infecção. Já os vírus da linhagem T- trópicas utilizam o CXCR4 e são altamente citopáticos (55). A infecção de linfócitos T permissivos se faz por meio de moléculas expressas em sua superfície, notadamente a proteína CD4 e receptores para quimiocinas, o CCR5 e o CXCR4. As glicoproteínas gp120 e gp41 do envelope viral se ligam a essas proteínas da célula-alvo, propiciando a fusão do envelope com a membrana plasmática, o que possibilita a entrada do vírus na célula. No citoplasma, o RNA viral serve como molde para a síntese do DNA pró-viral, integrado ao DNA celular pela ação da enzima viral integrase. A protease retroviral auxilia na

formação da maturação das novas partículas virais, tornando-as capazes de infectar outras células suscetíveis (52,56).

Tendo em vista que os linfócitos T CD₄⁺ apresentam funções essenciais na regulação das respostas imunitária celular e humoral, a progressiva destruição dessas células pelo HIV-1 incapacita todo o sistema imunitário aumentando a susceptibilidade do indivíduo à infecção por outros microrganismos (52). Antes da introdução da terapia antiretroviral potente combinada (*Highly Active Antiretroviral Therapy* - HAART) as infecções oportunistas eram as principais responsáveis pela elevada taxa de mortalidade entre os pacientes infectados pelo HIV-1. No entanto, nos últimos anos tem sido observado um aumento da sobrevivência desses pacientes em função de novos protocolos terapêuticos, em especial a HAART. Os antirretrovirais que compõem a HAART incluem drogas inibidoras das enzimas retrovirais (notadamente a protease e a transcriptase reversa), que propiciam uma inibição da replicação retroviral e interrupção da progressão para a aids (57).

A HAART, entretanto, não é suficiente para a eliminação completa do HIV-1 no organismo, que permanece em replicação residual em seus reservatórios biológicos, principalmente tecidos linfoides e sistema nervoso central. Na ausência de tratamento antirretroviral, a replicação do HIV-1 torna-se mais evidente nas células permissivas, principalmente linfócitos T CD₄⁺ ativados. Mesmo na vigência da HAART, a baixa fidelidade do processo de transcrição reversa do genoma retroviral, frequentemente proporciona mutações, que somado a utilização da medicação em concentrações inadequadas, podem possibilitar a emergência de linhagens de HIV-1 resistentes às drogas utilizadas, dificultando o controle da doença (58).

O HIV-1 produz seis proteínas adicionais: tat, rev, nef, vif, vpr e vpu. Enquanto tat e rev são requeridas para replicação, nef, vif, vpr e vpu são normalmente dispensáveis para essa função em muitos dos sistemas *in vitro*; por essa razão são por vezes referidas como proteínas acessórias. Entretanto, essas proteínas frequentemente são necessárias para replicação retroviral e patogênese *in vivo*, desempenhando funções essenciais durante o ciclo biológico do HIV-1. A presença ou ausência dessas proteínas acessórias pode alterar significativamente o curso e severidade da infecção retroviral (59).

A proteína tat do HIV-1 é codificada por dois exons, possui 14kDa e é composta por cinco domínios: os três primeiros são responsáveis por sua ativação,

o quarto capacita-a a como transativador e o quinto (codificado pelo segundo exon) contribui para a infectividade viral e outras funções de tat (60). Tat pode ativar a transcrição do RNA retroviral por diferentes mecanismos, incluindo mudanças conformacionais no sítio de integração pró-viral, interação com elementos responsivos de transativação do HIV-1 (*Trans-Acting Responsive element -TAR*) e ativação da via NF- κ B pela degradação de I κ B α (59). Diferentemente de outras proteínas transativadoras, tat não se liga em sítios no DNA celular, mas sim em TAR, localizada na região longa de repetições terminais (*Long Terminal Repeat – LTR*) do HIV-1 (59,61). Para tanto, tat recruta P-TEFb, um complexo quinase celular (CK9 e ciclina T) que fosforila o domínio C-terminal da RNA polimerase II, ocasionando aumento da sua atividade e da elongação durante a transcrição mediada por tat (59).

O mecanismo de transativação por tat envolve um complexo evento de fosforilação, mediado pela sua ligação ao P-TEFb, que proporciona modificações em fatores positivos e negativos de elongação celular. O início da transcrição do HIV-1 é induzida por NF- κ B, que recruta histonas acetiltransferases para a remoção de restrições de cromatina perto da região promotora. Após essa primeira etapa, o fator de elongação NELF e o complexo Tat/P-TEFb são recrutados para a interação com TAR. O fator de elongação NELF ao se ligar TAR, proporciona inibição da transcrição. No entanto, o complexo P-TEFb (que também é recrutado) causa hiperfosforilação em NELF, culminado com a liberação do elemento TAR, reiniciando a transcrição. Portanto, o complexo Tat/P-TEFb é capaz de estimular a transcrição do HIV-1 por remover o bloqueio de elongação imposto pelo NELF (Figura 1) (62).

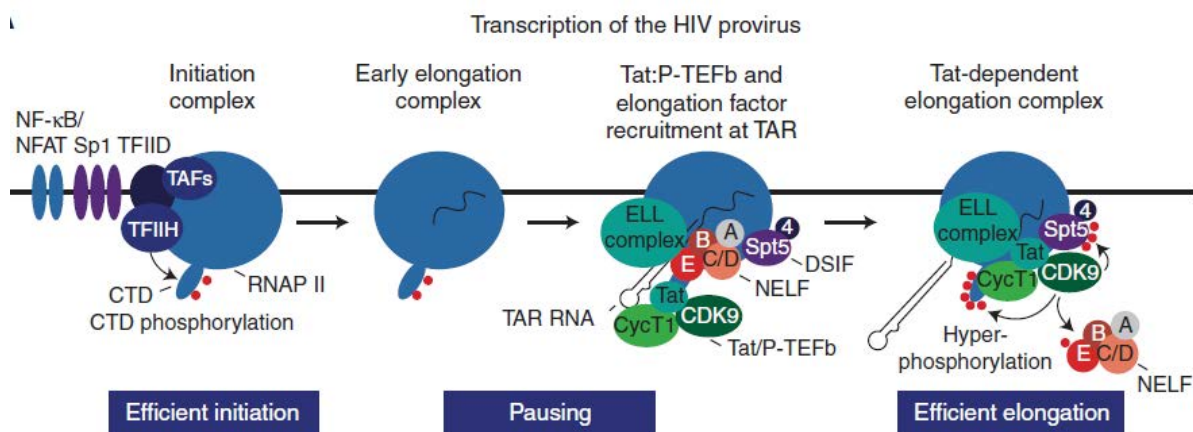


Figura 1: Mecanismos de Transativação. Figura de Karn & Stoltzius, 2012. (62)

Por outro lado, tat proporciona autorregulação da transcrição do HIV-1 (Figura 2): o silenciamento epigenético ou a redução dos níveis de NF- κ B leva a redução dos níveis de tat de modo a inibir a transcrição, conduzindo o vírus para um estado de latência. O restabelecimento dos níveis de NF- κ B, estimula a produção de tat, restaurando a transcrição retroviral.

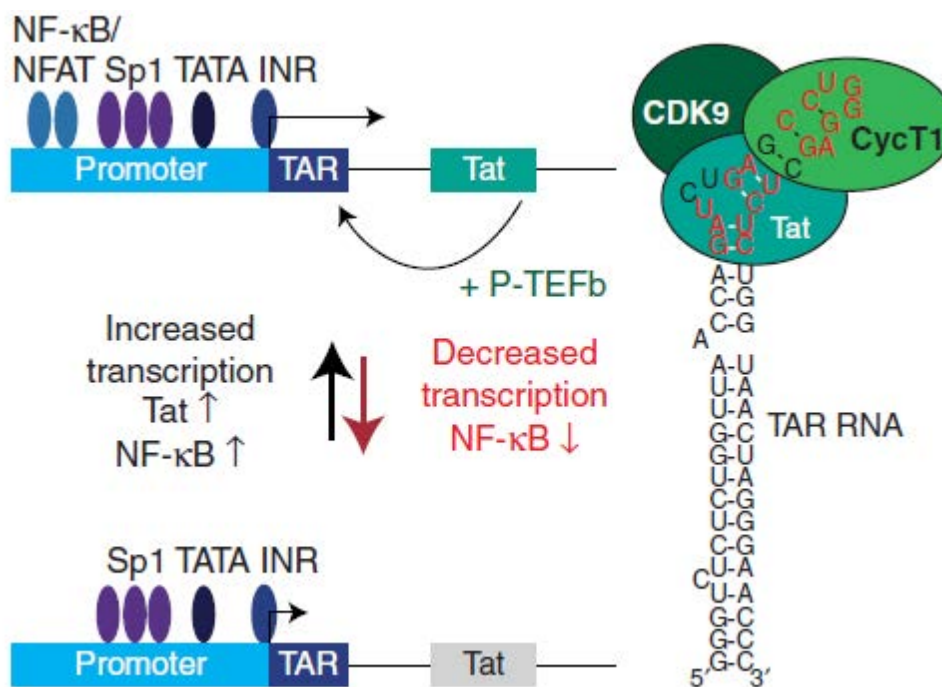


Figura 2: Autorregulação da transcrição do HIV-1 por tat. Figura de Karn & Stoltzius, 2012. (62)

A tat extracelular, liberada pelas células infectadas pelo HIV-1, entra nas células na sua forma ativa. A tat intracelular estimula a atividade transcrricional do LTR do HIV-1 e induz síntese de algumas citocinas, incluindo IL-2, IL-6 e algumas moléculas de adesão endotelial, como ICAM-1, VCAM-1 (63). Tat pode também estimular a angiogênese, a proliferação celular, a quimioinvasão, além de ter atividade neurotóxica no sistema nervoso central e causar a apoptose de células mononucleares de sangue periférico em cultura e de linhagens de células T CD4⁺ (59,64). Tat favorece o desenvolvimento do SK graças a sua atividade estimuladora da angiogênese e de outros fenômenos inflamatórios (63–65). Adicionalmente, tat e a LTR retroviral foram reconhecidos como os principais elementos de interação do HIV-1 com o KSHV, ora favorecendo o ciclo biológico do KSHV, ora do HIV-1, de modo potencializar a ação desses vírus no desenvolvimento de neoplasias malignas humanas, notadamente o SK-AIDS (66).

1.4 Interação KSHV e HIV-1

O KSHV é requerido para o desenvolvimento do SK, com importante papel na transformação das células fusiformes. No entanto, a infecção pelo vírus não é suficiente para o desenvolvimento da doença (14). Por outro lado, sabe-se que o HIV-1 é um cofator importante, pois, embora não tenha potencial oncogênico direto, esse retrovírus pode atuar indiretamente por meio da imunossupressão, pela atividade biológica de suas proteínas e por modificar o padrão de produção de citocinas (67).

Estudos têm demonstrado que a coinfeção KSHV – HIV-1 modula a replicação do HIV-1 (68–70). Isso ocorre por meio da interação entre os dois vírus ou por efeitos resultantes da liberação de fatores celulares em resposta a infecção. A proteína Rta (ORF-50) do KSHV interage sinergicamente com a proteína tat do HIV-1 na transativação de sua LTR, proporcionando o aumento da susceptibilidade celular à infecção retroviral (71). Rta também induz interleucina-6 (IL-6), que estimula a produção da proteína quimiotática de monócitos-1 em macrófagos, aumentando o recrutamento de células suscetíveis à infecção pelo HIV-1 e possivelmente colaborando na distribuição do retrovírus pelo organismo, o que favorece a progressão para aids (72). Por outro lado, a infecção pelo HIV-1 em células BCBL-1 provoca reativação do KSHV por meio da ativação da PI3K/AKT e inativação de PTEN e GSK-3 β . HIV-1 também ativa a via Ras/c-Raf/MEK1/2 MAPK, e a inibição de Ras, c-Raf ou MEK1/2 contribui para a replicação herpesviral. Assim, a via MAPK apresenta um importante papel na replicação do KSHV induzido pelo HIV-1. Ainda, a ativação da via de NF-kB pelo HIV-1 inibe a replicação lítica do KSHV (73).

O SK-AIDS é a forma mais agressiva do SK, o que pode ter relação com algumas propriedades da proteína tat do HIV, que favorece a produção de citocinas inflamatórias e angiogênese. Tat interage com VEGF, ativando o receptor KDR em células fusiformes do SK e células endoteliais, o que contribui para a progressão tumoral no SK-AIDS (74). Adicionalmente, tat aumenta a infectividade do KSHV por diferentes mecanismos (75,76). Um deles envolve o sulfato de heparan (*Heparan Sulfate Proteoglycans* - HSPGs), molécula que permite a adesão do KSHV na célula-alvo, proporcionando aumento da concentração de vírions em sua superfície. A integrina $\alpha_3\beta_1$ também tem sido descrita como correceptor para o KSHV. Posto que tat pode se ligar a essa molécula, sugere-se que a proteína retroviral facilita o

aumento da concentração das partículas do KSHV na superfície celular e, conseqüentemente, sua entrada na célula (77).

Há também relato de que LANA do KSHV coopera com a tat do HIV-1 para ativação da LTR retroviral (78). Além de interagir com LANA, tat tem sua atividade amplificada pela vFLIP do KSHV, o que induz transativação da LTR do HIV-1 pela via clássica de NF- κ B (79). Outra proteína que ativa a expressão do LTR do HIV-1 quando coexpressa com a tat é a KIE2 (ORF-45), sintetizada precocemente pelo KSHV. Por outro lado, as proteínas tat e vpr do HIV-1 aumentam a expressão gênica do KSHV (80).

A vIL-6 (ORF-K2), expressa na fase latente e lítica do ciclo biológico do KSHV pode promover proliferação e sobrevivência celular, angiogênese e tumorigênese. Em cultura, a proteína tat do HIV-1 intensifica os efeitos induzidos pela vIL-6 a partir da regulação da via PI3K/PTEN/AKT/GSK-3 β , ativando a PI3K e AKT e inativando PTEN e GSK-3 β (81). A proteína tat pode ainda acelerar a tumorigênese induzida pela kaposina A do KSHV por diferentes vias de sinalização, destacando MERK/ERK, STAT3 e PI3K/Akt (82). Tat ainda pode hiper-regular a expressão de genes líticos do KSHV como o vGPCR, potente indutor de angiogênese, de modo a compor mecanismo que explica a maior agressividade do SK-AIDS em relação a outras formas da doença (83).

Além da atuação da proteína tat na intensificação dos efeitos induzidos pela vIL-6 a partir da regulação da via de sinalização PI3K/AKT, trabalho publicado por Zhu e colaboradores (2013) demonstrou que a proteína nef do HIV-1 também interage com a vIL-6 promovendo a intensificação da angiogênese e tumorigênese por meio da via PI3K/AKT, sendo esse um mecanismo pelo qual nef pode contribuir para o desenvolvimento do SK-AIDS (84). A proteína nef pode ainda aumentar a expressão do microRNA celular 1258 (hsa-miR-1258), o qual pode agir diretamente na regulação da ORF-50, inibindo a expressão da proteína Rta resultando na inibição da replicação lítica herpesviral e promovendo a sua latência. Então, o eixo Nef/miR-1258/RTA pode contribuir para com a regulação do ciclo de vida do KSHV e com a patogênese do SK-AIDS (85).

As lesões do SK-AIDS são infiltradas por linfócitos TCD₈⁺ e monócitos/macrófagos que produzem altos níveis de interferon- γ (IFN- γ), o qual promove a formação de células fusiformes com fenótipo angiogênico. O IFN- γ e a oncostatina-M (OSM) são estimuladas pela proteína tat e podem promover a

replicação lítica do KSHV, reforçando a hipótese de sua participação na progressão do SK-AIDS (86,87). De modo geral, a proteína tat estimula a proliferação, apresenta efeito antiapoptótico nas células fusiformes infectadas e atua na ativação do KSHV, proporcionando o aumento de sua carga viral e a estimulação de vários genes com potencial oncogênico como o vGPCR, vBCL-2 e vIRF1 (88).

A interação entre o HIV-1 e o KSHV também pode ser observada na via de sinalização JAK/STAT. Em trabalho publicado por Zeng e colaboradores (2007), foi demonstrado que a sinalização IL-4/STAT6 contribui para a replicação do KSHV induzida pela proteína tat em células BCBL-1. A ativação dessa sinalização pode proporcionar morte celular. Uma vez que os autores não observaram alteração no número ou viabilidade celular em seus experimentos, sugeriram que a ausência de morte celular possa ser decorrente de atividade da via IL-6/STAT3 e de proteínas do KSHV, que exercem papel antiapoptótico e neutralizam o efeito deletério da ativação de IL-4/STAT6. Por esse mecanismo, a proteína tat participa da patogênese do SK induzindo replicação e aumento da carga viral do KSHV (89).

