



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS**

DOUGLAS BARDINI SILVEIRA

***AVALIAÇÃO In Vitro* DA POTENCIAL MODULAÇÃO DA VIA UPR (*Unfolded Protein Response*) EM CÉLULAS MICROGLIAIS INDUZIDA PELA PROTEÍNA TAT DO HIV-1**

**FLORIANÓPOLIS
2022**

DOUGLAS BARDINI SILVEIRA

AVALIAÇÃO *In Vitro* DA POTENCIAL MODULAÇÃO DA VIA UPR (*Unfolded Protein Response*) EM CÉLULAS MICROGLIAIS INDUZIDA PELA PROTEÍNA TAT DO HIV-

1

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia e Biociências
Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo R. Pinto

FLORIANÓPOLIS
2022

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

Silveira, Douglas Bardini Silveira
AVALIAÇÃO In vitro DA POTENCIAL MODULAÇÃO DA VIA UPR
(Unfolded Protein Response) EM CÉLULAS MICROGLIAIS INDUZIDA
PELA PROTEÍNA TAT DO HIV-1 / Douglas Bardini Silveira
Silveira ; orientador, Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto
Pinto, 2022.
122 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis,
2022.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. HIV-1. 3. Tat. 4.
UPR. 5. Microglia. I. Pinto, Prof. Dr. Aguinaldo Roberto
Pinto. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.
III. Título.

Douglas Bardini Silveira

AVALIAÇÃO In vitro DA POTENCIAL MODULAÇÃO DA VIA UPR (Unfolded Protein Response) EM CÉLULAS MICROGLIAIS INDUZIDA PELA PROTEÍNA TAT DO HIV-

1

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Gislaine Fongaro, Doutora em Biotecnologia e Biociências
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia,
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Marcelo Farina Doutor em Ciências Biológicas (Bioquímica),
Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Daniel Mansur, Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia),
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia,
Universidade Federal de Santa Catarina. (Suplente)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Biotecnologia e Biociências

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Prof. Aguinaldo R. Pinto, Doutor em Ciências Biológicas, Departamento de
Microbiologia, Imunologia e Parasitologia,
Universidade Federal de Santa Catarina
Orientador

Florianópolis, 2022

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Aplicada - LIA/CCB/UFSC com recursos financeiros do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), além de contar com equipamentos e reagentes gentilmente cedidos pelo Laboratório de Virologia Aplicada, Laboratório de Protozoologia, Laboratório de Imunobiologia, Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (Departamento de Microbiologia, imunologia e Parasitologia, UFSC), Laboratório de Imunorregulação Molecular (Departamento de Imunologia, Universidade de São Paulo – USP) e Instituto Carlos Chagas.

*Este trabalho é dedicado à toda minha
família, em especial à minha mulher e filho.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre e acima de tudo.

Aos meus pais, Elemar e Ivanir, por todo o auxílio e apoio incondicionais.

Ao Prof. Dr. Aguinaldo Pinto pela oportunidade, confiança, paciência, e ensinamentos que levarei para toda minha vida. A quem hoje considero, além de um mestre, um grande amigo.

Aos bons amigos de laboratório Wellinton Muniz e Monique Américo Ferrary pelo ótimo convívio, suporte nos experimentos e pelos bons momentos de lazer e descontração vivenciados.

Aos Professores Oscar Bruña-Romero, Juliano Bordingnon, Gislaine Fongaro, Rafael Rosa, Daniel Mansur, Hernán Francisco Terenzi e Maristela Martins Carmargo, pelas considerações técnicas e reagentes gentilmente cedidos.

Aos integrantes do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia, pelo apoio técnico.

Aos integrantes do Laboratório de Virologia Aplicada, Laboratório de Protozoologia, Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas e Laboratorio de Biologia Estrutural pelo auxílio e disponibilidade à utilização de reagentes e equipamentos.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências, representada pelo Prof. Dr. Glauber Wagner, pela orientação e apoio.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela infra-estrutura e oportunidade.

Em especial, à minha esposa, Maria Cláudia Ramos Guedes, pelo amor e apoio durante essa longa caminhada, nos bons e maus momentos. E, sem dúvida, pelo maior presente que eu poderia ganhar.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

EPÍGRAFE

“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

RESUMO

O processo neurodegenerativo e seus consequentes prejuízos cognitivos decorrentes da infecção pelo *Human Immunodeficiency Virus Type 1* – HIV-1, denominados em seu conjunto como *HIV-1-Associated Neurocognitive Disorders* (HAND), destacam-se como um aspecto relevante da patologia viral. Uma vez no Sistema Nervoso Central, o HIV-1 pode desencadear, de forma direta ou por meio de proteínas virais circulantes, a ativação inflamogênica da micróglia, descrita como um dos componentes das HAND. Sugere-se que a proteína de Transativação viral (Tat), continuamente secretada por células infectadas, possa ser o principal fator de indução da atividade neuroinflamatória da micróglia, assumindo assim um papel fundamental na neurotoxicidade associada ao HIV-1. Em paralelo, estudos recentes têm sugerido a modulação das respostas celulares à quebra da proteostase e estresse do Retículo Endoplasmático (RE), coordenadas pelas vias de sinalização UPR (*Unfolded Protein Response*), como uma das estratégias do HIV-1 para a síntese de partículas, depleção de células imunocompetentes e regulação da atividade celular em diferentes tecidos. Dessa forma, o presente trabalho se propôs a investigar os mecanismos celulares envolvidos na potencial modulação da via UPR em células microgliais induzida pela ação da proteína Tat do HIV-1 *in vitro*. A abordagem experimental partiu do desenvolvimento de um sistema de expressão heteróloga de Tat e da utilização da linhagem microglial BV-2 como modelo celular. Células BV-2 estimuladas com Tat apresentaram aumento significativo da expressão de marcadores de fenótipo de ativação inflamatório (M1) em paralelo à deflagração de cascatas de sinalização relacionadas à UPR, indicando o efeito indutor de Tat. Ademais, o bloqueio farmacológico de sensores de ativação de vias distintas da UPR – PERK e IRE1 – através dos respectivos inibidores GSK2606414 e 4 μ C8 resultou na atenuação do estado de ativação inflamatória induzido por Tat em células BV-2, sugerindo papel de IRE1 e PERK nos mecanismos neuroinflamatórios mediados por Tat em micróglia. Os achados relatados neste trabalho atestam a capacidade de Tat circulante em modular as respostas de estresse do RE e os mecanismos de ativação inflamatória em células microgliais e abrem margem à utilização das vias UPR como alvos terapêuticos nas HAND.

Palavras-chave: HIV-1, HAND, Micróglia, UPR, Tat.

ABSTRACT

The neurodegeneration and resulting cognitive impairments caused by Human Immunodeficiency Virus Type 1 – HIV-1, termed HIV-1-Associated Neurocognitive Disorders (HAND), highlights as an issue of viral pathology. Once in Central Nervous System, HIV-1 induces an inflammatory state on microglia, which is described as a central feature of HAND. It has been suggested that the viral Transactivation Protein (Tat), continuously secreted by infected cells, may be the main effector of microglial neuroinflammatory activity and play a role in HIV-1-associated neurotoxicity. Additionally, recent works have shown the modulation of Endoplasmic Reticulum (ER) stress, coordinated by the UPR (Unfolded Protein Response) pathways, as one of the HIV-1 strategies for virion synthesis, immunocompetent cells depletion and regulation of cellular activity in different tissues. The present study sought to investigate the cellular mechanisms involved in potential modulation of UPR signaling in HIV-1 Tat-activated microglia *in vitro*. The experimental methods comprised a heterologous Tat expression approach and the employing of BV-2 microglial-like cells as an *in vitro* model. Tat-stimulated BV-2 cells showed a marked upregulation of inflammatory, M1 activation markers confluent with UPR-related signaling components, providing evidence of Tat ability to drive a pro-inflammatory activation state in microglia. Further, the pharmacological blocking of distinct UPR sensors, PERK and IRE1, through the respective inhibitors GSK2606414 and 4 μ C8 resulted in an attenuation of Tat-promoted M1 state in BV-2 cells, which suggest a role of both IRE1 and PERK pathways in HAND neuroinflammation mechanisms. The findings reported here confirm the bystander effects of HIV-1 Tat in modulating a coupled ER stress responses and microglial inflammatory activity and support the use of UPR branches as therapeutic targets in HAND.