A despeito dessas informações, ainda não estão adequadamente elucidados os mecanismos de interação de produtos do KSHV e do HIV-1. Essencialmente, isso decorre do fato do KSHV infectar preferencialmente linfócitos B, células epiteliais, queratinócitos, células endoteliais e células neoplásicas do SK, enquanto que o HIV-1 infecta principalmente linfócitos T CD4⁺, células dendríticas e mononucleares (80). Também são escassos os dados sobre os efeitos da interação entre as células infectadas pelo KSHV e células infectadas pelo HIV-1. É plausível que a proteína tat, sintetizada em linfócitos T infectados pelo HIV-1, modifique significativamente a expressão gênica do KSHV em células endoteliais adjacentes, proporcionando alterações fenotípicas que contribuem para o desenvolvimento do SK-AIDS. A avaliação das possíveis alterações na expressão de genes do KSHV associadas à exposição das células infectadas à proteína tat do HIV-1 pode contribuir no entendimento dos mecanismos de interação entre o KSHV e o HIV-1, de modo a favorecer a elucidação da patogênese do SK-AIDS.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo visa verificar a hipótese de que a proteína retroviral tat exerce efeito na expressão de genes selecionados do KSHV (com propriedades oncogênicas descritas na literatura) em células endoteliais cultivadas *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão transcricional *in vitro* de cinco genes do KSHV (vFLIP, LANA, vGPCR, Rta e K1) 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*) expostas a proteína tat recombinante por 12, 24, 48 e 72 h.
 - Descrever as eventuais alterações notadas na expressão dos 5 genes selecionados na presença e na ausência da proteína tat recombinante do HIV-1.
-

3 Referências Bibliográficas

1. Kaposi M. Idiopatisches multiples Pigmentsarcom der Haut. Arch Dermatol Syph. 1972;3:265–73.
 2. Ganem D. KSHV and the pathogenesis of Kaposi sarcoma: listening to human biology and medicine. J Clin Invest. 2010 Apr;120(4):939–49.
 3. Ensoli B, Sgadari C, Barillari G, Sirianni MC, Stürzl M, Monini P. Biology of Kaposi's sarcoma. Eur J Cancer Oxf Engl 1990. 2001 Jul;37(10):1251–69.
 4. Iscovich J, Boffetta P, Brennan P. Classic Kaposi's sarcoma as a first primary neoplasm. Int J Cancer J Int Cancer. 1999 Jan 18;80(2):173–7.
 5. Antman K, Chang Y. Kaposi's sarcoma. N Engl J Med. 2000 Apr 6;342(14):1027–38.
 6. Sternbach G, Varon J. Moritz Kaposi: idiopathic pigmented sarcoma of the skin. J Emerg Med. 1995 Oct;13(5):671–4.
 7. Beckstead JH, Wood GS, Fletcher V. Evidence for the origin of Kaposi's sarcoma from lymphatic endothelium. Am J Pathol. 1985 May;119(2):294–300.
 8. Gessain A, Sudaka A, Brière J, Fouchard N, Nicola MA, Rio B, et al. Kaposi sarcoma-associated herpes-like virus (human herpesvirus type 8) DNA sequences in multicentric Castlemann's disease: is there any relevant association in non-human immunodeficiency virus-infected patients? Blood. 1996 Jan 1;87(1):414–6.
 9. Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW, Knowles DM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. N Engl J Med. 1995 May 4;332(18):1186–91.
 10. Soulier J, Grollet L, Oksenhendler E, Cacoub P, Cazals-Hatem D, Babinet P, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castlemann's disease. Blood. 1995 Aug 15;86(4):1276–80.
 11. Du M-Q, Bacon CM, Isaacson PG. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 and lymphoproliferative disorders. J Clin Pathol. 2007 Dec;60(12):1350–7.
 12. Kempf W, Adams V. Viruses in the pathogenesis of Kaposi's sarcoma--a review. Biochem Mol Med. 1996 Jun;58(1):1–12.
 13. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. Science. 1994 Dec 16;266(5192):1865–9.
 14. Hengge UR, Ruzicka T, Tyring SK, Stuschke M, Roggendorf M, Schwartz RA, et al. Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 1: epidemiology, environmental predispositions, clinical manifestations, and therapy. Lancet Infect Dis. 2002 May;2(5):281–92.
-

15. Edelman DC. Human herpesvirus 8--a novel human pathogen. *Virology*. 2005;2:78.
16. Cesarman E, Knowles DM. The role of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in lymphoproliferative diseases. *Semin Cancer Biol*. 1999 Jun;9(3):165–74.
17. Gallo RC. The enigmas of Kaposi's sarcoma. *Science*. 1998 Dec 4;282(5395):1837–9.
18. Dourmishev LA, Dourmishev AL, Palmeri D, Schwartz RA, Lukac DM. Molecular genetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) epidemiology and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 2003 Jun;67(2):175–212, table of contents.
19. Parravicini C, Chandran B, Corbellino M, Berti E, Paulli M, Moore PS, et al. Differential viral protein expression in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected diseases: Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castleman's disease. *Am J Pathol*. 2000 Mar;156(3):743–9.
20. Ganem D. KSHV infection and the pathogenesis of Kaposi's sarcoma. *Annu Rev Pathol*. 2006;1:273–96.
21. Sun R, Lin SF, Gradoville L, Yuan Y, Zhu F, Miller G. A viral gene that activates lytic cycle expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Sep 1;95(18):10866–71.
22. Ballestas ME, Chatis PA, Kaye KM. Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science*. 1999 Apr 23;284(5414):641–4.
23. Verma SC, Cai Q, Kreider E, Lu J, Robertson ES. Comprehensive analysis of LANA interacting proteins essential for viral genome tethering and persistence. *PLoS One*. 2013;8(9):e74662.
24. Lu J, Jha HC, Verma SC, Sun Z, Banerjee S, Dzeng R, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded LANA contributes to viral latent replication by activating phosphorylation of survivin. *J Virol*. 2014 Apr;88(8):4204–17.
25. Sun R, Liang D, Gao Y, Lan K. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded LANA Interacts with Host KAP1 to Facilitate Establishment of Viral Latency. *J Virol*. 2014 Apr 16;
26. Djerbi M, Screpanti V, Catrina AI, Bogen B, Biberfeld P, Grandien A. The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors. *J Exp Med*. 1999 Oct 4;190(7):1025–32.
27. Matta H, Mazzacurati L, Schamus S, Yang T, Sun Q, Chaudhary PM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) oncoprotein K13 bypasses TRAFs and directly interacts with the I κ B kinase complex to selectively activate NF- κ B without JNK activation. *J Biol Chem*. 2007 Aug 24;282(34):24858–65.

28. Sun Q, Matta H, Chaudhary PM. The human herpes virus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein protects against growth factor withdrawal-induced apoptosis via NF-kappa B activation. *Blood*. 2003 Mar 1;101(5):1956–61.
 29. Matta H, Chaudhary PM. Activation of alternative NF-kappa B pathway by human herpes virus 8-encoded Fas-associated death domain-like IL-1 beta-converting enzyme inhibitory protein (vFLIP). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 22;101(25):9399–404.
 30. Masood R, Cai J, Tulpule A, Zheng T, Hamilton A, Sharma S, et al. Interleukin 8 is an autocrine growth factor and a surrogate marker for Kaposi's sarcoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2001 Sep;7(9):2693–702.
 31. Lane BR, Liu J, Bock PJ, Schols D, Coffey MJ, Strieter RM, et al. Interleukin-8 and growth-regulated oncogene alpha mediate angiogenesis in Kaposi's sarcoma. *J Virol*. 2002 Nov;76(22):11570–83.
 32. Sun Q, Matta H, Lu G, Chaudhary PM. Induction of IL-8 expression by human herpesvirus 8 encoded vFLIP K13 via NF-kappaB activation. *Oncogene*. 2006 May 4;25(19):2717–26.
 33. De Oliveira DE, Ballon G, Cesarman E. NF-kappaB signaling modulation by EBV and KSHV. *Trends Microbiol*. 2010 Jun;18(6):248–57.
 34. Lukac DM, Renne R, Kirshner JR, Ganem D. Reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection from latency by expression of the ORF 50 transactivator, a homolog of the EBV R protein. *Virology*. 1998 Dec 20;252(2):304–12.
 35. Greene W, Kuhne K, Ye F, Chen J, Zhou F, Lei X, et al. Molecular biology of KSHV in relation to AIDS-associated oncogenesis. *Cancer Treat Res*. 2007;133:69–127.
 36. Ehrlich ES, Chmura JC, Smith JC, Kalu NN, Hayward GS. KSHV RTA abolishes NFkB responsive gene expression during lytic reactivation by targeting vFLIP for degradation via the proteasome. *PloS One*. 2014;9(3):e91359.
 37. Arvanitakis L, Geras-Raaka E, Varma A, Gershengorn MC, Cesarman E. Human herpesvirus KSHV encodes a constitutively active G-protein-coupled receptor linked to cell proliferation. *Nature*. 1997 Jan 23;385(6614):347–50.
 38. Jham BC, Ma T, Hu J, Chaisuparat R, Friedman ER, Pandolfi PP, 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.
 39. Abboud ER, Shelby BD, Angelova M, Nelson AB, Ferris M, McFerrin HE, et al. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus g protein-coupled receptor enhances endothelial cell survival in part by upregulation of bcl-2. *Ochsner J*. 2013;13(1):66–75.
-

-
40. Azzi S, Smith SS, Dwyer J, Leclair HM, Alexia C, Hebda JK, et al. YGLF motif in the Kaposi sarcoma herpes virus G-protein-coupled receptor adjusts NF- κ B activation and paracrine actions. *Oncogene*. 2013 Dec 2;
 41. Lagunoff M, Ganem D. The structure and coding organization of the genomic termini of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Virology*. 1997 Sep 15;236(1):147–54.
 42. Lee H, Veazey R, Williams K, Li M, Guo J, Neipel F, et al. Dereglulation of cell growth by the K1 gene of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Nat Med*. 1998 Apr;4(4):435–40.
 43. Lee H, Guo J, Li M, Choi JK, DeMaria M, Rosenzweig M, et al. Identification of an immunoreceptor tyrosine-based activation motif of K1 transforming protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Mol Cell Biol*. 1998 Sep;18(9):5219–28.
 44. Lee B-S, Paulose-Murphy M, Chung Y-H, Connlone M, Zeichner S, Jung JU. Suppression of tetradecanoyl phorbol acetate-induced lytic reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by K1 signal transduction. *J Virol*. 2002 Dec;76(23):12185–99.
 45. Lagunoff M, Majeti R, Weiss A, Ganem D. Dereglulated signal transduction by the K1 gene product of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 May 11;96(10):5704–9.
 46. Verma SC, Lan K, Choudhuri T, Robertson ES. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded latency-associated nuclear antigen modulates K1 expression through its cis-acting elements within the terminal repeats. *J Virol*. 2006 Apr;80(7):3445–58.
 47. Bowser BS, DeWire SM, Damania B. Transcriptional regulation of the K1 gene product of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol*. 2002 Dec;76(24):12574–83.
 48. Wang L, Wakisaka N, Tomlinson CC, DeWire SM, Krall S, Pagano JS, et al. The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) K1 protein induces expression of angiogenic and invasion factors. *Cancer Res*. 2004 Apr 15;64(8):2774–81.
 49. Wang L, Dittmer DP, Tomlinson CC, Fakhari FD, Damania B. Immortalization of primary endothelial cells by the K1 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Cancer Res*. 2006 Apr 1;66(7):3658–66.
 50. Lee B-S, Lee S-H, Feng P, Chang H, Cho N-H, Jung JU. Characterization of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K1 signalosome. *J Virol*. 2005 Oct;79(19):12173–84.
 51. Tomlinson CC, Damania B. The K1 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus activates the Akt signaling pathway. *J Virol*. 2004 Feb;78(4):1918–27.
-

-
52. Schwartz SA, Nair MP. Current concepts in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999 May;6(3):295–305.
 53. Weiss RA. Getting to know HIV. *Trop Med Int Health TM IH.* 2000 Jul;5(7):A10–15.
 54. Miller RJ, Cairns JS, Bridges S, Sarver N. Human immunodeficiency virus and AIDS: insights from animal lentiviruses. *J Virol.* 2000 Aug;74(16):7187–95.
 55. Moore JP, Trkola A, Dragic T. Co-receptors for HIV-1 entry. *Curr Opin Immunol.* 1997 Aug;9(4):551–62.
 56. O'Brien SJ, Nelson GW. Human genes that limit AIDS. *Nat Genet.* 2004 Jun;36(6):565–74.
 57. El Safadi Y, Vivet-Boudou V, Marquet R. HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007 Jun;75(4):723–37.
 58. Siliciano RF. Scientific rationale for antiretroviral therapy in 2005: viral reservoirs and resistance evolution. *Top HIV Med Publ Int AIDS Soc USA.* 2005 Sep;13(3):96–100.
 59. Li L, Li HS, Pauza CD, Bukrinsky M, Zhao RY. Roles of HIV-1 auxiliary proteins in viral pathogenesis and host-pathogen interactions. *Cell Res.* 2005 Dec;15(11-12):923–34.
 60. Cullen BR. HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell.* 1998 May 29;93(5):685–92.
 61. Demarchi F, d'Adda di Fagagna F, Falaschi A, Giacca M. Activation of transcription factor NF-kappaB by the Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 1996 Jul;70(7):4427–37.
 62. Karn J, Stoltzfus CM. Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Feb;2(2):a006916.
 63. Dhawan S, Puri RK, Kumar A, Duplan H, Masson JM, Aggarwal BB. Human immunodeficiency virus-1-tat protein induces the cell surface expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 in human endothelial cells. *Blood.* 1997 Aug 15;90(4):1535–44.
 64. Rubartelli A, Poggi A, Sitia R, Zocchi MR. HIV-I Tat: a polypeptide for all seasons. *Immunol Today.* 1998 Dec;19(12):543–5.
 65. Guo H-G, Pati S, Sadowska M, Charurat M, Reitz M. Tumorigenesis by human herpesvirus 8 vGPCR is accelerated by human immunodeficiency virus type 1 Tat. *J Virol.* 2004 Sep;78(17):9336–42.
 66. Da Silva SR, de Oliveira DE. HIV, EBV and KSHV: viral cooperation in the pathogenesis of human malignancies. *Cancer Lett.* 2011 Jun 28;305(2):175–85.
-

67. Salvi R, Garbuglia AR, Di Caro A, Pulciani S, Montella F, Benedetto A. Grossly defective nef gene sequences in a human immunodeficiency virus type 1-seropositive long-term nonprogressor. *J Virol*. 1998 May;72(5):3646–57.
 68. Caselli E, Galvan M, Cassai E, Caruso A, Sighinolfi L, Di Luca D. Human herpesvirus 8 enhances human immunodeficiency virus replication in acutely infected cells and induces reactivation in latently infected cells. *Blood*. 2005 Oct 15;106(8):2790–7.
 69. Caselli E, Galvan M, Cassai E, Di Luca D. Transient expression of human herpesvirus-8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) ORF50 enhances HIV-1 replication. *Intervirology*. 2003;46(3):141–9.
 70. Caselli E, Galvan M, Santoni F, Rotola A, Caruso A, Cassai E, 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 May;84(Pt 5):1123–31.
 71. Caselli E, Menegazzi P, Bracci A, Galvan M, Cassai E, Di Luca D. Human herpesvirus-8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) ORF50 interacts synergistically with the tat gene product in transactivating the human immunodeficiency virus type 1 LTR. *J Gen Virol*. 2001 Aug;82(Pt 8):1965–70.
 72. Zaitseva M, Lee S, Lapham C, Taffs R, King L, Romantseva T, et al. Interferon gamma and interleukin 6 modulate the susceptibility of macrophages to human immunodeficiency virus type 1 infection. *Blood*. 2000 Nov 1;96(9):3109–17.
 73. Zhu X, Zhou F, Qin D, Zeng Y, Lv Z, Yao S, et al. Human immunodeficiency virus type 1 induces lytic cycle replication of Kaposi's-sarcoma-associated herpesvirus: role of Ras/c-Raf/MEK1/2, PI3K/AKT, and NF- κ B signaling pathways. *J Mol Biol*. 2011 Jul 29;410(5):1035–51.
 74. Morini M, Benelli R, Giunciuglio D, Carlone S, Arena G, Noonan DM, et al. Kaposi's sarcoma cells of different etiologic origins respond to HIV-Tat through the Flk-1/KDR (VEGFR-2): relevance in AIDS-KS pathology. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Jun 24;273(1):267–71.
 75. Aoki Y, Tosato G. HIV-1 Tat enhances Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) infectivity. *Blood*. 2004 Aug 1;104(3):810–4.
 76. Fawell S, Seery J, Daikh Y, Moore C, Chen LL, Pepinsky B, et al. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jan 18;91(2):664–8.
 77. Rusnati M, Presta M. HIV-1 Tat protein and endothelium: from protein/cell interaction to AIDS-associated pathologies. *Angiogenesis*. 2002;5(3):141–51.
 78. Hyun TS, Subramanian C, Cotter MA 2nd, Thomas RA, Robertson ES. 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 Sep;75(18):8761–71.
-

-
79. Sun Q, Matta H, Chaudhary PM. Kaposi's sarcoma associated herpes virus-encoded viral FLICE inhibitory protein activates transcription from HIV-1 Long Terminal Repeat via the classical NF-kappaB pathway and functionally cooperates with Tat. *Retrovirology*. 2005;2:9.
 80. Huang LM, Chao MF, Chen MY, Shih Hm, Chiang YP, Chuang CY, et al. Reciprocal regulatory interaction between human herpesvirus 8 and human immunodeficiency virus type 1. *J Biol Chem*. 2001 Apr 20;276(16):13427–32.
 81. Zhou F, Xue M, Qin D, Zhu X, Wang C, Zhu J, et al. HIV-1 Tat promotes Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) vIL-6-induced angiogenesis and tumorigenesis by regulating PI3K/PTEN/AKT/GSK-3 β signaling pathway. *PloS One*. 2013;8(1):e53145.
 82. Chen X, Cheng L, Jia X, Zeng Y, Yao S, Lv Z, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Tat accelerates Kaposi sarcoma-associated herpesvirus Kaposin A-mediated tumorigenesis of transformed fibroblasts in vitro as well as in nude and immunocompetent mice. *Neoplasia N Y N*. 2009 Dec;11(12):1272–84.
 83. Feller L, Wood NH, Lemmer J. HIV-associated Kaposi sarcoma: pathogenic mechanisms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Oct;104(4):521–9.
 84. Zhu X, Guo Y, Yao S, Yan Q, Xue M, Hao T, et al. Synergy between Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) vIL-6 and HIV-1 Nef protein in promotion of angiogenesis and oncogenesis: role of the AKT signaling pathway. *Oncogene*. 2014 Apr 10;33(15):1986–96.
 85. Yan Q, Ma X, Shen C, Cao X, Feng N, Qin D, et al. Inhibition of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic replication by HIV-1 Nef and cellular microRNA hsa-miR-1258. *J Virol*. 2014 May;88(9):4987–5000.
 86. Fiorelli V, Gendelman R, Sirianni MC, Chang HK, Colombini S, Markham PD, et al. gamma-Interferon produced by CD8+ T cells infiltrating Kaposi's sarcoma induces spindle cells with angiogenic phenotype and synergy with human immunodeficiency virus-1 Tat protein: an immune response to human herpesvirus-8 infection? *Blood*. 1998 Feb 1;91(3):956–67.
 87. Ensoli B, Stürzl M, Monini P. Reactivation and role of HHV-8 in Kaposi's sarcoma initiation. *Adv Cancer Res*. 2001;81:161–200.
 88. Pyakurel P, Pak F, Mwakigonja AR, Kaaya E, Biberfeld P. KSHV/HHV-8 and HIV infection in Kaposi's sarcoma development. *Infect Agent Cancer*. 2007;2:4.
 89. Zeng Y, Zhang X, Huang Z, Cheng L, Yao S, Qin D, et al. Intracellular Tat of human immunodeficiency virus type 1 activates lytic cycle replication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: role of JAK/STAT signaling. *J Virol*. 2007 Mar;81(5):2401–17.
-

Manuscrito

ÍNDICE DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

Figura 1: Expressão diferencial dos genes codificadores de vFLIP, LANA, vGPCR, RTA e K1 do KSHV após a exposição à proteína tat do HIV-1 por 12h (A) e 24h (B). Resultados de expressão gênica normalizados pela expressão de <i>ACTB</i> e expressão diferencial estimada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$	45
Figura 2: Expressão diferencial dos genes codificadores de vFLIP, LANA, vGPCR, RTA e K1 do KSHV após a exposição à proteína tat do HIV-1 por 48h (A) e 72h (B). Resultados de expressão gênica normalizados pela expressão de <i>ACTB</i> e expressão diferencial estimada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$	46
Figura 3: Compilação dos dados obtidos de expressão diferencial para os genes vFLIP, LANA, vGPCR, RTA e K1 do KSHV na vigência de exposição à proteína HIV-1 tat recombinante. A magnitude da expressão diferencial foi estimada pela diferença entre a expressão verificada nas TIVE-LTC cultivadas após exposição à proteína tat do HIV-1 em relação à expressão nas células tratadas com a proteína tat denaturada. Resultados de expressão gênica normalizados pela expressão de <i>ACTB</i> e expressão diferencial estimada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$	47
Figura 4: Delineamento experimental da pesquisa.....	53
Figura S 1: Gráficos de amplificação de 3 experimentos representativos da análise de expressão gênica por qRT-PCR da ORF 71 (vFLIP) do KSHV após 12 e 24h de exposição a proteína tat do HIV-1. Amplificação da ORF 71 em células TIVE-LTC expostas à proteína tat recombinante, tat recombinante denaturada ou células TIVE-LTC sem tratamento, nos experimentos I (A e D), II (B e E) e III (C e F), após 12h (A, B e C) e 24h (D, E e F). Actina: gene normalizador <i>ACTB</i> ; Curva Padrão: amostras de diluição seriada (1:10) de DNA genômico do KSHV em concentrações desde 5×10^{-1} ng/ μ L até 5×10^{-4} ng/ μ L, amplificadas para segmento da ORF 26.....	59
Figura S 2: Gráficos de amplificação de 3 experimentos representativos da análise de expressão gênica por qRT-PCR da ORF 71 (vFLIP) do KSHV após 48 e 72h de exposição a proteína tat do HIV-1. Amplificação da ORF 71 em células TIVE-LTC expostas à proteína tat recombinante, tat recombinante denaturada ou células TIVE-LTC sem tratamento, nos experimentos I (A e D), II (B e E) e III (C e F), após 48h (A, B e C) e 72h (D, E e F). Actina: gene normalizador <i>ACTB</i> ; Curva Padrão: amostras de diluição seriada (1:10) de DNA genômico do KSHV em concentrações desde 5×10^{-1} ng/ μ L até 5×10^{-4} ng/ μ L, amplificadas para segmento da ORF 26.	60
Figura S 3: Gráficos de amplificação de 3 experimentos representativos da análise de expressão gênica por qRT-PCR da ORF 73 (LANA) do KSHV após 12 e 24h de exposição a proteína tat do HIV-	

1. Amplificação da ORF 73 em células TIVE-LTC expostas à proteína tat recombinante, tat recombinante denaturada ou células TIVE-LTC sem tratamento, nos experimentos I (A e D), II (B e E) e III (C e F), após 12h (A, B e C) e 24h (D, E e F). Actina: gene normalizador *ACTB*; Curva Padrão: amostras de diluição seriada (1:10) de DNA genômico do KSHV em concentrações desde 5×10^{-1} ng/ μ L até 5×10^{-4} ng/ μ L, amplificadas para segmento da ORF 26. 61

Figura S 4: Gráficos de amplificação de 3 experimentos representativos da análise de expressão gênica por qRT-PCR da ORF 73 (LANA) do KSHV após 48 e 72h de exposição a proteína tat do HIV-1.

1. Amplificação da ORF 73 em células TIVE-LTC expostas à proteína tat recombinante, tat recombinante denaturada ou células TIVE-LTC sem tratamento, nos experimentos I (A e D), II (B e E) e III (C e F), após 48h (A, B e C) e 72h (D, E e F). Actina: gene normalizador *ACTB*; Curva Padrão: amostras de diluição seriada (1:10) de DNA genômico do KSHV em concentrações desde 5×10^{-1} ng/ μ L até 5×10^{-4} ng/ μ L, amplificadas para segmento da ORF 26. 62

Figura S 5: Gráficos de amplificação de 3 experimentos representativos da análise de expressão gênica por qRT-PCR da ORF K14 (vGPCR) do KSHV após 12 e 24h de exposição a proteína tat do HIV-1.

Amplificação da ORF K14 em células TIVE-LTC expostas à proteína tat recombinante, tat recombinante denaturada ou células TIVE-LTC sem tratamento, nos experimentos I (A e D), II (B e E) e III (C e F), após 12h (A, B e C) e 24h (D, E e F). Actina: gene normalizador *ACTB*; Curva Padrão: amostras de diluição seriada (1:10) de DNA genômico do KSHV em concentrações desde 5×10^{-1} ng/ μ L até 5×10^{-4} ng/ μ L, amplificadas para segmento da ORF 26. 63

Figura S 6: Gráficos de amplificação de 3 experimentos representativos da análise de expressão gênica por qRT-PCR da ORF K14 (vGPCR) do KSHV após 48 e 72h de exposição a proteína tat do HIV-1.

Amplificação da ORF K14 em células TIVE-LTC expostas à proteína tat recombinante, tat recombinante denaturada ou células TIVE-LTC sem tratamento, nos experimentos I (A e D), II (B e E) e III (C e F), após 48h (A, B e C) e 72h (D, E e F). Actina: gene normalizador *ACTB*; Curva Padrão: amostras de diluição seriada (1:10) de DNA genômico do KSHV em concentrações desde 5×10^{-1} ng/ μ L até 5×10^{-4} ng/ μ L, amplificadas para segmento da ORF 26. 64

Figura S 7: Gráficos de amplificação de 3 experimentos representativos da análise de expressão gênica por qRT-PCR da ORF 50 (RTA) do KSHV após 12 e 24h de exposição a proteína tat do HIV-1.

Amplificação da ORF 50 em células TIVE-LTC expostas à proteína tat recombinante, tat recombinante denaturada ou células TIVE-LTC sem tratamento, nos experimentos I (A e D), II (B e E) e III (C e F), após 12h (A, B e C) e 24h (D, E e F). Actina: gene normalizador *ACTB*; Curva Padrão: amostras de diluição seriada (1:10) de DNA genômico do KSHV em concentrações desde 5×10^{-1} ng/ μ L até 5×10^{-4} ng/ μ L, amplificadas para segmento da ORF 26. 65

Figura S 8: Gráficos de amplificação de 3 experimentos representativos da análise de expressão gênica por qRT-PCR da ORF 50 (RTA) do KSHV após 48 e 72h de exposição a proteína tat do HIV-1. Amplificação da ORF 50 em células TIVE-LTC expostas à proteína tat recombinante, tat recombinante denaturada ou células TIVE-LTC sem tratamento, nos experimentos I (A e D), II (B e E) e III (C e F), após 48h (A, B e C) e 72h (D, E e F). Actina: gene normalizador *ACTB*; Curva Padrão: amostras de diluição seriada (1:10) de DNA genômico do KSHV em concentrações desde 5×10^{-1} ng/ μ L até 5×10^{-4} ng/ μ L, amplificadas para segmento da ORF 26. 66

Figura S 9: Gráficos de amplificação de 3 experimentos representativos da análise de expressão gênica por qRT-PCR da ORF K1 (K1) do KSHV após 12 e 24h de exposição a proteína tat do HIV-1. Amplificação da ORF K1 em células TIVE-LTC expostas à proteína tat recombinante, tat recombinante denaturada ou células TIVE-LTC sem tratamento, nos experimentos I (A e D), II (B e E) e III (C e F), após 12h (A, B e C) e 24h (D, E e F). Actina: gene normalizador *ACTB*; Curva Padrão: amostras de diluição seriada (1:10) de DNA genômico do KSHV em concentrações desde 5×10^{-1} ng/ μ L até 5×10^{-4} ng/ μ L, amplificadas para segmento da ORF 26. 67

Figura S 10: Gráficos de amplificação de 3 experimentos representativos da análise de expressão gênica por qRT-PCR da ORF K1 (K1) do KSHV após 48 e 72h de exposição a proteína tat do HIV-1. Amplificação da ORF K1 em células TIVE-LTC expostas à proteína tat recombinante, tat recombinante denaturada ou células TIVE-LTC sem tratamento, nos experimentos I (A e D), II (B e E) e III (C e F), após 48h (A, B e C) e 72h (D, E e F). Actina: gene normalizador *ACTB*; Curva Padrão: amostras de diluição seriada (1:10) de DNA genômico do KSHV em concentrações desde 5×10^{-1} ng/ μ L até 5×10^{-4} ng/ μ L, amplificadas para segmento da ORF 26. 68

Quadro S 1: Sequências dos oligonucleotídeos para a análise da expressão dos 5 genes do KSHV em estudo por qPCR..... 69

Tabela S 1: Valores dos Cts gerados a partir da amplificação por qRT-PCR dos cinco genes do KSHV selecionados, nas três condições experimentais avaliadas, para os quatro momentos estudados e em cada um dos três experimentos independentes realizados..... 70

Análise da expressão de genes selecionados do herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV) em células TIVE-LTC expostas à proteína tat do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1).

Ana Paula Ferraz da Silva (Ferraz da Silva, A.P.)^{1*}; Suzane Ramos da Silva (Ramos da Silva, S)¹; Deilson Elgui de Oliveira (Elgui de Oliveira, D.)¹

1. Unidade Botucatu, UNESP - Univ. Estadual Paulista, FMB, Departamento de Patologia, SP, Brasil.

Correspondência:

Ana Paula Ferraz da Silva

ViriCan - Grupo de estudos em Carcinogênese Viral e Biologia dos Cânceres
Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Rua Bento Lopes, s/n - Distrito de Rubião Jr.

Botucatu, SP, CEP 18618-970, Brasil

Tel.: +55 (14) 3880-1573 / FAX: +55 (14) 3815-2348

E-mail: anapaulaferraz.s@gmail.com / Website: <http://virican.net>

Apresentado conforme instruções da revista *Journal of Negative Results in Biomedicine*, exceto que figuras e tabelas são apresentadas no corpo do manuscrito para facilitar a leitura.

Palavras-Chave: HIV-1, proteína tat, KSHV, LANA, vFLIP, RTA, vGPCR, K1, expressão gênica.

RESUMO

Introdução: Pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) apresentam risco aumentado de desenvolverem neoplasias malignas ligadas ao herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV), entre elas o sarcoma de Kaposi (SK). Digno de nota, o sarcoma de Kaposi associado a aids (SK-AIDS) apresenta-se mais agressivo que as outras formas de SK, sugerindo a existência de interação sinérgica entre os produtos do KSHV e do HIV-1. O ciclo biológico do KSHV é dividido em fase latente e lítica. As proteínas vFLIP e LANA expressas na fase latente e as proteínas líticas Rta, vGPCR e K1, apresentam propriedades oncogênicas. Graças a habilidade da proteína tat do HIV-1 em estimular a angiogênese e outros fenômenos inflamatórios, é plausível que esta proteína modifique significativamente a expressão gênica do KSHV, proporcionando alterações fenotípicas que contribuem para o desenvolvimento do SK-AIDS. Para melhor entendimento dos efeitos da proteína tat do HIV-1 em células infectadas pelo KSHV, por meio da análise das reações em cadeia da PCR quantitativa acoplada a transcrição reversa (*Quantitative real time reverse transcriptase polymerase chain reactions* - qRT-PCR), o presente trabalho descreveu as alterações na expressão dos genes codificadores de vFLIP, LANA, Rta, vGPCR 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 recombinante do HIV-1 por 12, 24, 48 e 72h. **Resultados:** Em termos descritivos, a expressões diferencial dos genes latentes na vigência de exposição à proteína tat recombinante do HIV-1 em relação à proteína tat denaturada, aumentou após 12 e 24h para LANA e após 24 e 72h para vFLIP. Para os genes líticos a expressão diferencial aumentou consistentemente até atingir 48h e diminuiu nas próximas 12h para ORF-50. Enquanto que para a ORF-K1 a expressão diferencial aumentou após 12 e 24h e não alterou após 48 e 72h. **Conclusões:** O modelo experimental utilizado para avaliar a expressão gênica apresentou limitações importantes e por essa razão, não foi possível atribuir, de modo confiável, as variações encontradas na análise da expressão gênica do KSHV a um possível efeito da exposição das TIVE-LTCs à proteína tat recombinante do HIV-1.

Introdução

O herpesvírus humano associado ao sarcoma de Kaposi (*Kaposi Sarcoma-associated Herpesvirus* - KSHV) é um herpesvírus da subfamília *Gammaherpesvirinae*. Assim como em outros herpesvírus, o ciclo biológico do KSHV é dividido em fase latente e lítica. Alguns produtos da fase latente, com destaque para as proteínas LANA e vFLIP, atuam essencialmente estimulando proliferação e sobrevivência das células infectadas. Proteínas do ciclo lítico como Rta, vGPCR e K1, por sua vez, têm importante papel interferindo na resposta imunitária do hospedeiro, atuando em mecanismos autócrinos e parácrinos de estimulação celular e favorecendo a inflamação e a angiogênese local [1].

O KSHV é um dos vírus cuja infecção é reconhecida como cancerígena para humanos [2]. Herpesvírus gama tipicamente são linfotrópicos e durante a infecção podem propiciar o aparecimento de células linfoides atípicas, que apresentam elevada capacidade de proliferação [3]. O KSHV é o agente etiológico do sarcoma de Kaposi e alguns distúrbios linfoproliferativos, tais como doença de Castleman Multicêntrica (*Multicentric Castleman Disease* – MCD) e do Linfoma de Efusão Primária (*Primary Effusion Lymphoma* – PEL) [4].

O SK é uma neoplasia maligna angioproliferativa com importante reação inflamatória, as lesões são caracterizadas por neoangiogênese e proliferação das células fusiformes de origem endotelial [5], incluindo células de linhagem linfáticas [6]. Atualmente são descritas quatro formas clínico-epidemiológicas principais da doença: SK clássico, SK endêmico africano, SK iatrogênico e o SK associado a aids (SK-AIDS) [7]. SK-AIDS é mais agressivo clinicamente que os demais tipos de SK que ocorrem em pacientes HIV-negativo, e vários estudos tem sugerido que o HIV-1 tem importante papel nesta patogênese [8], pois, embora o HIV-1 não tenha potencial oncogênico direto, esse retrovírus pode atuar indiretamente por meio da imunossupressão, pela atividade biológica de suas proteínas e por modificar o padrão de produção de citocinas [9]. Em particular, a proteína tat do HIV-1 tem sido apontada como importante produto do HIV-1 que colabora com o desenvolvimento do SK.

A proteína tat possui 14kDa e apresenta domínios responsáveis pela transativação transcricional do LTR, um domínio de localização nuclear responsável pela ligação ao RNA, e um domínio C-terminal necessário para a interação extracelular com a membrana de células não infectadas [10]. Devido ao sinal de localização nuclear, essa proteína é transportada ao núcleo onde se liga a região do elementos responsivos de transativação do HIV-1 (*Trans-Acting Responsive element -TAR*) ativando a transcrição do RNA retroviral. Tat também é capaz de transativar LTR de HIV-1 por meio da ativação direta de NF- κ B [11].

Estudos têm demonstrado que a coinfeção KSHV – HIV-1 ora modula a replicação do HIV-1 ora do KSHV [12–15]. Isso ocorre por meio da interação entre os dois vírus ou por efeitos resultantes da liberação de fatores celulares em resposta a infecção. A proteína Rta (ORF-50) do KSHV interage sinergicamente com a proteína tat do HIV-1 na transativação de sua LTR, proporcionando o aumento da susceptibilidade celular à infecção retroviral [13]. Há também relato de que LANA do KSHV coopera com a tat do HIV-1 para ativação da LTR retroviral [16]. Além de interagir com LANA, tat tem sua atividade amplificada pela vFLIP do KSHV, o que induz transativação da LTR do HIV-1 pela via clássica de NF- κ B [17]. Por outro lado, tat interage com VEGF, ativando o KDR em células fusiformes do SK e células endoteliais, o que contribui para a progressão tumoral no SK-AIDS [18]. Tat ainda pode hiper-regular a expressão de genes líticos do KSHV como o vGPCR, potente indutor de angiogênese, de modo a compor mecanismo que explica a maior agressividade do SK-AIDS em relação a outras formas da doença [19]. A proteína tat pode ainda acelerar a tumorigênese induzida pela kaposina A do KSHV por diferentes vias de sinalização, destacando MERK/ERK, STAT3 e PI3K/Akt [20].

É plausível que a proteína tat, sintetizada em linfócitos T infectados pelo HIV-1, modifique significativamente a expressão de genes do KSHV com potencial oncogênico em células endoteliais adjacentes, proporcionando alterações fenotípicas que colaboram com o desenvolvimento do SK-AIDS. Por esse motivo, hipotetizamos que a proteína tat do HIV-1 exerce efeito na expressão dos genes que sintetizam as proteínas LANA, vFLIP, Rta, vGPCR e K1 em células endoteliais cultivadas *in vitro*, contribuindo para a patogênese do SK-AIDS.

Resultados

No presente estudo, células TIVE-LTC (*Telomerase-immortalized human umbilical vein endothelial cell line – Long Term KSHV infected*) foram expostas à proteína tat recombinante do HIV-1 *in vitro* e os efeitos em termos da expressão dos genes do KSHV LANA, vFLIP, RTA, vGPCR e K1 foram avaliados. Não foi notada variação significativa na concentração de células TIVE-LTC viáveis em nenhuma das condições experimentais e em nenhum dos momentos de análise em cada um dos três experimentos independentes realizados. Ademais, a exposição das células TIVE-LTC à proteína tat recombinante não revelou efeito citotóxico perceptível (dado não mostrado).

As Figuras 1 e 2 apresentam os resultados obtidos das análises de expressão diferencial tomadas três relações: 1) TIVE-LTC + tat *versus* TIVE-LTC + tat denaturada, que visa estimar os efeitos atribuídos ao tratamento com a proteína tat recombinante do HIV-1; 2) TIVE-LTC + tat *versus* TIVE-LTC sem tratamento, a qual visa estimar os efeitos atribuídos ao tratamento com a proteína tat recombinante do HIV-1, eventualmente modificado pela presença de contaminantes (e.g., endotoxinas); e 3) TIVE-LTC + tat denaturada *versus* TIVE-LTC sem tratamento, que busca revelar algum efeito espúrio na expressão dos genes virais analisados atribuídos a contaminantes eventualmente presentes nas alíquotas utilizadas da proteína tat recombinante do HIV-1.

Os experimentos independentes realizados apresentaram elevada variação, conforme verificado nas Figuras 1 e 2. Assim sendo, os resultados de expressão diferencial não foram indicativos de diferenças significativas de expressão gênica para nenhum dos genes do KSHV avaliados, em nenhum dos momentos de análise. Sucintamente, a análise da expressão gênica apresentou os dados descritos a seguir:

- Em 12h de tratamento (Figura 1A), a expressão diferencial na vigência de exposição à proteína tat recombinante do HIV-1 em relação à proteína tat denaturada foi da ordem de 1,8 vez para LANA e RTA e 1,4 vez para K1. Para vFLIP e vGPCR, a exposição à proteína tat

recombinante exerceu efeito igual ou inferior ao da exposição proteína denaturada.

- Em 24h de tratamento (Figura 1B), a expressão diferencial na vigência de exposição à proteína tat recombinante do HIV-1 em relação à proteína tat denaturada foi da ordem de 2,0 vezes para vGPCR, 2,5 vezes para RTA, ambos genes líticos virais. Foi praticamente desprezível a expressão diferencial notada para LANA (1,4 vez), K1 e vFLIP (1,3 vez).
- Em 48h de tratamento (Figura 2A), a expressão diferencial na vigência de exposição à proteína tat recombinante do HIV-1 em relação à proteína tat denaturada foi da ordem de 3,1 vezes para o RTA e 1,3 para vGPCR. Para vFLIP, LANA e K1 não foi observado variação na expressão (0,7; 0,9, e 0,8 vez, respectivamente).
- Em 72h de tratamento (Figura 2B), a expressão diferencial na vigência de exposição à proteína tat recombinante do HIV-1 em relação à proteína tat denaturada foi na ordem de 1,9 vez para vFLIP, 2,1 vezes para vGPCR e 1,6 para RTA. Alteração praticamente desprezível foi encontrado na expressão diferencial de LANA (1,2 vez) e K1 (1,1 vez).