Keywords: HIV-1, HAND, Microglia, UPR, Tat.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1. Representação esquemática da potencial ação do HIV na polarização fenotípica da micróglia	23
FIGURA 2.2. Representação esquemática da estrutura molecular de Tat.....	25
FIGURA 2.3. Os três braços da via UPR	28
FIGURA 3.1. Sistema de expressão de Tat baseado no vetor pET-15b	50
FIGURA 3.2. Purificação de Tat expressa em E.coli BL21(DE3).....	51
FIGURA 3.3. Caracterização bioquímica de Tat recombinante por espectrometria de massas (MALDI-MS/MS).....	52
FIGURA 3.4. Atividade <i>in vitro</i> de Tat recombinante.....	56
FIGURA 3.5. Tat induz a expressão de componentes da via UPR em células BV-2	58
FIGURE 4.1. Initial assessment of HIV-Tat activity profile on BV-2 cells.	73
FIGURE 4.2. HIV Tat induces M1 inflammatory phenotype in BV-2 cells.	75
FIGURE 4.3. HIV-Tat upregulates UPR-related molecules in BV-2 cells	77
FIGURE 4.4. Pharmacological inhibition of PERK downregulates the Tat-induced ER stress in BV-2 cells.....	80
FIGURE 4.5. Pharmacological inhibition of PERK attenuates the Tat-induced M1 phenotype in BV-2 cells.....	83
SUPPLEMENTARY FIGURE 1. Expression, purification, and characterization of recombinant HIV-Tat.	88
SUPPORTING FIGURE 2. Flow cytometry gating strategy for BV-2 cells.	89
FIGURE 5.1: Effect of IRE1 inhibitor 4 μ 8C on cell viability and apoptotic fate of Tat-induced M1-like BV-2 cells.	97
FIGURE 5.2. 4 μ 8C downregulates HIV Tat-induced ER stress in BV-2 cells by interfering with the IRE1 pathway.....	99
FIGURE 5.3. Inhibition of IRE1 RNase activity attenuates Tat-induced M1 phenotype in BV-2 cells	101
FIGURA 6.1. O papel da sinalização de IRE1 e PERK no estado de ativação inflamatória em células microgliais induzido por Tat	111
FIGURA 1 APÊNDICE B. Transfecção e expressão de Tat recombinante em células Hek 293.....	117

FIGURA 2 APÊNDICE C. Curvas de dissociação observadas nos experimentos de RT-qPCR para os iniciadores utilizados.....	119
FIGURA 1 APÊNDICE D. Imagens não editadas dos Western Blots apresentados no Capítulo 3.....	120
FIGURA 2 APÊNDICE D. Imagens não editadas dos Western Blots apresentados no Capítulo 4.....	121

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 Iniciadores utilizados para as análises de RT-qPCR.....	48
TABELA 3.2 Identificação e caracterização dos fragmentos peptídicos de Tat recombinante através de MALDI-MS/MS – PMF (<i>Peptide Mass Fingerprint</i>).....	52
SUPPORTING TABLE 1. Matched peptide residues of recombinant Tat through MALDI-MS/MS - Peptide Mass Fingerprint*.....	89
SUPPORTING TABLE 2. Primers used to assess the relative expression of ER stress- and M1/M2-related target genes by RT-qPCR Os três braços da via UPR.....	90
TABELA 1 APÊNDICE B. Avaliação de rendimento da proteína Tat recombinante expressa em um modelo eucarioto.	117
TABELA 1 APÊNDICE C. Valores dos parâmetros considerados na validação dos pares de iniciadores utilizados	118

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD *7-Aminoactinomycin D*

ASK1 *Associated Signal-related Kinase 1*

ATF4 *Activating Transcription Factor 4*

ATF6 *Activating Transcription Factor 6*

BiP/GRP78 *Binding Protein/Glucose Regulated Protein 78*

cART *Combination Antiretroviral Therapy*

CCL2 *C-C motif chemokine ligand 2*

CCL5 *C-C motif chemokine ligand 5*

CCR5 *C-C motif chemokine receptor 5*

CXCL8 *Chemokine C-X-C motif ligand 8*

CX3CR1 *CX3C chemokine receptor 1*

CXCR4 *C-X-C motif chemokine receptor 4*

CD4 *Cluster of Differentiation 4*

CD16/32 *Cluster of Differentiation 16/32*

CD206 *Cluster of Differentiation 206*

CHOP *C/EBP homology protein*

eIF2 α *Eukariotic Iniciation Factor 2 Alpha*

ERAD *ER-associated Degradation*

FITC *Fluorescein Isothiocyanate (fluorocromo)*

GADD34 *Growth Arrest and DNA Damage-Inducible 34*

HAND *HIV-1-Associated Neurocognitive Disorders*

HIV-1 *Human Immunodeficiency Virus Type 1*

IFN- γ *Interferon gamma*

iNOs *Inducible Nitric Oxide synthase*

IL-6 *Interleucina 6*

IL-8 *Interleucina 8*

IL-12 *Interleucina 12*

IRE1 *Inositol Requiring Enzyme 1*

I κ K *I κ B Kinase*

I κ B α *Nuclear Factor of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer in B-cells Inhibitor, Alpha*

JAKs *Janus Kinases*

JNK-1 *Jun Kinase 1*

LPS *Lipopolissacarídeo*

MALDI-TOF *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*

MALDI-MS/MS *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Tandem Mass Spectrometry*

MAPKs *Mitogen Activating Protein Kinases*

MCP-1 *Monocyte Chemoattractant Protein 1*

MIP-1 α *Macrophage Inflammatory Protein-1 Alpha*

MIP-1 β *Macrophage Inflammatory Protein-1 Beta*

mRNA *messenger Ribonucleic Acid*

MTT 3-[4,5-dimetiazol-2il]-2,5-difenil brometo de tetrazólio

NF- κ B *Nuclear Factor kappa B*

NLRP3 *NLR family pyrin domain containing 3*

NO *Nitric Oxide*

PE *Phycoerythrin* (fluorocromo)

PERK *Protein Kinase-like ER Kinase*

PMF *Peptide Mass Fingerprint*

PKR *RNA-dependent Protein Kinase*

RE *Retículo Endoplasmático*

RIDD *Regulated IRE1-dependent decay*

RT-qPCR *Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

SNC *Sistema Nervoso Central*

Tat *Proteína de Transativação*

TNF- α *Tumor Necrosis Factor Alpha*

UPR *Unfolded Protein Response*

TRAF2 *TNF- α Receptor Associated Factor 2*

XBP-1 *X-box-binding-protein 1*

XBP-1s *X-box-binding-protein 1 spliced*

SUMÁRIO

1.	APRESENTAÇÃO	20
2.	CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL	21
2.1	A NEURODEGENERAÇÃO ASSOCIADA AO HIV-1	21
2.2	O PERFIL DE ATIVAÇÃO MICROGLIAL INDUZIDA PELO HIV-1.....	22
2.3	A PROTEÍNA DE TRANSATIVAÇÃO VIRAL – TAT.....	24
2.4	A VIA UPR (<i>Unfolded Protein Response</i>).....	26
2.4	HIV-1 E A VIA UPR	30
2.6	HIPÓTESE	32
2.7	OBJETIVOS	32
2.7.1	Objetivo Geral.....	32
2.7.2	Objetivos Específicos	32
2.8	REFERÊNCIAS	33
3.	CAPÍTULO 2: ABORDAGEM EXPERIMENTAL <i>In Vitro</i>.....	38
3.1	INTRODUÇÃO	38
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.2.1	Transformação.....	40
3.2.2	Expressão da proteína Tat recombinante	41
3.2.3	Purificação da proteína Tat recombinante	41
3.2.4	Eletroforese e Dot-Blot	42
3.2.5	Espectrometria de massas	43
3.2.6	Cultura celular e estimulação.....	44
3.2.7	Dosagem de NO.....	45
3.2.8	Análise de viabilidade celular.....	45
3.2.9	<i>Cytometric Bead Array</i> – CBA.....	46
3.2.10	Análise da expressão de marcadores das vias UPR por RT-qPCR ...	46
3.2.11	Análise estatística	48
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
3.3.1	Expressão, purificação e caracterização de Tat recombinante.....	49
3.3.2	Avaliação da atividade biológica de Tat recombinante	53
3.4	REFERÊNCIAS	58