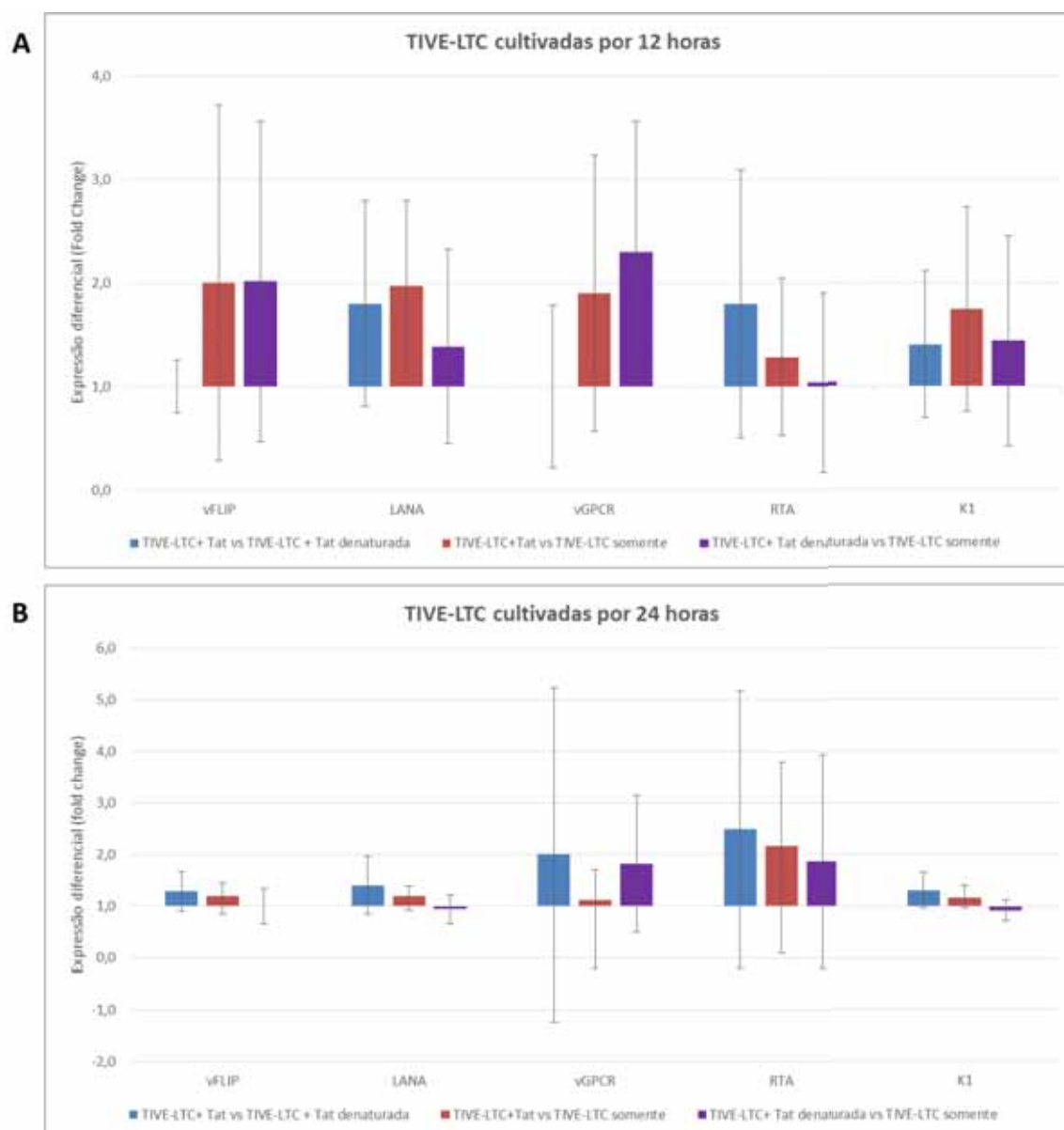


Figura 1: Expressão diferencial dos genes codificadores de vFLIP, LANA, vGPCR, RTA e K1 do KSHV após a exposição à proteína tat do HIV-1 por 12h (A) e 24h (B). Resultados de expressão gênica normalizados pela expressão de *ACTB* e expressão diferencial estimada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

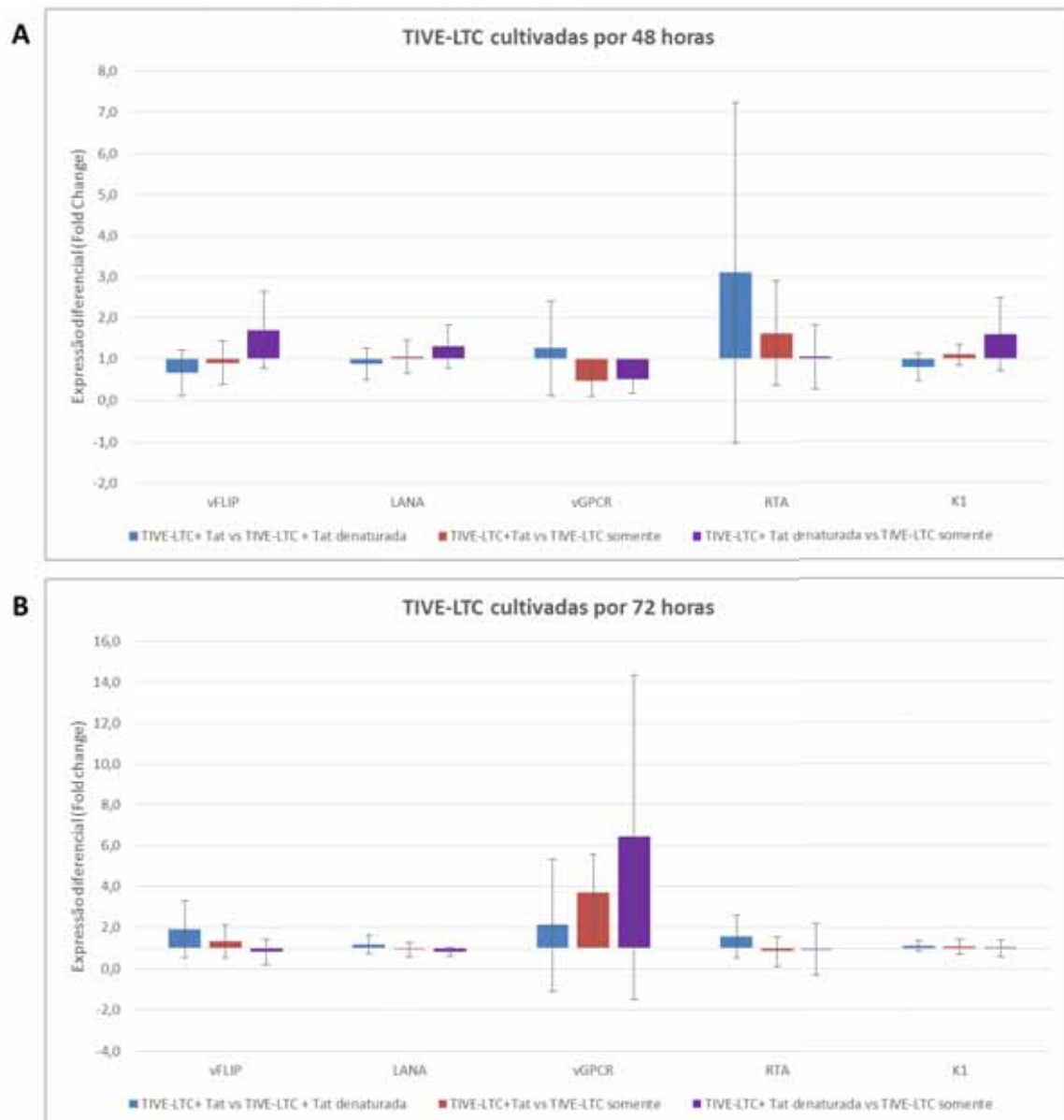


Figura 2: Expressão diferencial dos genes codificadores de vFLIP, LANA, vGPCR, RTA e K1 do KSHV após a exposição à proteína tat do HIV-1 por 48h (A) e 72h (B). Resultados de expressão gênica normalizados pela expressão de *ACTB* e expressão diferencial estimada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

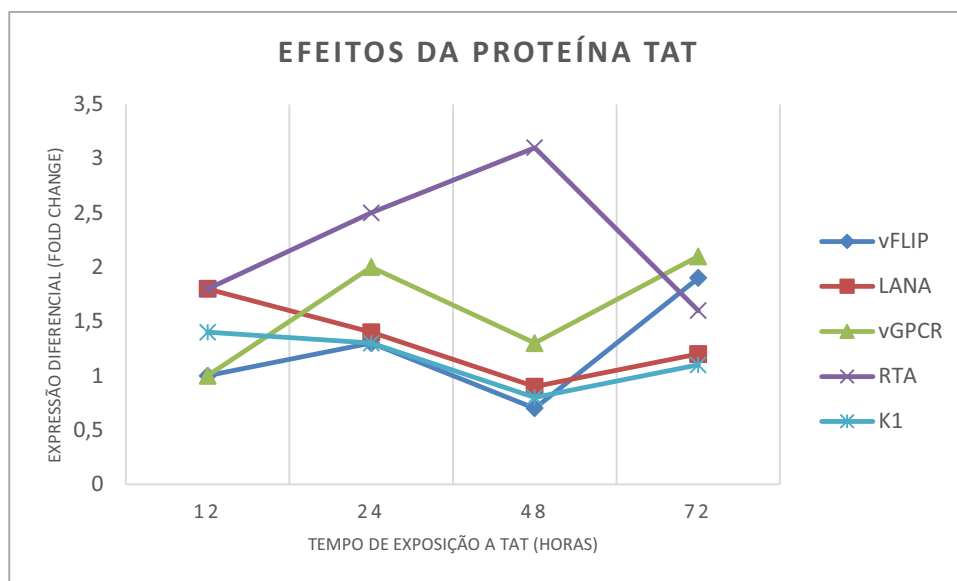


Figura 3: Compilação dos dados obtidos de expressão diferencial para os genes vFLIP, LANA, vGPCR, RTA e K1 do KSHV na vigência de exposição à proteína HIV-1 tat recombinante. A magnitude da expressão diferencial foi estimada pela diferença entre a expressão verificada nas TIVE-LTC cultivadas após exposição à proteína tat do HIV-1 em relação à expressão nas células tratadas com a proteína tat denaturada. Resultados de expressão gênica normalizados pela expressão de *ACTB* e expressão diferencial estimada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Ao analisar a dinâmica da expressão diferencial dos cinco genes virais (Figura 3) foi observado aumento transcricional de RTA até 48h após o início da exposição à proteína tat do HIV-1, seguido de diminuição acentuada nas 24h subsequentes. LANA apresentou comportamento oposto, com diminuição progressiva de expressão nas primeiras 48h e aumento em 72h. Esses resultados estão em sintonia com o esperado para esses genes, na perspectiva de que a indução de ciclo lítico do KSHV pelo RTA diminui o repertório de células latentemente infectadas, que expressam LANA. vFLIP, outro gene viral de fase latente, apresentou comportamento semelhante ao de LANA, diferindo por discreto aumento de expressão em 24h.

Em relação às oscilações na expressão diferencial da ORF-K1 do KSHV, foi observada diminuição nas primeiras 48h e aumento em 72h; entretanto, as mudanças notadas revelaram-se muito discretas. Considerando o aumento de expressão de RTA nesse período (o que sinaliza aumento na fração de células em ciclo lítico viral), esperava-se comportamento oposto ao apresentado para a ORF-

K1 viral. Em tempo, foi observada intermitência na expressão diferencial de vGPCR estimada, que se elevou em 24h, reduziu-se a níveis semelhantes do estimado em 12h e voltou a se elevar em 72h de exposição à proteína tat recombinante do HIV-1. Esse resultado não encontra subsídio no comportamento esperado para esse gene viral, expresso predominantemente em fase lítica do ciclo biológico do KSHV. Adicionalmente, é importante salientar que estimativa de expressão transcricional desse gene por qRT-PCR apresentou a maior variação dentre todos os genes analisados, decorrente de níveis muito baixos de expressão gênica desse alvo em todas as condições experimentais avaliadas.

As Figuras S1 até S10 do Material Suplementar apresentam os gráficos correspondentes aos resultados de amplificação por qRT-PCR dos transcritos de todos os genes virais avaliados, nos três experimentos independentes realizados.

Discussão

O KSHV é necessário mas insuficiente para o desenvolvimento do SK, sendo que o HIV-1 é um importante cofator para o desenvolvimento e progressão do SK-AIDS. Mesmo não apresentando potencial oncogênico direto no SK-AIDS, o HIV-1 pode atuar indiretamente por meio da imunossupressão, pela modificação do padrão de produção de citocinas e pela atividade de suas proteínas [21]. É descrito que proteína tat possui alguns efeitos relacionados ao KSHV, incluindo o favorecimento da replicação herpesviral [22], aumento de proliferação de células infectadas [23], estímulo à progressão tumoral [18] e aceleração da tumorigênese induzida pelas proteínas virais vGPCR e Kaposina A [20, 24]. Por essas razões, admite-se que tat deve contribuir significativamente na patogênese do SK-AIDS.

Os níveis plasmáticos da proteína tat encontrado em indivíduos infectados pelo HIV-1 variam entre 2 e 40 ng/mL [25]. Concentrações entre 2 e 20 ng/mL da proteína tat foram relatadas como eficazes na estimulação da motilidade celular [26], enquanto outros trabalhos demonstraram que 100 ng/mL de tat promovem alterações que contribuem na patogênese viral [27, 28]. Embasados nesses dados, estabelecemos a concentração de 100 ng/mL de tat recombinante para as análises do presente trabalho.

O uso da proteína tat recombinante em modelos de exposição de células *in vitro* apresenta limitações, tais como a biodisponibilidade não-controlada da proteína (que difere da situação *in vivo* na qual há constante produção de tat por células infectadas pelo HIV-1), a eventual presença de endotoxinas e outros contaminantes nas alíquotas da proteína recombinante isolada (relacionados ao isolamento a partir de preparados bacterianos), e a possibilidade de comprometimento de propriedades biológicas em relação à proteína produzida naturalmente em células eucarióticas sob infecção retroviral. Na tentativa de minimizar algumas dessas limitações, no presente estudo realizamos a reposição da proteína tat recombinante a cada 24h e foi incluída a análise da exposição de células TIVE-LTC à proteína tat denaturada para rastrear efeitos espúrios relacionados à presença de contaminantes nas alíquotas da proteína recombinante.

Há também limitações inerentes ao modelo experimental selecionado, com destaque para a dificuldade em se controlar a proporção de células TIVE-LTCs albergando o KSHV em diferentes fases de seu ciclo biológico, o que acarreta diferenças nos níveis basais de expressão gênica viral. Embora a indução de ciclo lítico do KSHV nas células poderia ser considerada uma estratégia válida para se estabelecer uma proporção melhor definida entre células executando ciclo lítico e ciclo latente do KSHV, as abordagens tipicamente empregadas com essa finalidade (e.g., tratamento com TPA) exercem múltiplos efeitos na expressão gênica viral, interferindo na análise da expressão dos genes selecionados do KSHV. Por essa razão, optou-se por efetuar as análises considerando a reativação lítica espontânea viral nas células latentemente infectadas, estimada a ocorrer em cerca de 1% das células endoteliais KSHV-positivas em cultura [29].

Em relação a qualidade analítica dos experimentos de qRT-PCR, todas as reações apresentaram valores semelhantes de eficiência (90-100%), *slope* (-3,6 à -3,2), linearidade da reta (0,99) e patamar máximo de limiar de fluorescência (1,50). Esses parâmetros foram estimados a partir da amplificação de segmento da ORF-26 da curva padrão de KSHV utilizada nas reações. Com base nesses dados pode-se inferir ausência de problemas na execução dos experimentos que possam ter interferido de modo adverso nos resultados obtidos, o que poderia justificar

variações entre os três experimentos independentes realizados. Os dados relativos à qualidade analítica dos experimentos de expressão gênica efetuados estão apresentados no Material Suplementar (Figuras S1-S10 e Tabela S1). Entretanto, a despeito das medidas de controle tomadas, os resultados obtidos na análise da expressão gênica apresentaram elevada variabilidade entre os três experimentos independentes executados, impossibilitando a identificação conclusiva de alterações na expressão dos genes selecionados do KSHV associadas aos tratamentos das células TIVE-LTC com a proteína tat recombinante do HIV-1. Há ainda de se mencionar que a baixa expressão de alguns dos genes avaliados (e.g., vGPCR) inviabilizou a análise de expressão diferencial.

Dados da literatura indicam que a atividade de proteínas do KSHV pode ser modificada pela ação da proteína tat do HIV-1 [30]. Entretanto, até o momento não há estudos que descrevem os efeitos de tat do HIV-1 nos genes codificadores de vFLIP e LANA, duas das principais proteínas virais oncogênicas. Em termos descritivos, no presente estudo a expressão diferencial desses genes latentes na vigência de exposição à proteína tat recombinante do HIV-1 em relação à proteína tat denaturada apresentaram comportamento similar ao longo das avaliações. Em relação aos genes de ciclo latente viral, para LANA e vFLIP foi observado aumento da expressão diferencial após 12 e 24h e após 24 e 72h, respectivamente. Nos demais períodos avaliados não foi observado variações na expressão diferencial para ambos os genes latentes.

A expressão de alguns dos genes líticos avaliados comportou-se de modo similar aos genes latentes: na vigência da exposição à proteína tat recombinante do HIV-1 em relação à proteína tat desnaturada, a expressão da ORF-50 do KSHV aumentou consistentemente até 48h, diminuindo após 72h; para a ORF-K1, a expressão aumentou após 12 e 24h, mantendo-se estável em 48 e 72h.

A proteína Rta é essencial para a reativação do ciclo lítico do KSHV, o que favorece a disseminação do vírus e contribui na patogênese do SK. Varthakavi e colaboradores (2002) demonstraram que tat pode contribuir na ativação do ciclo lítico do KSHV, na dependência de outros fatores produzidos pelo HIV-1, posto que tat é incapaz de ativar sozinha o promotor da ORF-50 (Rta) viral [31].

Há registros na literatura de que a vGPCR tem um importante papel na angiogênese, contribuindo na progressão do SK [19]. Segundo Pati e colaboradores (2003), vGPCR e a proteína tat do HIV-1 agem sinergicamente para a ativação das vias de sinalização NF- κ B e NF-AT. Os efeitos da vGPCR e da proteína tat nessa sinalização são dependentes da via PI3K-AKT [22]. Posteriormente, Guo e colaboradores (2004) descreveram que vGPCR tem sua atividade aumentada pela tat do HIV-1, o que favorece a tumorigênese por potencializar a sinalização intracelular deflagrada por esse gene lítico do KSHV [24]. Em 2007, Feller e colaboradores descreveram que a proteína tat pode aumentar a expressão do vGPCR proporcionando aumento da angiogênese, o que pode explicar a maior agressividade do SK-AIDS [19]. No presente trabalho, os níveis de expressão dos transcritos de vGPCR estiveram demasiadamente baixos em todas as condições experimentais e em todos os momentos de avaliação, o que inviabilizou a avaliação dos potenciais efeitos do tratamento de tat sobre a regulação desse produto do KSHV.

A proteína K1, outro produto lítico do KSHV avaliado no presente estudo, proporciona a ativação da via do NF- κ B, o que acarreta a transcrição de várias proteínas envolvidas com a ativação celular e a inflamação. É descrito que a proteína tat do HIV-1 age sinergicamente com K1 na ativação de NF- κ B, o que intensifica o processo inflamatório e favorece a progressão do SK [32]. Até o momento não há dados na literatura sobre algum papel de tat do HIV-1 na regulação da expressão da ORF-K1 do KSHV.

É importante destacar que produtos do KSHV também interferem no ciclo biológico do HIV-1: por exemplo, a ativação da LTR retroviral proporcionado pelas proteínas LANA e vFLIP do KSHV [16, 17] é um dos mecanismos sugeridos de cooperação entre esses vírus [12]. Assim sendo, delinea-se um cenário de sobreposição entre as propriedades biológicas da infecção pelo KSHV e pelo HIV-1, com importantes implicações para o desenvolvimento de doenças proliferativas associadas ao KSHV no contexto de imunocomprometimento pelo HIV-1, como é o caso do SK, da MCD e do PEL.

Em síntese, os resultados obtidos no presente estudo revelaram que o modelo experimental escolhido para avaliar a expressão gênica da ORF-71 (vFLIP),

ORF-73 (LANA), ORF-K14 (vGPCR), ORF-50 (RTA) e ORF-K1 (K1) do KSHV em células endoteliais TIVE-LTC na vigência de exposição à proteína tat recombinante do HIV-1 apresenta limitações importantes, que se explicitaram na elevada variabilidade encontrada entre 3 experimentos independentes realizados. Dada a magnitude da variabilidade experimental observada, à despeito do rigoroso controle da qualidade dos experimentos de qRT-PCR efetuados, os resultados obtidos não permitem o reconhecimento conclusivo de alterações na expressão gênica dos genes virais avaliados. Assim sendo, não foi possível atribuir de modo seguro as variações encontradas na análise da expressão gênica do KSHV a um possível efeito da exposição das células endoteliais KSHV-positivas TIVE-LTC à proteína recombinante tat do HIV-1.

Não há dados na literatura sobre os eventuais efeitos da proteína tat do HIV-1 na regulação da expressão de genes do KSHV, de modo que esse tópico ainda demanda investigação. As limitações reveladas pelo modelo experimental empregado subsidiam o estabelecimento de estratégias alternativas para a análise dos efeitos de tat. Como possibilidades, podem ser consideradas a utilização de concentrações superiores a 100ng/mL da proteína tat recombinante do HIV-1 (de modo a se esclarecer se a baixa variação na expressão gênica decorre da quantidade de tat disponível no meio), a utilização de outra linhagem celular KSHV-positiva para análise do perfil de expressão dos genes na presença e na ausência de tat recombinante, ou ainda buscar garantir a preservação das funções da proteína tat recombinante do HIV-1 utilizada.

Métodos

Delineamento geral do trabalho

O presente trabalho baseia-se na exposição das células TIVE-LTCs a proteína tat recombinante do HIV-1 por 12, 24, 48 e 72h. A Figura 4 apresenta o desenho geral do estudo, cujas etapas experimentais são detalhadas a seguir.

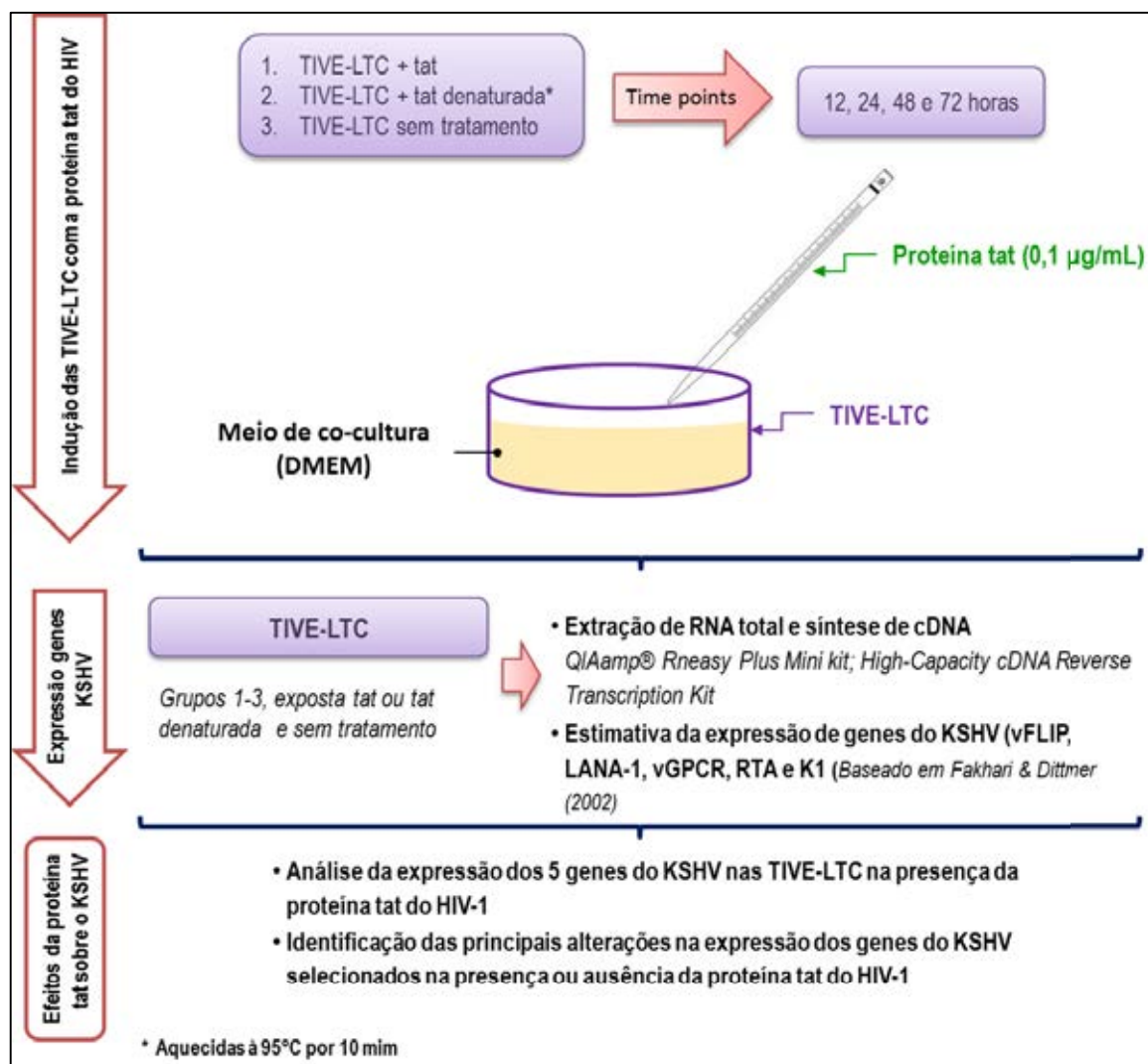


Figura 4: Delineamento experimental da pesquisa

Linhagens celulares e reagentes

Foram utilizadas as células endoteliais TIVE-LTCs, gentilmente cedidas pela Dra. Ethel Cesarman (*Weill Medical School, Cornell University, NY, USA*) e Dr. Dirk Dittmer (*UNC – School of Medicine – Chapel Hill, NC, USA*). As TIVE-LTC foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) acrescido de 10% de soro fetal bovino (*Fetal bovine serum – FBS*) (Cripion Biotecnologia, Andradina, SP, Brasil) inativado por calor e 0,6% de gentamicina (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

Células TIVE-LTC são células endoteliais humanas de endotélio de veia umbilical (*human umbilical vein endothelial cells - HUVEC*) imortalizadas por meio da transdução do vetor pBabe/hTert e infectadas com o KSHV proveniente do sobrenadante de cultura de células BCBL-1, derivadas de PEL. Distintamente de outros modelos de células endoteliais primárias cultiváveis, as TIVE-LTC mantêm o epissoma do KSHV mesmo na ausência de seleção celular *in vitro* [33].

Os tratamentos com a proteína tat do HIV-1 foram efetuados empregando a proteína tat recombinante 86aa obtida do *AIDS Research & Reference Reagent Program, National Institutes of Health (NIH)*, cedida pelo Dr. John N. Brady. A proteína tat foi utilizada na concentração de 100ng/mL de meio, tendo sido preparada em solução contendo solução-tampão salina fosfato de Dulbecco (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline - DPBS*), 1mg/mL de albumina sérica bovina (*Bovine serum albumin - BSA*) e 0,1mM de ditioneitol (DTT). A determinação da concentração da proteína tat utilizada no estudo baseou-se em dados da literatura de que 100ng/mL de tat promovem alterações que colaboram com a patogênese viral [27, 28], sendo que indivíduos infectados pelo HIV-1 apresentam níveis plasmáticos da proteína tat variando entre 2 a 40 ng/mL [25]. A fim de analisar possíveis efeitos adversos na expressão dos genes do KSHV avaliados relacionados à presença de endotoxinas ou outros contaminantes nas alíquotas da proteína tat, os tratamentos foram reproduzidos também com alíquota de proteína tat recombinante denaturada à 95°C por 10min.

Cultivo celular.

A fim de manter aproximadamente uniforme a concentração celular em cada um dos momentos de avaliação, foram plaqueadas $3,0 \times 10^5$, $2,0 \times 10^5$, $1,5 \times 10^5$ e $1,0 \times 10^5$ células para momentos de 12, 24, 48 e 72h, respectivamente. Aproximadamente 12h após o plaqueamento foi acrescentada ao meio a proteína tat recombinante ou a tat recombinante denaturada na concentração de 100ng/mL de meio, preservando-se como controle negativo uma condição na qual células TIVE-LTC não foram expostas a nenhum dos tratamentos. Para as amostras avaliadas nos momentos de 48 e 72h pós-início do tratamento, o meio de cultura foi renovado a cada 24h, de modo a evitar a exaustão de nutrientes e da proteína tat presentes na cultura. Durante o tratamento as células foram mantidas em estufa

a 37°C e 5% de CO₂ até o momento de avaliação pré-estabelecido, ocasião na qual foi efetuada extração de RNA total das células.

Avaliação de expressão gênica viral

As TIVE-LTCs foram submetidas à análise da expressão transcricional dos genes vFLIP, LANA, vGPCR, Rta e K1 do KSHV após tratamento em cada um dos quatro momentos de avaliação estabelecidos (12h, 24h, 48h e 72h). O RNA total das células tratadas e não-tratadas foi extraído com o sistema *QIAamp® Rneasy Plus Mini kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA), conforme instruções do fabricante. As amostras de RNA total obtidas foram tratadas com 1U de DNase (*Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA*) por 20min a 37°C seguida de incubação a 65°C por 15 min, e quantificadas por microespectrofotometria UV em equipamento NanoVue (*GE Healthcare, Little Chalfont, UK*). Posteriormente foi sintetizado DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa empregando o sistema *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA*), conforme instruções sugeridas pelo fabricante.

A estimativa da expressão dos genes selecionados do KSHV foi efetuada por reação em cadeia da PCR quantitativa acoplada a transcrição reversa (*Quantitative real time reverse transcriptase polymerase chain reactions – qRT-PCR*) utilizando *GoTaq® qPCR Master Mix* (*Promega, Madison, WI, USA*) em termociclador Rotor-Gene 6000 (*Corbett Research, Mortlake, Austrália*). Em cada reação foram utilizados 1µL do cDNA gerado das TIVE-LTCs para cada condição e período estabelecido, 10µL do reagente *SYBR® Green* e iniciadores na concentração final de 0,30µM. 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 para a análise da expressão dos 5 genes virais selecionados foram obtidas do trabalho publicado por Fakhari & Dittmer [34] e estão listadas no Quadro S1 do material suplementar.

A análise dos efeitos de tat sobre a expressão dos genes selecionados do KSHV em células TIVE-LTC baseou-se nos dados obtidos de três experimentos independentes. Todas as amostras incluídas nos experimentos de qRT-PCR (incluindo controles) foram analisadas em duplicatas. A fim de verificar a qualidade

analítica dos experimentos de qRT-PCR efetuados e possibilitar comparações entre diferentes reações, 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 a partir da diluição seriada na proporção de 1:10 de amostras comerciais de DNA genômico do KSHV, derivado de linhagem KS-1 de células de PEL. As diluições foram preparadas de modo a serem geradas alíquotas de DNA herpesviral em concentrações de 5×10^{-1} ng/ μ L à 5×10^{-4} ng/ μ L. Apenas foram utilizados resultados de experimentos de qRT-PCR com eficiência estimada entre 90-100%. Em todas as reações foi utilizado limiar de fluorescência (*threshold*) de 0,2.

Para a análise da expressão dos genes selecionados foram inicialmente calculados os deltas Cts (Δ Cts) dos genes-alvo nas três condições de análise (TIVE-LTC+tat, TIVE-LTC+tat denaturada e TIVE-LTC sem tratamento), para cada um dos quatro momentos de avaliação (12, 24, 48 e 72h). Esses cálculos foram efetuados a partir dos Cts das amostras subtraídos do Ct do normalizador *ACTB* (Δ Cts= Ct amostra - Ct *ACTB*). Para cada alvo foram então calculados os $\Delta\Delta$ Cts para três relações: 1) TIVE LTC+tat vs TIVE LTC+tat denaturada; 2) TIVE LTC+tat vs TIVE LTC sem tratamento; e 3) TIVE LTC+tat desnaturada vs TIVE LTC sem tratamento. O método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [35] foi empregado para se estimar a expressão diferencial (*fold changes*) de cada um dos 5 genes selecionados, nas diferentes relações estabelecidas, nos momentos de 12, 24, 48 e 72h. Esses cálculos foram repetidos para cada experimento; adicionalmente, foram calculados média, desvio padrão e coeficiente de variação das expressões diferenciais estimadas para cada gene considerando os 3 experimentos independentes efetuados. Os valores obtidos foram utilizados para a construção dos gráficos de análise da expressão dos genes selecionados do KSHV.

Lista de abreviações

ACTB - Actin, beta

BSA - Bovine serum albumin

DPBS - Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline

DTT - Ditioneitol

EBV - Epstein-Barr virus

HUVEC - Human umbilical vein endothelial cells

HVS - Herpesvirus saimiri

KDR - Protein-tyrosine kinase receptor

KSHV - Kaposi Sarcoma-associated Herpesvirus

LANA - Latency-associated nuclear antigen

LTR - Long Terminal Repeat

MCD - Multicentric Castleman Disease

ORF - Open Reading Frame

PEL - Primary Efusion Lymphoma

qRT-PCR - Quantitative real time reverse transcriptase polymerase chain reactions

RTA - Replication and transcription activator

SK - Kaposi's sarcoma

SK-AIDS - AIDS-related Kaposi's sarcoma

TAR - Trans-Acting Responsive elemente

Tat - Transactivator protein

TIVE-LTC - Telomerase-immortalized human umbilical vein endothelial cell line –
Long Term KSHV infected.

TPA - 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate

VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor

vFLIP - Viral FLIP protein

vGPCR - Viral G protein coupled receptor

Contribuição dos autores:

APFS: Participou da elaboração do estudo, realizou os experimentos, avaliou os dados e redigiu o manuscrito.

SRS: Participou da elaboração do estudo e realizou experimentos preliminares.

DEO: Participou da elaboração do estudo, coordenou a pesquisa, obteve financiamento, avaliou os resultados e contribuiu na redação do manuscrito.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Dra. Ethel Cesarman e ao Dr. Dirk Dittmer pela doação da linhagem celular TIVE-LTC. O presente trabalho recebeu financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Proc. Dr 2009/18403-9) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ Proc. 471524/2011-5).

Material Suplementar

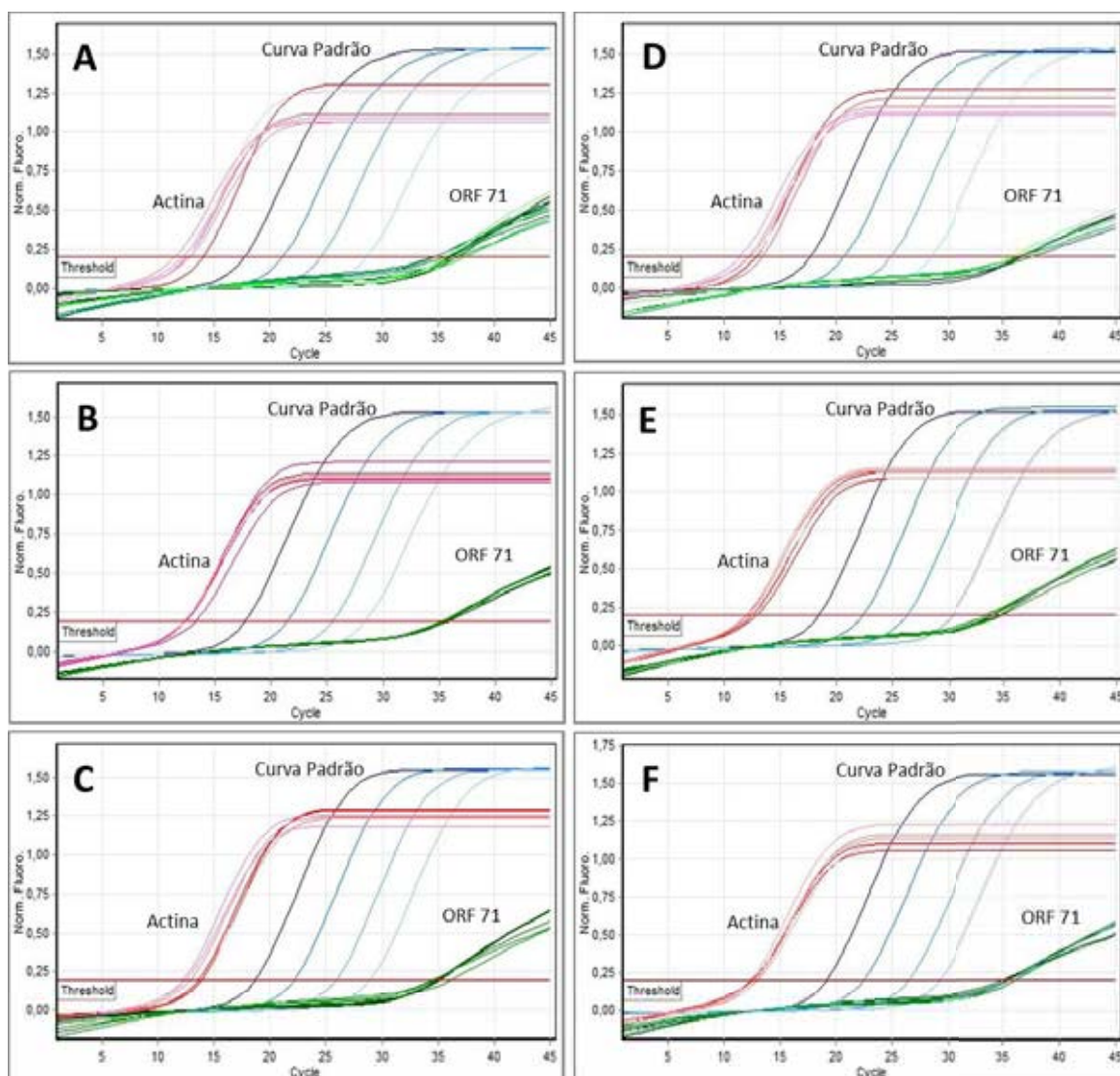


Figura S 1: Gráficos de amplificação de 3 experimentos representativos da análise de expressão gênica por qRT-PCR da ORF 71 (vFLIP) do KSHV após 12 e 24h de exposição a proteína tat do HIV-1. Amplificação da ORF 71 em células TIVE-LTC expostas à proteína tat recombinante, tat recombinante denaturada ou células TIVE-LTC sem tratamento, nos experimentos I (A e D), II (B e E) e III (C e F), após 12h (A, B e C) e 24h (D, E e F). Actina: gene normalizador *ACTB*; Curva Padrão: amostras de diluição seriada (1:10) de DNA genômico do KSHV em concentrações desde 5×10^{-1} ng/ μ L até 5×10^{-4} ng/ μ L, amplificadas para segmento da ORF 26.