4.	CAPÍTULO 3: PHARMACOLOGICAL INHIBITION OF UPR SENSOR PERK ATTENUATES HIV TAT-INDUCED INFLAMMATORY M1 PHENOTYPE IN MICROGLIAL CELLS.....	64
4.1	ABSTRACT	64
4.2	INTRODUCTION	64
4.3	MATERIAL AND METHODS	66
4.3.1	Recombinant HIV-1 Tat protein production and purification.....	66
4.3.2	Cell culture and treatments	67
4.3.3	Measurement of CD16/32 and CD206 expression.....	68
4.3.4	Cell viability and apoptosis assessment.....	68
4.3.5	Cytometric bead array and NO dosage	69
4.3.6	Western blotting analysis	69
4.3.7	Quantitative real-time PCR	70
4.3.8	Statistical analysis	70
4.4	RESULTS.....	70
4.4.1	Effects of recombinant HIV-1 Tat on BV-2 cell viability and NO synthesis.....	70
4.4.2	Pro-inflammatory microglial phenotype is induced by recombinant HIV-1 Tat stimulation.....	71
4.4.3	Recombinant HIV-1 Tat triggered UPR pathway in BV-2 cells.....	72
4.4.4	GSK2606414 reduces HIV-1 Tat-mediated PERK-dependent ER stress in BV-2 cells	74
4.4.5	GSK2606414 inhibition of PERK impairs Tat-induced M1 phenotype in BV-2 cells	74
4.5	DISCUSSION	78
4.6	ACKNOWLEDGMENTS	82
4.7	AUTHORS CONTRIBUTIONS	82
4.8	REFERENCES	84
4.9	SUPPORTING INFORMATION.....	88
4.9.1	Supporting Information References	90
5.	CAPÍTULO 4: INHIBITING IRE-1RNASE SIGNALING DECREASES HIV-1 TAT-INDUCED INFLAMMATORY M1 STATE IN MICROGLIAL CELLS	92
5.1	ABSTRACT	92

5.2	INTRODUCTION	92
5.3	MATERIAL AND METHODS	94
5.3.1	Cell culture and experimental agents.....	94
5.3.2	Cell viability and apoptosis assessment	94
5.3.3	Measurement of CD16/32 and CD206 expression.....	95
5.3.4	Cytometric bead array and NO dosage	95
5.3.5	Western blotting analysis	95
5.3.6	Quantitative real-time PCR	96
5.3.7	Statistical analysis	96
5.3.8	Statistical analysis	96
5.4	RESULTS	96
5.5	DISCUSSION	99
5.6	ACKNOWLEDGMENTS	102
5.7	AUTHORS CONTRIBUTIONS	103
5.8	REFERENCES	103
6.	CAPÍTULO 5: DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES.....	107
6.1	REFERÊNCIAS	111
	APÊNDICE A – Outros Trabalhos e Publicações Acadêmicas.....	114
	APÊNDICE B – Método e Resultados da Produção de Tat Recombinante em Sistema de Expressão Eucarioto.....	115
	APÊNDICE C – Curvas de dissociação e parâmetros utilizados para análise e validação dos iniciadores utilizados nos experimentos de RT-qPCR.....	118
	APÊNDICE D – Imagens não editadas dos Western Blots utilizados para a montagem das Figuras apresentadas nos Capítulo 3 e 4	120

1. APRESENTAÇÃO

A presente tese de doutorado foi redigida em capítulos, incluindo: uma introdução geral; três capítulos de resultados; uma discussão global dos resultados e respectivas conclusões. A introdução geral apresenta conceitos fundamentais para a interpretação e contextualização da hipótese central do estudo e resultados alcançados e divide-se nas seguintes seções: i) neuropatologia básica dos distúrbios cognitivos associados ao HIV e seu fator circulante, Tat; ii) breve revisão sobre o papel da ativação microglial induzida pelo HIV; iii) introdução acerca das vias e mecanismos moleculares que compõe a UPR; iv) possíveis mecanismos de modulação e interação do HIV e UPR. O terceiro e quarto capítulos estruturam-se no formato exigido por revistas científicas, em língua inglesa, apresentando um resumo, breve introdução, materiais e métodos específicos, resultados e discussão.

2. CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

Os distúrbios neurocognitivos associados ao vírus HIV-1, referidos em seu conjunto como *HIV-1-Associated Neurocognitive Disorders* (HAND), são decorrentes de um processo neurodegenerativo contínuo e despontam como as mais prevalentes comorbidades observadas durante o curso da infecção. Um dos pontos consensuais sobre a patogênese da injúria neuronal associada ao HIV-1 é a ativação crônica da microglia e consequente liberação de uma série de fatores neuroinflamogênicos induzidos, em parte, pela ação da proteína viral de transativação (Tat) circulante no tecido nervoso central. Em paralelo, pesquisas recentes têm sugerido a modulação das respostas de estresse celular pelo HIV-1, mediados pela via de sinalização UPR (*Unfolded Protein Response*), como uma das estratégias virais para a síntese de vírions, depleção de células imunocompetentes e regulação de intervalos de latência. Embora o corpo de evidências do envolvimento da via UPR na atividade biológica do HIV-1 seja robusto, diferentes pontos da relação viral com a deflagração e sinalização intrínsecas à UPR permanecem obscuras; consoante à essa prerrogativa, pouco é relatado sobre a participação da via UPR nos mecanismos celulares inerentes à neurodegeneração ocasionada pelo HIV-1. O presente capítulo propõe fundamentar o entendimento da ação da proteína viral Tat na atividade neuroinflamatória de células microgliais, bem como sua potencial relação com as respostas moleculares ao estresse do RE, conforme o relatado em literatura.

2.1 A NEURODEGENERAÇÃO ASSOCIADA AO HIV-1

A infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1 (*Human Immunodeficiency Virus Type 1*, HIV-1) emergiu nas últimas décadas como um problema de saúde pública de amplas proporções. No curso inicial da infecção, o HIV-1 é capaz de invadir o Sistema Nervoso Central (SNC) e infectar células residentes, que passam a atuar como reservatório viral (BANDERA *et al*, 2019). Neste cenário, a ação do vírus resulta em neurodegeneração progressiva e ocasiona uma gama de potenciais deficiências neurocognitivas, referidas em seu conjunto como *HIV-1-Associated Neurocognitive Disorders* (HAND), cuja manifestações variam de uma ligeira imparidade cognitiva até quadros de demência severa (KATURI *et al*, 2019).

Embora o vírus não apresente tropismo por células neuronais, postula-se que a patogênese das HAND esteja associada ao efeito *bystander* exercido por fatores virais circulantes, tais como Tat - proteína de transativação abundantemente expressa e liberada nos estágios iniciais da replicação viral, de ação neurotóxica amplamente descrita (RUIZ *et al*, 2019; IROLLO *et al*, 2021). Contudo, atribui-se parte do mecanismo de neurodegeneração observado nas HAND à exacerbação da atividade de populações celulares de origem mieloide relacionadas ao aporte homeostático e imunocompetente no SNC, denominadas micróglia. Uma vez reativas, as células microgliais podem induzir uma série de respostas neurodegenerativas através da indução de um cenário pró-inflamatório, além de promover a liberação e recaptação de fatores neurotróficos e outros transmissores químicos (HONG e BANKS, 2015; CHIVERO *et al*, 2017; THANGARAJ *et al*, 2018; IROLLO *et al*, 2021).