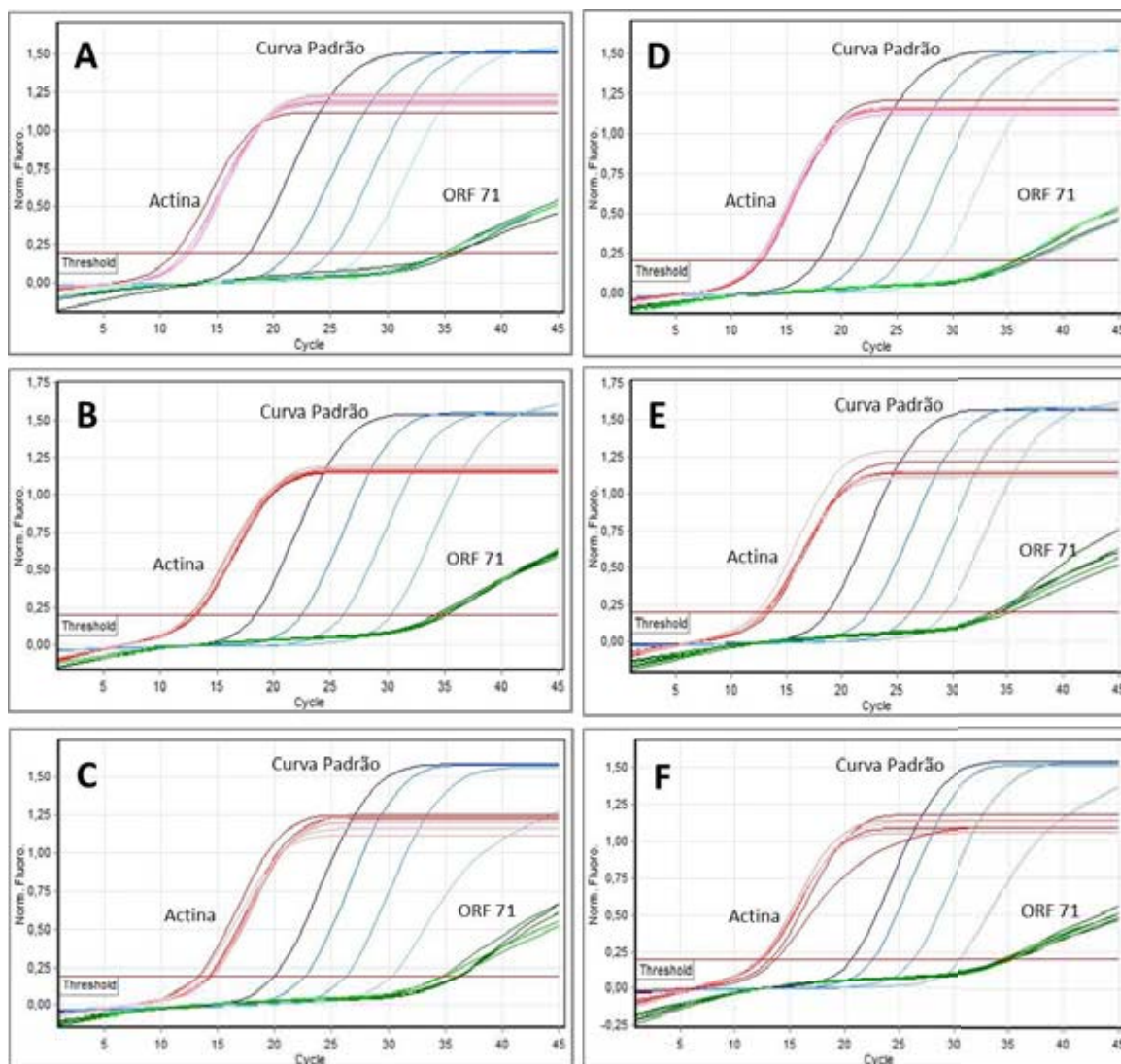


Figura S 2: Gráficos de amplificação de 3 experimentos representativos da análise de expressão gênica por qRT-PCR da ORF 71 (vFLIP) do KSHV após 48 e 72h de exposição a proteína tat do HIV-1. Amplificação da ORF 71 em células TIVE-LTC expostas à proteína tat recombinante, tat recombinante denaturada ou células TIVE-LTC sem tratamento, nos experimentos I (A e D), II (B e E) e III (C e F), após 48h (A, B e C) e 72h (D, E e F). Actina: gene normalizador *ACTB*; Curva Padrão: amostras de diluição seriada (1:10) de DNA genômico do KSHV em concentrações desde 5×10^{-1} ng/ μ L até 5×10^{-4} ng/ μ L, amplificadas para segmento da ORF 26.

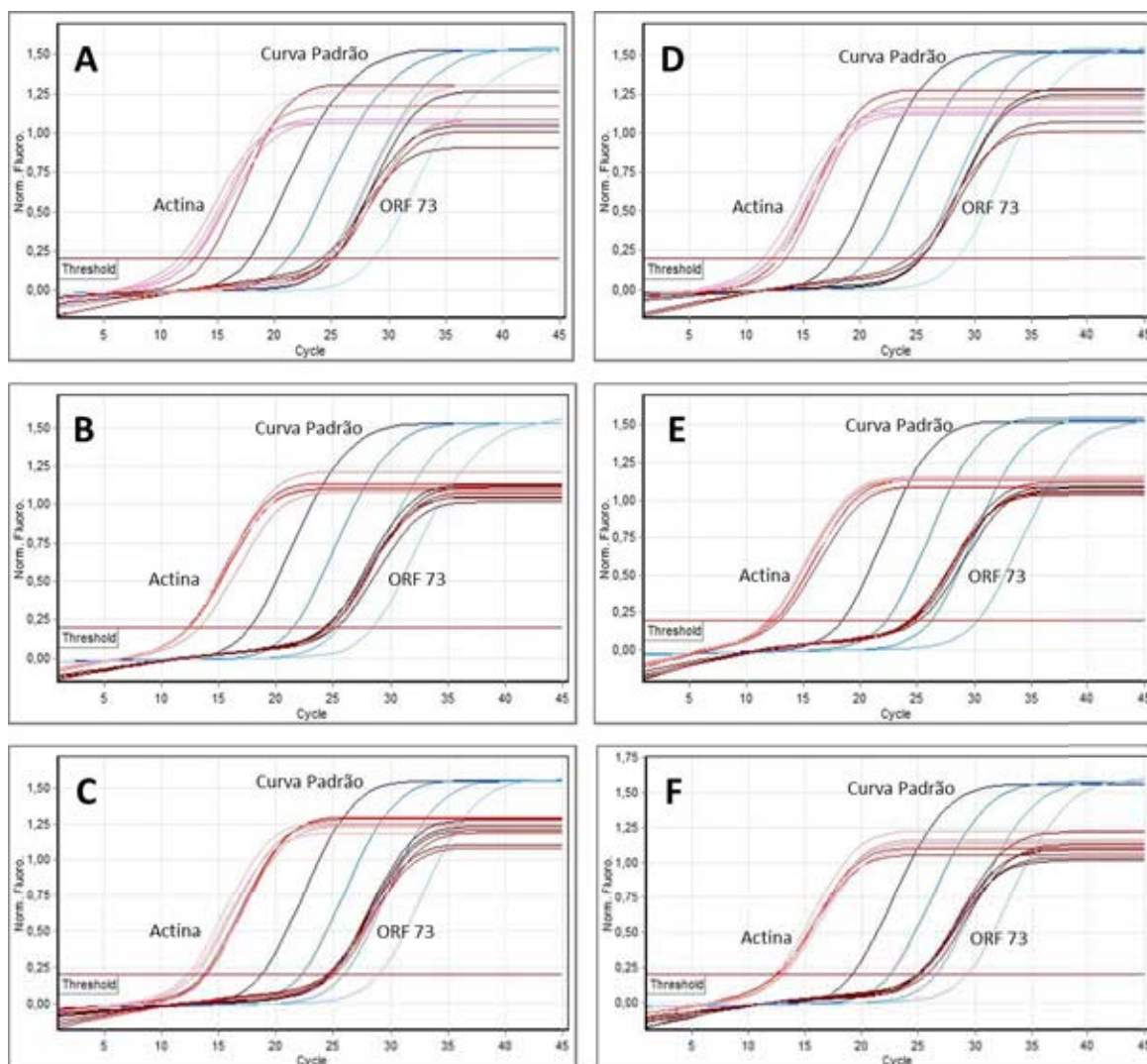


Figura S 3: Gráficos de amplificação de 3 experimentos representativos da análise de expressão gênica por qRT-PCR da ORF 73 (LANA) do KSHV após 12 e 24h de exposição a proteína tat do HIV-1. Amplificação da ORF 73 em células TIVE-LTC expostas à proteína tat recombinante, tat recombinante denaturada ou células TIVE-LTC sem tratamento, nos experimentos I (A e D), II (B e E) e III (C e F), após 12h (A, B e C) e 24h (D, E e F). Actina: gene normalizador *ACTB*; Curva Padrão: amostras de diluição seriada (1:10) de DNA genômico do KSHV em concentrações desde 5×10^{-1} ng/ μ L até 5×10^{-4} ng/ μ L, amplificadas para segmento da ORF 26.

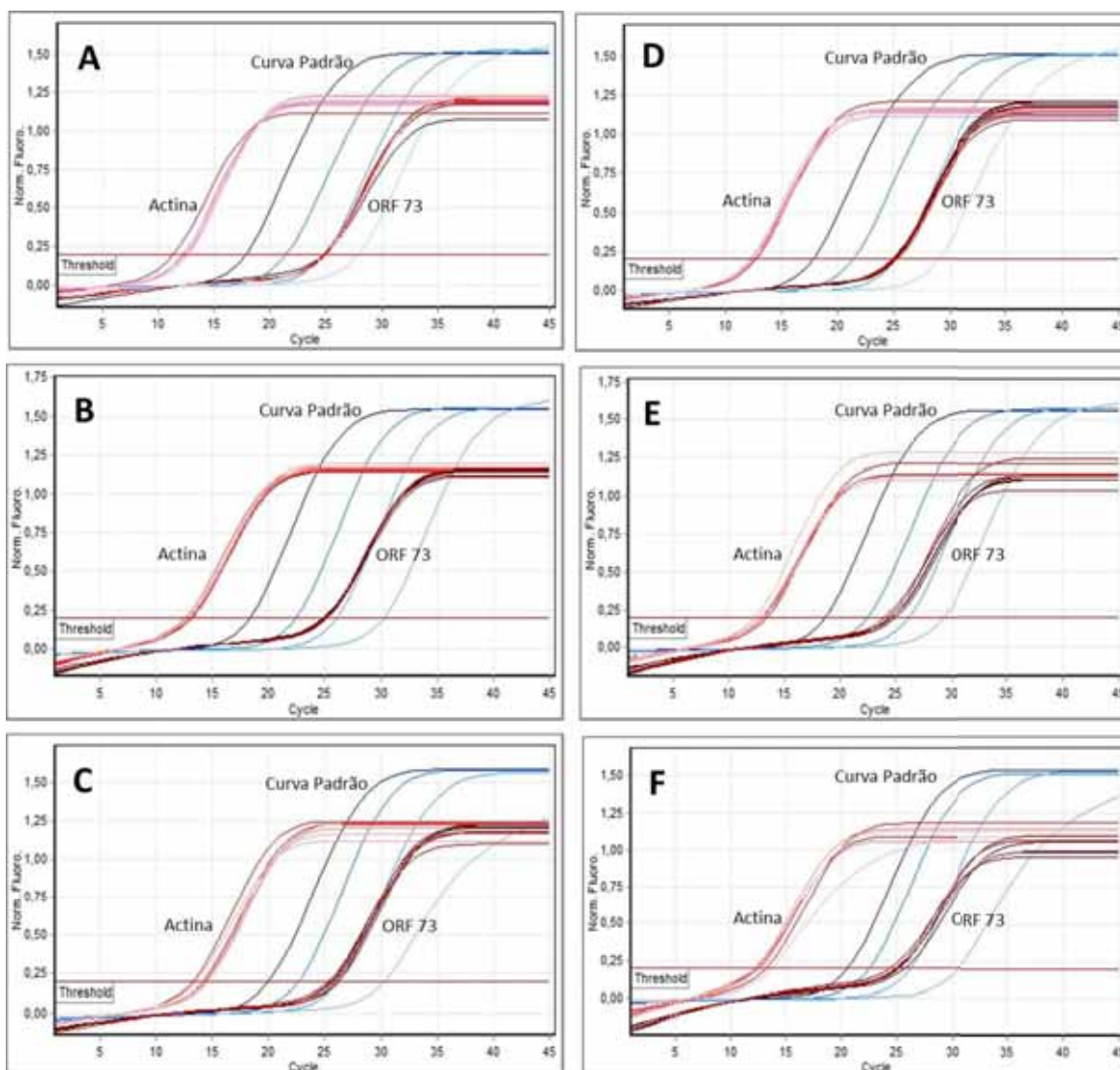


Figura S 4: Gráficos de amplificação de 3 experimentos representativos da análise de expressão gênica por qRT-PCR da ORF 73 (LANA) do KSHV após 48 e 72h de exposição a proteína tat do HIV-1. Amplificação da ORF 73 em células TIVE-LTC expostas à proteína tat recombinante, tat recombinante denaturada ou células TIVE-LTC sem tratamento, nos experimentos I (A e D), II (B e E) e III (C e F), após 48h (A, B e C) e 72h (D, E e F). Actina: gene normalizador *ACTB*; Curva Padrão: amostras de diluição seriada (1:10) de DNA genômico do KSHV em concentrações desde 5×10^{-1} ng/ μ L até 5×10^{-4} ng/ μ L, amplificadas para segmento da ORF 26.

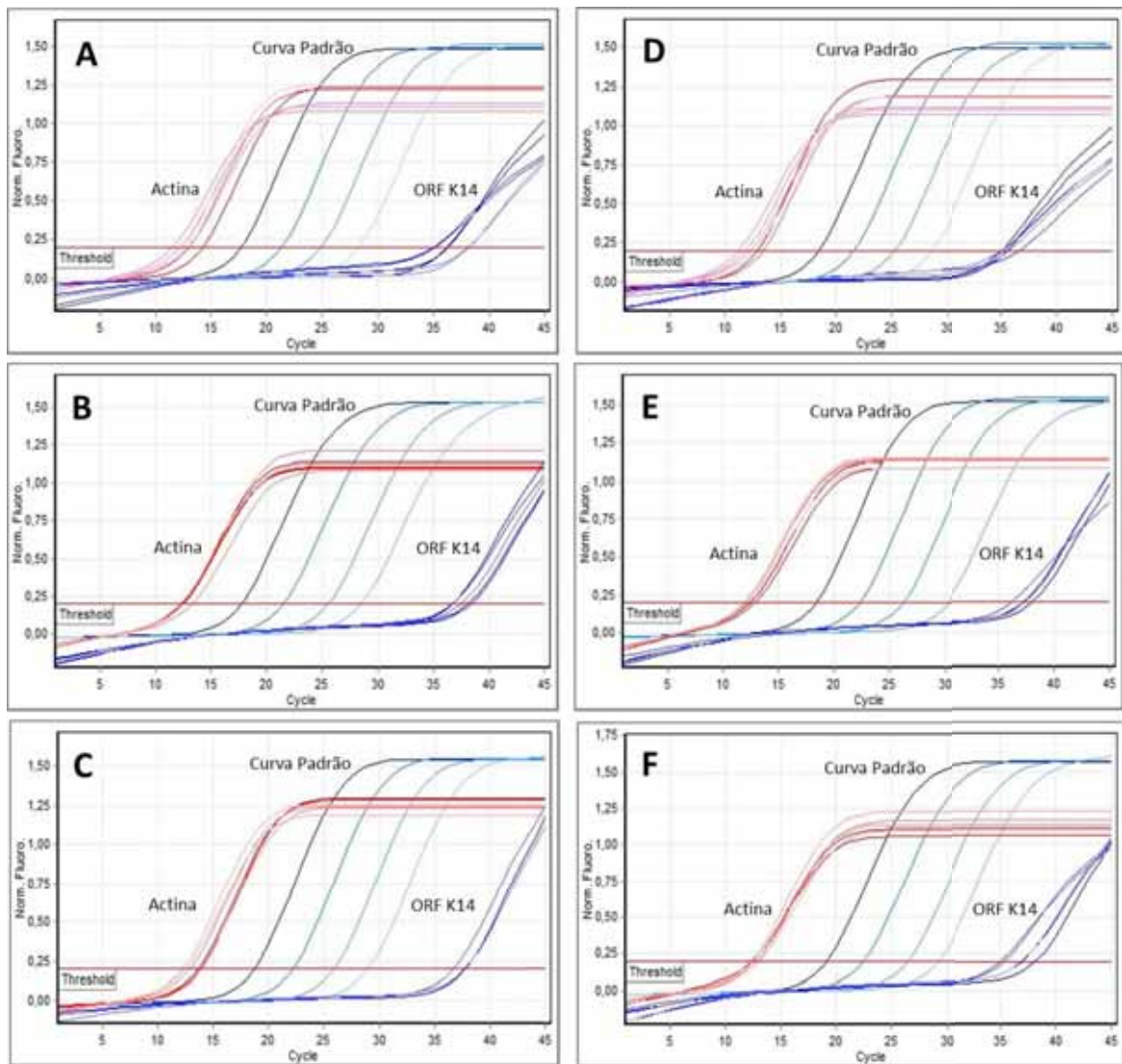


Figura S 5: Gráficos de amplificação de 3 experimentos representativos da análise de expressão gênica por qRT-PCR da ORF K14 (vGPCR) do KSHV após 12 e 24h de exposição a proteína tat do HIV-1. Amplificação da ORF K14 em células TIVE-LTC expostas à proteína tat recombinante, tat recombinante denaturada ou células TIVE-LTC sem tratamento, nos experimentos I (A e D), II (B e E) e III (C e F), após 12h (A, B e C) e 24h (D, E e F). Actina: gene normalizador *ACTB*; Curva Padrão: amostras de diluição seriada (1:10) de DNA genômico do KSHV em concentrações desde 5×10^{-1} ng/ μ L até 5×10^{-4} ng/ μ L, amplificadas para segmento da ORF 26.