2.2 O PERFIL DE ATIVAÇÃO MICROGLIAL INDUZIDA PELO HIV-1

A irrupção do HIV-1 em células microgliais dá-se pela interação da glicoproteína de envelope denominada gp120 com receptores CD4 e co-receptores quimiotáticos CCR5 e CXCR4, seguida de endocitose. Embora quiescente em condições fisiológicas, a micróglia torna-se reativa através do estímulo deflagrado pela infecção do HIV-1 ou mediado pelas proteínas Tat e gp120, representando o principal sítio de replicação e síntese de proteínas virais solúveis e assumindo um caráter neuropatogênico substancial nas HAND (CASTELLANO *et al*, 2017; BORRAJO LÓPEZ *et al*, 2021). A atividade microglial induzida pela ação viral resulta na expressão de um perfil fenotípico inflamogênico, denominado M1 (Figura 2.1), marcado pela síntese de quimiocinas (CCL2, CCL5, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β) e mediadores pró-inflamatórios (TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12), formação de ROS (*Reactive Oxygen Species*), depleção de Ca²⁺ intracelular e extravasamento de L-glutamato (HONG e BANKS, 2015; ORIHUELA *et al*, 2015; SU *et al*, 2016; GRAZIANO *et al*, 2016; CHIVERO *et al*, 2017; BORRAJO *et al*, 2021). Sugere-se que a translocação do fator NF- κ B exerça um papel central no processo de ativação microglial via Tat e gp120 e seja mediada pela fosforilação das principais quinases relacionadas à família MAPKs (*Mitogen Activating Protein Kinases*) – p38, p42/44 e JNK-1 (*Jun Kinase 1*) – com consequente degradação de I κ B α , fator inibidor de NF- κ B, seguida de fosforilação do homodímero

p65/p50 (RAO *et al*, 2014; KATURI *et al*, 2019). Contudo, a produção de ROS por células microgliais desencadeada pela ação de Tat parece ser independente do eixo MAPKs/NF- κ B, requerendo outros mecanismos de sinalização (HERBEIN *et al*, 2010; BORRAJO *et al*, 2021).

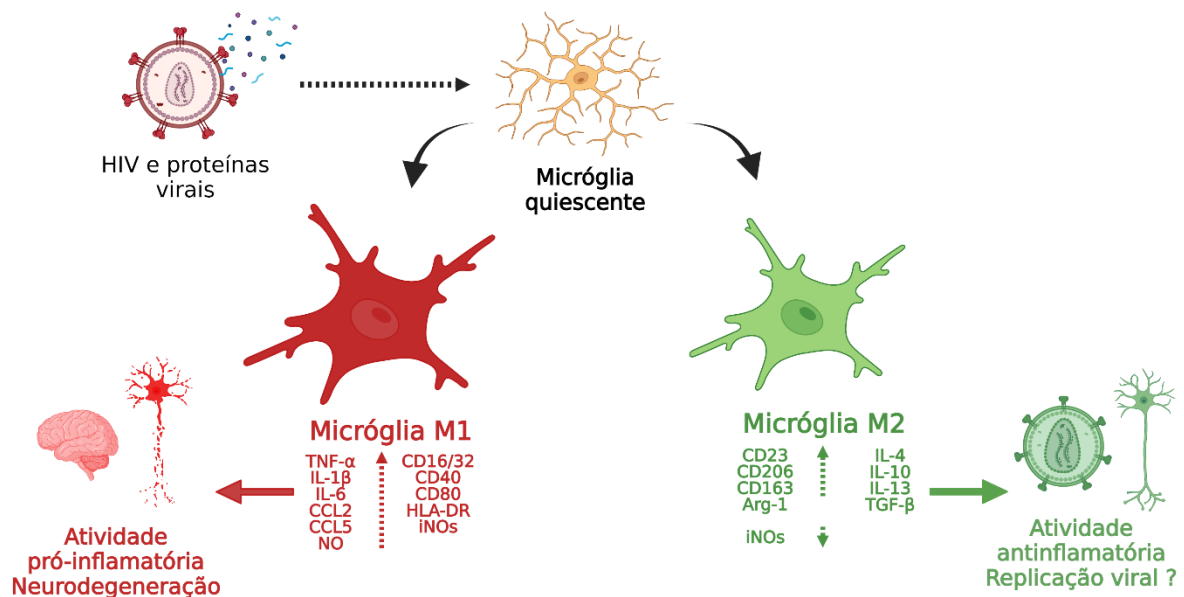


FIGURA 2.1. Representação esquemática da potencial ação do HIV na polarização fenotípica da microglia. Fonte: do autor.