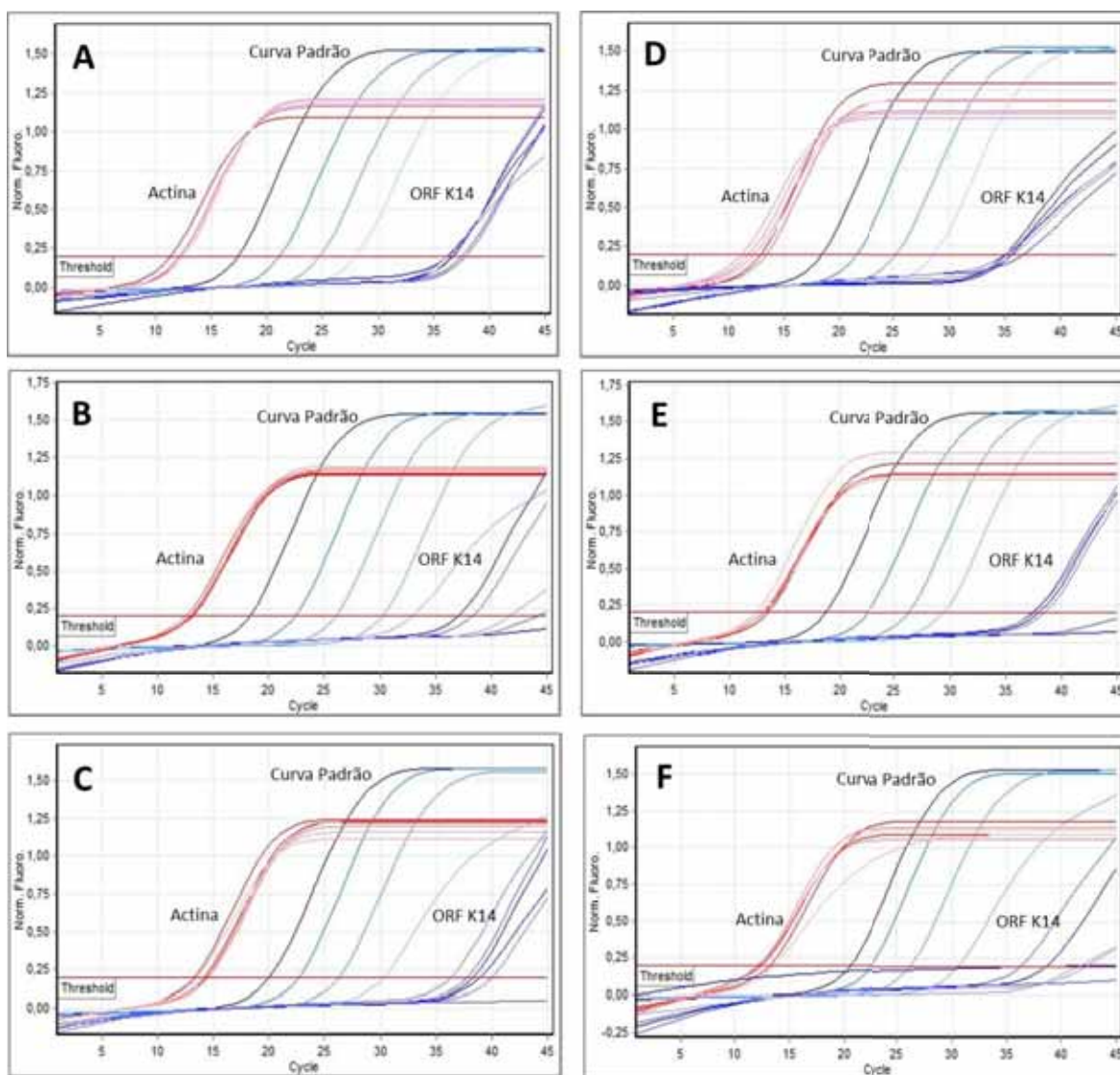


Figura S 6: Gráficos de amplificação de 3 experimentos representativos da análise de expressão gênica por qRT-PCR da ORF K14 (vGPCR) do KSHV após 48 e 72h de exposição a proteína tat do HIV-1. Amplificação da ORF K14 em células TIVE-LTC expostas à proteína tat recombinante, tat recombinante denaturada ou células TIVE-LTC sem tratamento, nos experimentos I (A e D), II (B e E) e III (C e F), após 48h (A, B e C) e 72h (D, E e F). Actina: gene normalizador *ACTB*; Curva Padrão: amostras de diluição seriada (1:10) de DNA genômico do KSHV em concentrações desde 5×10^{-1} ng/ μ L até 5×10^{-4} ng/ μ L, amplificadas para segmento da ORF 26.

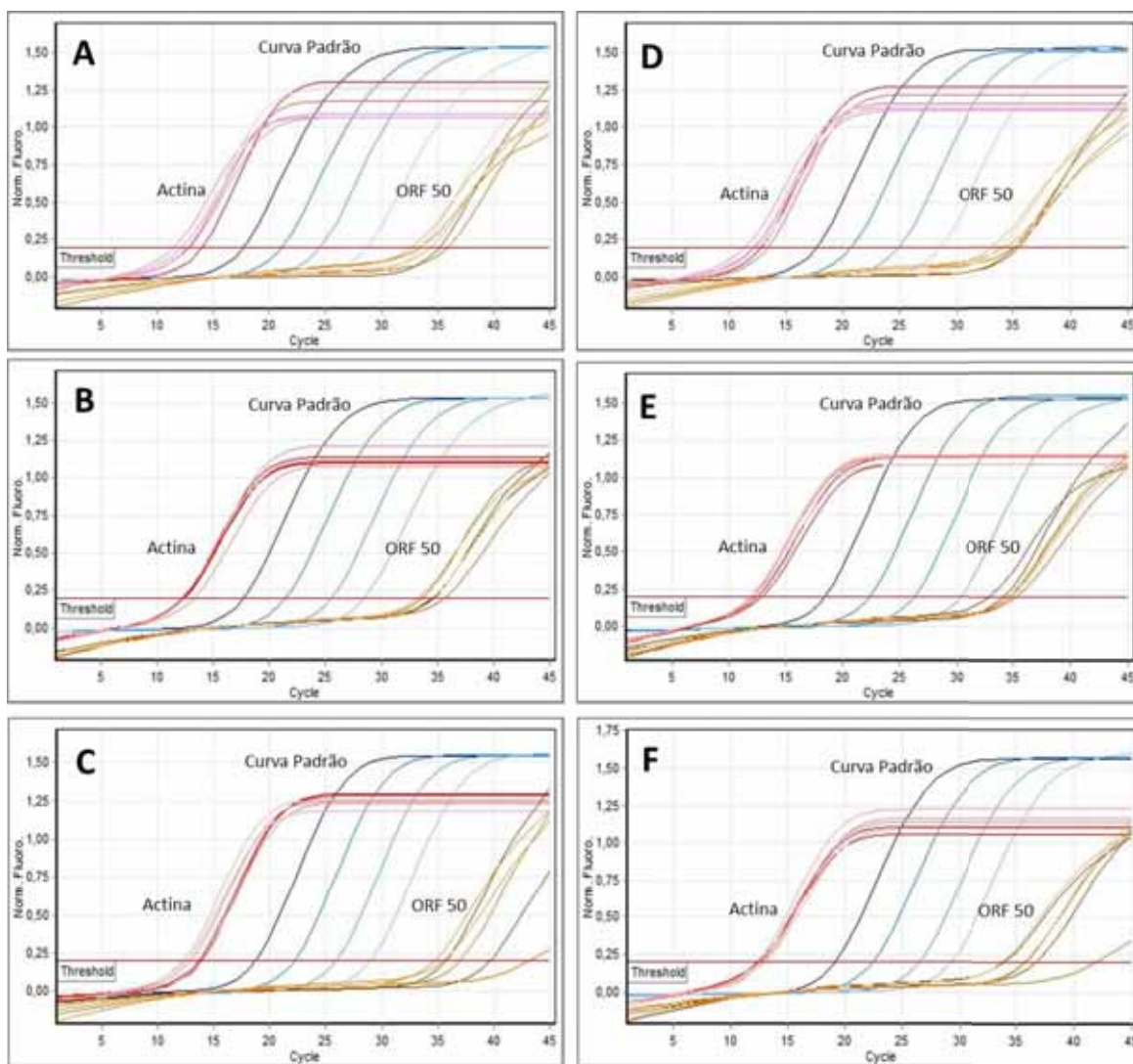


Figura S 7: Gráficos de amplificação de 3 experimentos representativos da análise de expressão gênica por qRT-PCR da ORF 50 (RTA) do KSHV após 12 e 24h de exposição a proteína tat do HIV-1. Amplificação da ORF 50 em células TIVE-LTC expostas à proteína tat recombinante, tat recombinante denaturada ou células TIVE-LTC sem tratamento, nos experimentos I (A e D), II (B e E) e III (C e F), após 12h (A, B e C) e 24h (D, E e F). Actina: gene normalizador *ACTB*; Curva Padrão: amostras de diluição seriada (1:10) de DNA genômico do KSHV em concentrações desde 5×10^{-1} ng/ μ L até 5×10^{-4} ng/ μ L, amplificadas para segmento da ORF 26.

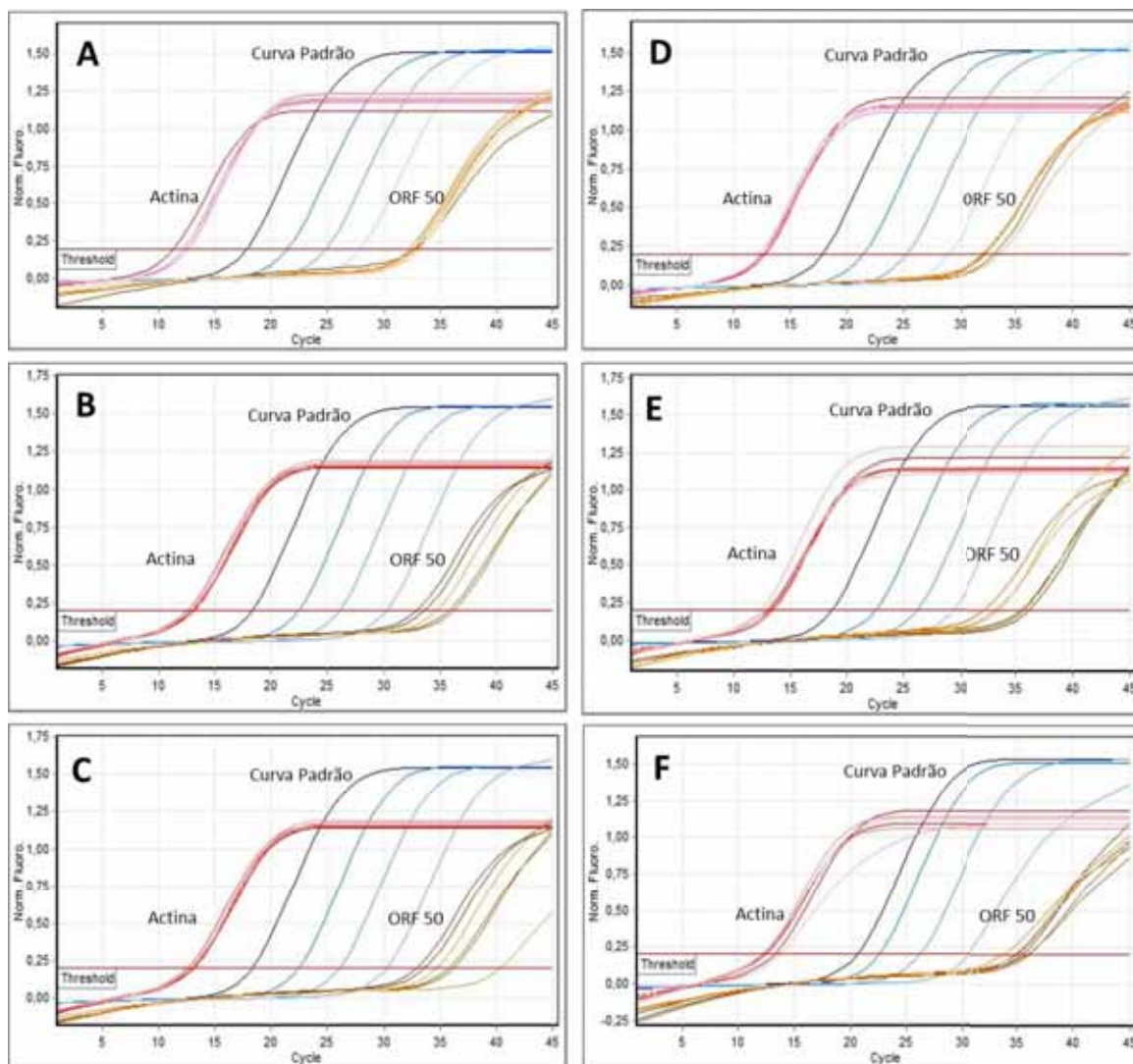


Figura S 8: Gráficos de amplificação de 3 experimentos representativos da análise de expressão gênica por qRT-PCR da ORF 50 (RTA) do KSHV após 48 e 72h de exposição a proteína tat do HIV-1. Amplificação da ORF 50 em células TIVE-LTC expostas à proteína tat recombinante, tat recombinante denaturada ou células TIVE-LTC sem tratamento, nos experimentos I (A e D), II (B e E) e III (C e F), após 48h (A, B e C) e 72h (D, E e F). Actina: gene normalizador ACTB; Curva Padrão: amostras de diluição seriada (1:10) de DNA genômico do KSHV em concentrações desde 5×10^{-1} ng/ μ L até 5×10^{-4} ng/ μ L, amplificadas para segmento da ORF 26.

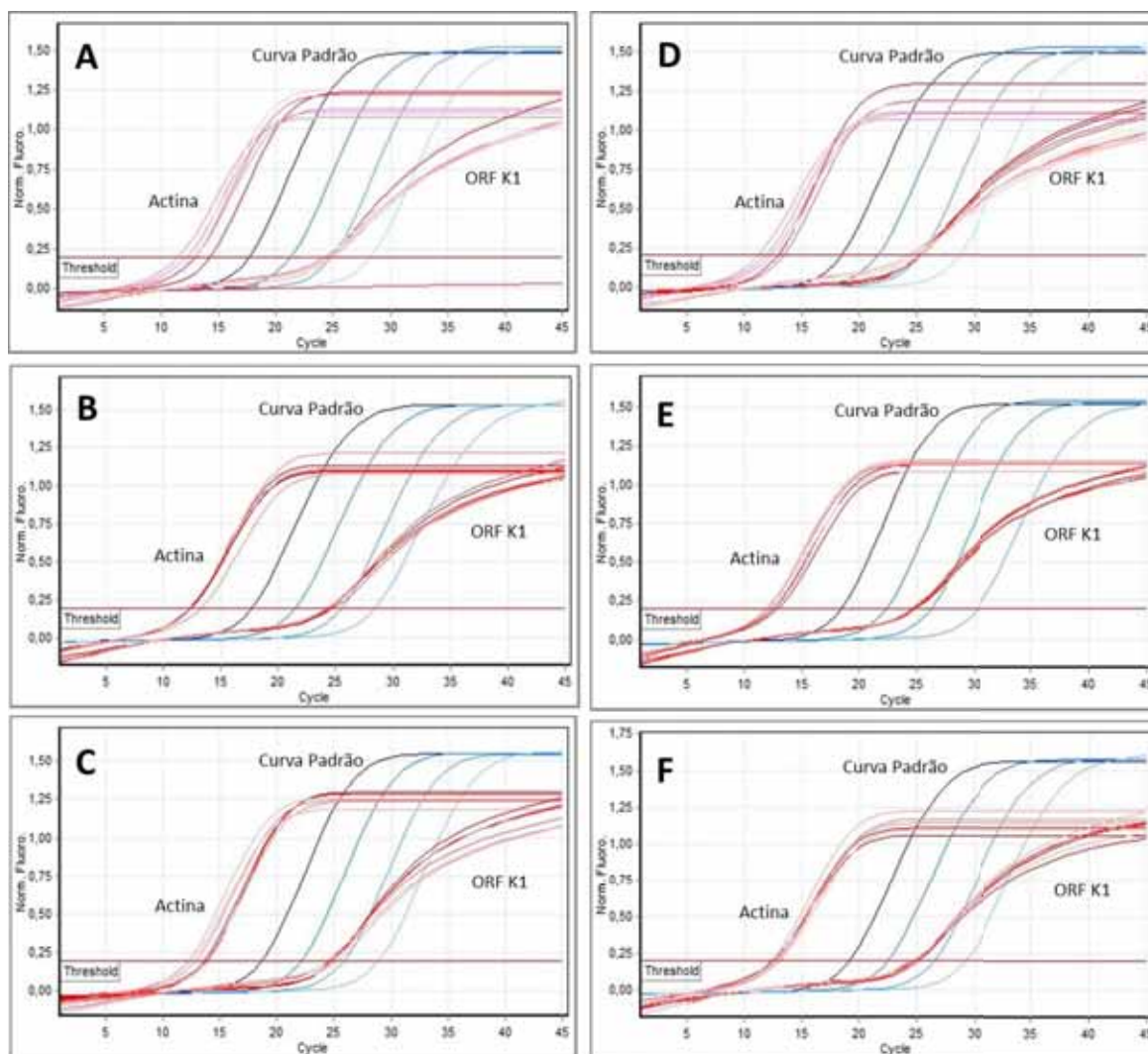


Figura S 9: Gráficos de amplificação de 3 experimentos representativos da análise de expressão gênica por qRT-PCR da ORF K1 (K1) do KSHV após 12 e 24h de exposição a proteína tat do HIV-1. Amplificação da ORF K1 em células TIVE-LTC expostas à proteína tat recombinante, tat recombinante denaturada ou células TIVE-LTC sem tratamento, nos experimentos I (A e D), II (B e E) e III (C e F), após 12h (A, B e C) e 24h (D, E e F). Actina: gene normalizador *ACTB*; Curva Padrão: amostras de diluição seriada (1:10) de DNA genômico do KSHV em concentrações desde 5×10^{-1} ng/ μ L até 5×10^{-4} ng/ μ L, amplificadas para segmento da ORF 26.

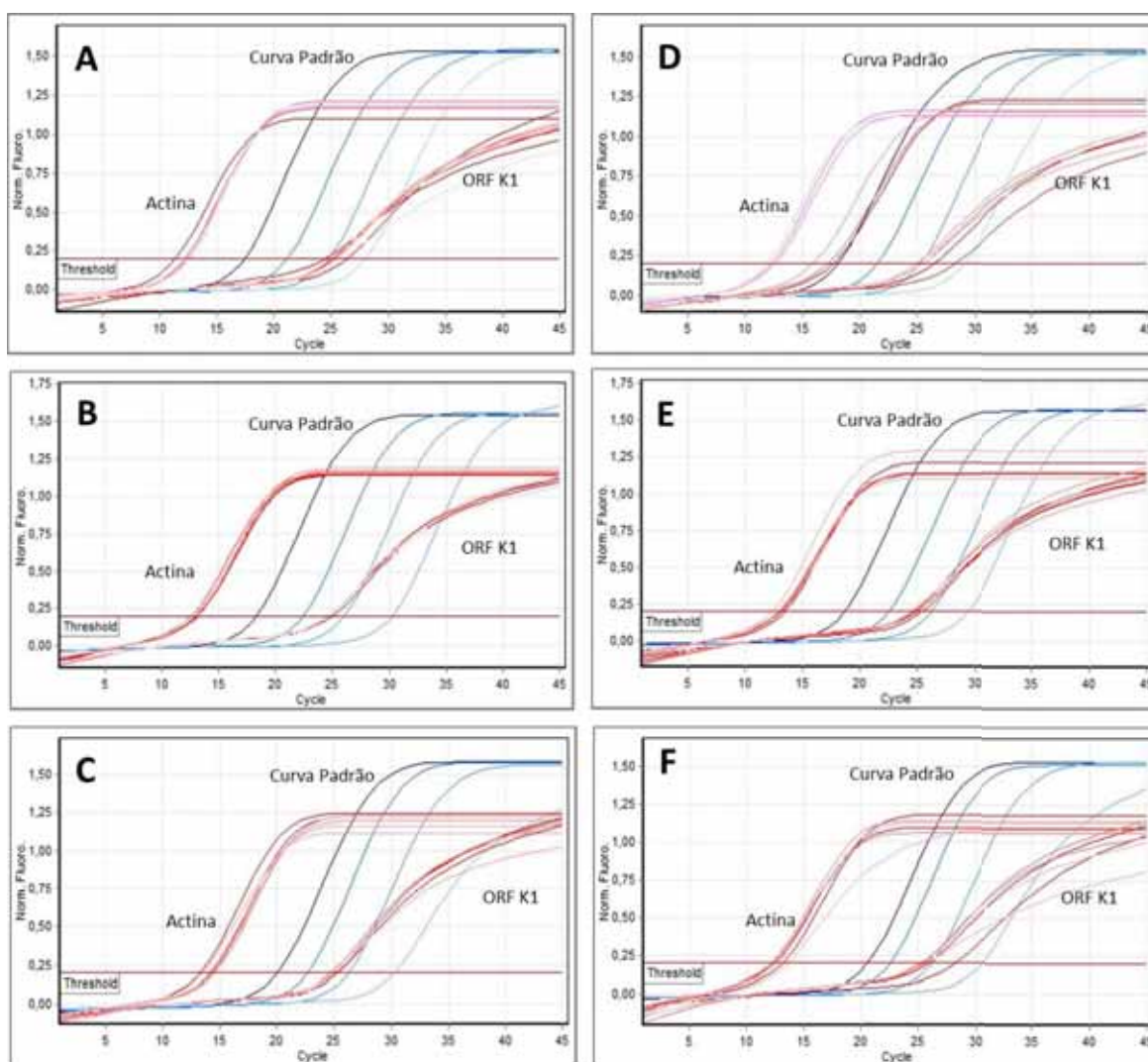


Figura S 10: Gráficos de amplificação de 3 experimentos representativos da análise de expressão gênica por qRT-PCR da ORF K1 (K1) do KSHV após 48 e 72h de exposição a proteína tat do HIV-1. Amplificação da ORF K1 em células TIVE-LTC expostas à proteína tat recombinante, tat recombinante denaturada ou células TIVE-LTC sem tratamento, nos experimentos I (A e D), II (B e E) e III (C e F), após 48h (A, B e C) e 72h (D, E e F). Actina: gene normalizador *ACTB*; Curva Padrão: amostras de diluição seriada (1:10) de DNA genômico do KSHV em concentrações desde 5×10^{-1} ng/ μ L até 5×10^{-4} ng/ μ L, amplificadas para segmento da ORF 26.

Quadro S 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	TCTCCGTGCACAAATCGTG
Genes do ciclo latente viral*		
LANA (ORF73)	KSHVO73.S	GCTTGGTCCGGCTGACTTAT
	KSHVO73.A	TGCAGTACCGCCCATGG
v-FLIP (ORF71)	KSHVO71-vFLIP.S	TTTCCCCTGTTAGCGGAATGT
	KSHVO71-vFLIP.A	CTAAGTGAAGCAGGTCGCGC
Gene humano (controle)		
Actina	ACTB.A	CAA ACATGATCTGGGTCATCTTCTC
	ACTB.S	GCTCGTCGTCGACAACGGCTC
Curva-Padrão		
ORF26	ORF26.S	TCCACCATTGTGCTCGAATCCAAC
	ORF26.A	ACACCAACAGCTGCTGCAGAATAG

*Sequências descritas por Fakhari & Dittmer (2002) [34]

Tabela S 1: Valores dos Cts gerados a partir da amplificação por qRT-PCR dos cinco genes do KSHV selecionados, nas três condições experimentais avaliadas, para os quatro momentos estudados e em cada um dos três experimentos independentes realizados.

Momentos	Experimentos	TIVE-LTC + Tat					TIVE-LTC + Tat Denaturada					TIVE-LTC sem tratamento						
		K1	LANA	vGPCR	RTA	vFLIP	K1	LANA	vGPCR	RTA	vFLIP	K1	LANA	vGPCR	RTA	vFLIP		
12h	I	Ct' norm.	11,4	11,5	22,8	21,7	22,5	12,5	12,3	23,2	21,7	22,7	12,0	12,4	24,2	21,5	23,4	
		Ct" norm.	11,4	11,2	23,2	21,2	22,7	12,7	13,0	23,3	21,4	22,8	11,7	11,8	25,1	21,7	22,8	
		Ct' norm.	12,1	11,9	25,7	22,1	23,5	12,0	12,4	23,9	22,8	22,8	12,1	12,2	25,2	21,0	23,2	
	II	Ct" norm.	12,2	12,0	24,4	22,2	23,2	11,6	12,0	25,6	20,8	22,6	11,9	12,3	24,7	22,2	23,1	
		Ct' norm.	11,1	10,8	24,0	21,7	21,2	11,6	11,5	23,4	23,6	21,5	12,3	12,1	25,3	23,1	22,3	
		Ct" norm.	11,1	11,0	27,1	21,9	21,4	11,2	11,1	24,9	23,5	21,4	12,9	12,7	25,3	22,4	23,8	
	III	Média	11,6	11,4	24,5	21,8	22,4	11,9	12,0	24,0	22,3	22,3	12,2	12,3	25,0	22,0	23,1	
		DP	0,50	0,47	0,38	0,38	0,94	0,57	0,70	0,98	1,17	0,66	0,41	0,30	0,45	0,75	0,51	
		CV	4%	4%	2%	2%	4%	5%	6%	4%	5%	3%	3%	2%	2%	3%	2%	
	24h	I	Ct' norm.	12,2	12,2	21,9	22,0	23,7	13,1	13,5	25,0	23,5	24,2	12,3	12,6	22,5	20,7	23,9
			Ct" norm.	12,1	12,2	22,4	22,4	23,6	12,6	12,6	22,7	22,7	24,5	12,6	12,9	23,2	21,5	23,8
			Ct' norm.	12,2	12,1	25,4	21,6	22,0	12,7	12,5	24,2	22,6	22,2	12,6	12,3	22,9	22,7	22,7
II		CT2 norm.	12,2	12,5	24,8	20,3	22,0	12,6	12,2	25,3	23,2	21,6	12,7	12,6	23,5	22,5	21,9	
		Ct' norm.	12,5	12,3	25,7	24,2	22,8	12,4	12,9	22,3	23,0	23,5	11,9	12,3	24,2	24,9	22,7	
		Ct" norm.	12,1	12,4	24,5	21,5	22,6	12,1	12,3	22,7	20,9	22,7	12,1	12,4	23,9	23,1	22,9	
III		Média	12,2	12,3	24,1	22,0	22,8	12,6	12,7	23,7	22,7	23,1	12,4	12,5	23,4	22,6	23,0	
		DP	0,14	0,15	1,57	1,30	0,75	0,33	0,45	1,30	0,91	1,15	0,29	0,21	0,63	1,42	0,76	
		CV	1%	1%	7%	6%	3%	3%	4%	6%	4%	5%	2%	2%	3%	6%	3%	
48h		I	Ct' norm.	12,7	13,2	24,5	21,1	24,1	12,9	12,7	25,5	20,4	22,6	12,8	12,5	24,2	19,8	23,0
			Ct" norm.	13,4	13,3	24,9	21,0	24,5	12,7	12,4	25,1	21,0	22,6	12,9	12,6	23,7	20,7	23,0
			CT2 norm.	11,6	11,8	24,0	19,9	21,2	11,9	12,4	23,6	23,4	22,0	11,7	12,0	19,9	21,6	21,7
	II	CT2' norm.	11,9	12,0	23,8	20,6	22,0	11,8	12,3	25,5	22,9	21,9	11,5	11,9	23,5	21,3	21,5	
		Ct' norm.	11,6	11,9	25,2	22,1	22,4	10,7	11,8	21,9	21,1	21,7	11,4	12,0	21,3	21,5	22,3	
		Ct" norm.	11,5	12,3	24,5	21,4	22,5	10,3	11,1	23,3	21,1	20,3	11,2	11,6	22,6	21,4	21,4	
	III	Média	12,1	12,4	24,5	21,0	22,8	11,7	12,1	24,2	21,6	21,8	11,9	12,1	22,5	21,1	22,1	
		DP	0,78	0,64	0,51	0,73	1,25	1,05	0,59	1,46	1,20	0,86	0,75	0,40	1,64	0,71	0,73	
		CV	6%	5%	2%	3%	6%	9%	5%	6%	6%	4%	6%	3%	7%	3%	3%	
	72h	I	Ct' norm.	12,5	12,5	23,5	20,6	24,0	12,6	12,3	24,3	19,7	23,1	12,8	12,2	24,6	21,4	24,0
			Ct" norm.	12,6	12,3	23,9	19,4	23,8	12,5	12,5	23,6	19,8	24,6	13,2	12,6	24,8	20,2	23,3
			Ct' norm.	12,2	11,8	22,4	23,0	21,1	11,9	11,7	25,5	23,1	21,8	12,3	11,5	24,9	20,8	21,9
II		Ct" norm.	11,7	11,4	24,7	22,2	20,6	12,1	12,1	24,7	22,1	22,7	12,1	11,9	25,9	21,0	21,9	
		Ct' norm.	12,8	13,0	27,0	22,6	22,0	13,3	12,2	25,6	23,7	23,0	12,2	11,9	29,2	21,7	22,2	
		Ct" norm.	13,1	12,3	25,9	22,1	22,7	13,0	13,1	24,1	23,9	22,8	12,5	11,9	28,4	20,7	21,4	
III		Média	12,5	12,2	24,6	21,7	22,4	12,6	12,3	24,6	22,0	23,0	12,5	12,0	26,3	21,0	22,5	
		DP	0,50	0,56	1,66	1,35	1,40	0,54	0,46	0,81	1,86	0,89	0,43	0,37	2,00	0,54	1,00	
		CV	4%	5%	7%	6%	6%	4%	4%	3%	8%	4%	3%	3%	8%	3%	4%	

Obs.: Ct norm. = Ct amostra – Ct médio da acina; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

REFERÊNCIAS

1. Dourmishev LA, Dourmishev AL, Palmeri D, Schwartz RA, Lukac DM: **Molecular genetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) epidemiology and pathogenesis.** *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* 2003, **67**:175–212, table of contents.
2. IARC .: **Kaposi Sarcoma Herpesvirus, in: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans - A Review of Human Carcinogens Part B: Biological Agents.** Lyon, France : *International Agency for Research on Cancer* 2012:169–214.
3. Hengge UR, Ruzicka T, Tyring SK, Stuschke M, Roggendorf M, Schwartz RA, Seeber S: **Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 1: epidemiology, environmental predispositions, clinical manifestations, and therapy.** *Lancet Infect Dis* 2002, **2**:281–292.
4. Du M-Q, Bacon CM, Isaacson PG: **Kaposi sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 and lymphoproliferative disorders.** *J Clin Pathol* 2007, **60**:1350–1357.
5. Masood R, Cesarman E, Smith DL, Gill PS, Flore O: **Human herpesvirus-8-transformed endothelial cells have functionally activated vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor.** *Am J Pathol* 2002, **160**:23–29.
6. Dupin N, Fisher C, Kellam P, Ariad S, Tulliez M, Franck N, van Marck E, Salmon D, Gorin I, Escande JP, Weiss RA, Alitalo K, Boshoff C: **Distribution of human herpesvirus-8 latently infected cells in Kaposi's sarcoma, multicentric Castleman's disease, and primary effusion lymphoma.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:4546–4551.
7. Ensoli B, Sgadari C, Barillari G, Sirianni MC, Stürzl M, Monini P: **Biology of Kaposi's sarcoma.** *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990 2001, **37**:1251–1269.
8. Ganem D: **KSHV and the pathogenesis of Kaposi sarcoma: listening to human biology and medicine.** *J Clin Invest* 2010, **120**:939–949.
9. Salvi R, Garbuglia AR, Di Caro A, Pulciani S, Montella F, Benedetto A: **Grossly defective nef gene sequences in a human immunodeficiency virus type 1-seropositive long-term nonprogressor.** *J Virol* 1998, **72**:3646–3657.
10. Cullen BR: **HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell.** *Cell* 1998, **93**:685–692.
11. Li L, Li HS, Pauza CD, Bukrinsky M, Zhao RY: **Roles of HIV-1 auxiliary proteins in viral pathogenesis and host-pathogen interactions.** *Cell Res* 2005, **15**:923–934.
12. Da Silva SR, de Oliveira DE: **HIV, EBV and KSHV: viral cooperation in the pathogenesis of human malignancies.** *Cancer Lett* 2011, **305**:175–185.
13. Caselli E, Menegazzi P, Bracci A, Galvan M, Cassai E, Di Luca D: **Human herpesvirus-8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) ORF50 interacts synergistically with the tat gene product in transactivating the human immunodeficiency virus type 1 LTR.** *J Gen Virol* 2001, **82**(Pt 8):1965–1970.

-
14. Caselli E, Galvan M, Santoni F, Rotola A, Caruso A, Cassai E, Luca DD: **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**(Pt 5):1123–1131.
15. Caselli E, Galvan M, Cassai E, Di Luca D: **Transient expression of human herpesvirus-8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) ORF50 enhances HIV-1 replication.** *Intervirology* 2003, **46**:141–149.
16. Hyun TS, Subramanian C, Cotter MA 2nd, Thomas RA, Robertson ES: **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**:8761–8771.
17. Sun Q, Matta H, Chaudhary PM: **Kaposi's sarcoma associated herpes virus-encoded viral FLICE inhibitory protein activates transcription from HIV-1 Long Terminal Repeat via the classical NF-kappaB pathway and functionally cooperates with Tat.** *Retrovirology* 2005, **2**:9.
18. Morini M, Benelli R, Giunciuglio D, Carlone S, Arena G, Noonan DM, Albini A: **Kaposi's sarcoma cells of different etiologic origins respond to HIV-Tat through the Flk-1/KDR (VEGFR-2): relevance in AIDS-KS pathology.** *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **273**:267–271.
19. Feller L, Wood NH, Lemmer J: **HIV-associated Kaposi sarcoma: pathogenic mechanisms.** *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007, **104**:521–529.
20. Chen X, Cheng L, Jia X, Zeng Y, Yao S, Lv Z, Qin D, Fang X, Lei Y, Lu C: **Human immunodeficiency virus type 1 Tat accelerates Kaposi sarcoma-associated herpesvirus Kaposin A-mediated tumorigenesis of transformed fibroblasts in vitro as well as in nude and immunocompetent mice.** *Neoplasia N Y N* 2009, **11**:1272–1284.
21. Wen KW, Damania B: **Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV): molecular biology and oncogenesis.** *Cancer Lett* 2010, **289**:140–150.
22. Pati S, Foulke JS Jr, Barabitskaya O, Kim J, Nair BC, Hone D, Smart J, Feldman RA, Reitz M: **Human herpesvirus 8-encoded vGPCR activates nuclear factor of activated T cells and collaborates with human immunodeficiency virus type 1 Tat.** *J Virol* 2003, **77**:5759–5773.
23. Barillari G, Gendelman R, Gallo RC, Ensoli B: **The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1, a growth factor for AIDS Kaposi sarcoma and cytokine-activated vascular cells, induces adhesion of the same cell types by using integrin receptors recognizing the RGD amino acid sequence.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**:7941–7945.
24. Guo H-G, Pati S, Sadowska M, Charurat M, Reitz M: **Tumorigenesis by human herpesvirus 8 vGPCR is accelerated by human immunodeficiency virus type 1 Tat.** *J Virol* 2004, **78**:9336–9342.
-

-
25. Xiao H, Neuveut C, Tiffany HL, Benkirane M, Rich EA, Murphy PM, Jeang KT: **Selective CXCR4 antagonism by Tat: implications for in vivo expansion of coreceptor use by HIV-1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:11466–11471.
26. Chirivi RG, Taraboletti G, Bani MR, Barra L, Piccinini G, Giacca M, Bussolino F, Giavazzi R: **Human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)-Tat protein promotes migration of acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma cells and enhances their adhesion to endothelial cells.** *Blood* 1999, **94**:1747–1754.
27. Boykins RA, Mahieux R, Shankavaram UT, Gho YS, Lee SF, Hewlett IK, Wahl LM, Kleinman HK, Brady JN, Yamada KM, Dhawan S: **Cutting edge: a short polypeptide domain of HIV-1-Tat protein mediates pathogenesis.** *J Immunol Baltim Md 1950* 1999, **163**:15–20.
28. Gonzalez-Hernandez MJ, Swanson MD, Contreras-Galindo R, Cookinham S, King SR, Noel RJ Jr, Kaplan MH, Markovitz DM: **Expression of human endogenous retrovirus type K (HML-2) is activated by the Tat protein of HIV-1.** *J Virol* 2012, **86**:7790–7805.
29. Zhong W, Wang H, Herndier B, Ganem D: **Restricted expression of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genes in Kaposi sarcoma.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**:6641–6646.
30. Zeng Y, Zhang X, Huang Z, Cheng L, Yao S, Qin D, Chen X, Tang Q, Lv Z, Zhang L, Lu C: **Intracellular Tat of human immunodeficiency virus type 1 activates lytic cycle replication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: role of JAK/STAT signaling.** *J Virol* 2007, **81**:2401–2417.
31. Varthakavi V, Smith RM, Deng H, Sun R, Spearman P: **Human immunodeficiency virus type-1 activates lytic cycle replication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus through induction of KSHV Rta.** *Virology* 2002, **297**:270–280.
32. Samaniego F, Pati S, Karp JE, Prakash O, Bose D: **Human herpesvirus 8 K1-associated nuclear factor-kappa B-dependent promoter activity: role in Kaposi's sarcoma inflammation?** *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001:15–23.
33. An F-Q, Folarin HM, Compitello N, Roth J, Gerson SL, McCrae KR, Fakhari FD, Dittmer DP, Renne R: **Long-term-infected telomerase-immortalized endothelial cells: a model for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency in vitro and in vivo.** *J Virol* 2006, **80**:4833–4846.
34. Fakhari FD, Dittmer DP: **Charting latency transcripts in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by whole-genome real-time quantitative PCR.** *J Virol* 2002, **76**:6213–6223.
35. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods San Diego Calif* 2001, **25**:402–408.

Anexos



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsardeni@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 07 de junho de 2.010

OF. 234/2010-CEP

Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira
Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina do Campus de Botucatu

Prezado Dr. Deilson,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 3548-2010) "Efeitos do silenciamento de tat e nef do vírus da imunodeficiência humana (HIV) sobre a expressão de genes do vírus associado ao sarcoma de Kaposi/Herpervírus humano tipo 8 (KSHV - HHV8) em células endoteliais humanas in vitro", a ser conduzido por Ana Paula Ferraz da Silva, orientada por Vossa Senhoria, com a colaboração da Dr^a Suzane Ramos da Silva, recebeu do relator parecer favorável aprovado em reunião de 07 de junho de 2.010.

Situação do Projeto: APROVADO. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,

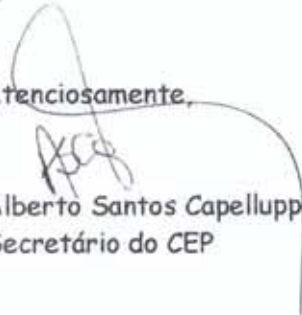

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP

Figura 1: Parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp.

Fls.
Proc.
Rub.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

MUDANÇA DE TÍTULO EM PROJETO DE PESQUISA*

Objetivo Acadêmico: Tese de Doutorado

Título constante no parecer inicial de aprovação: *"Efeitos do silenciamento de tat e nef do vírus da imunodeficiência humana (HIV) sobre a expressão de genes do vírus associado ao sarcoma de Kaposi/Herpesvírus humano tipo 8 (KSHV-HHV8) em células endoteliais humanas in vitro"*

Título final: *"Análise da expressão de genes selecionados do herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV) em células TIVE-LTC expostas à proteína tat do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1)"*

Data da reunião do CEP que aprovou o parecer inicial: 07/06/2010

Declaramos que o trabalho não sofreu alterações nos objetivos e/ou conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEP.

Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira
Orientador

Ana Paula Ferraz da Silva
Orientado

15.7 16-07/2014 000000 COMITE DE ETICA EM PESQUISA FMB - UNESP

Figura 2: Parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, para a mudança de título.