Em paralelo à descrição da atividade microglial pró-inflamatória nas HAND, a presença de subpopulações microgliais portadoras de um fenótipo de ativação alternativo – designado como M2 – é relatada em diferentes estágios da infecção, potencialmente associada a um mecanismo dinâmico de polarização fenotípica desencadeado pelo estímulo viral (HERBEIN e VARIN, 2010; ORIHUELA *et al*, 2015; GRAZIANO *et al*, 2016). Essas células diferem do perfil de ativação inflamatória pela expressão de fatores de resolução do processo inflamatório, reparo tecidual e angiogênese, desempenhando um papel na reversão da injúria neuronal (HERBEIN e VARIN, 2010; ORIHUELA *et al*, 2015; TANG e LE *et al*, 2016). Congruente ao distinto programa de expressão fenotípica, o mecanismo de sinalização molecular preponderante no fenótipo de ativação alternativo é coordenado pela translocação dos fatores STAT3/STAT6 através de cascatas de fosforilação de proteínas JAKs (*Janus Kinases*), conquanto a síntese de moléculas acessórias como SOCS-1 e SOCS-3 esteja atrelada à transdução mediada por NF- κ B (ORIHUELA *et al*, 2015; TANG e LE

et al, 2016; CHEN *et al*, 2016). Embora a relevância do fenótipo de ativação microglial M2 no contexto das HAND não seja totalmente compreendida, infere-se que a falha na instauração de uma resposta eficaz de reparo tecidual pode contribuir para o estabelecimento de um processo inflamatório contínuo e, dessa forma, estar implicado na progressão do quadro neurodegenerativo (HERBEIN *et al*, 2010; HERBEIN e VARIN, 2010; ORIHUELA *et al*, 2015; TANG e LE *et al*, 2016; CHEN *et al*, 2016; BORRAJO *et al*, 2021). Em conjunto, estes dados sustentam o consenso em torno do papel central da atividade microglial na ofensa neuronal observada nas HAND.

2.3 A PROTEÍNA DE TRANSATIVAÇÃO VIRAL – TAT

O gene de Transativação Transcricional do HIV-1 expressa uma proteína efetora de 10-16 kDa denominada Tat que, conforme sua designação, apresenta-se como fator chave para o início dos processos transcricionais do vírus após irrupção celular. Esta pequena proteína pode apresentar alterações estruturais conforme a variante do HIV-1, oscilando seu tamanho entre 86 a 104 aminoácidos, com formação de homodímeros (Figura 2.2). Tat é codificada por dois éxons, sendo o primeiro (resíduos 1-72) altamente conservado entre os isolados virais descritos e reconhecido por quatro domínios funcionais: um domínio N-terminal (resíduos 1-21); um domínio rico em cisteína (resíduos 27-37); o “core” proteico (resíduos 38-48) e uma região básica rica em arginina e lisina (resíduos 49-57). O segundo éxon (resíduos 73-86/104) é parcialmente conservado e geralmente apresenta um motivo arginina-glicina-aspartato capaz de interagir com integrinas expressas por células endoteliais, células dentríticas e macrófagos ativados (ABULWERDI *et al*, 2017; AJASIM e EUGENIN, 2020). Em particular, o domínio rico em cisteína está intrinsecamente relacionado com a formação de multímeros e agregados proteicos, tráfico e internacionalização de Tat, exercendo um papel crucial em sua atividade biológica (AJASIM e EUGENIN, 2020).

Diferente da ação canônica de fatores de transcrição com domínios de ligação ao DNA, Tat é capaz de associar-se a sequências específicas de ribonucleotídeos da molécula de RNA viral – conhecidas como TAR (*Transactivator Response Element*) – e recrutar o maquinário celular para a iniciação e alongação do transcrito viral (DEBAISEIUX *et al*, 2012; BAGASHEV e SAWAYA, 2013). Embora a transativação viral mediada por Tat em grande parte das espécies celulares requiera sequências

TAR, a ativação da expressão gênica do HIV-1 através da ligação direta às regiões LTR (*Long Terminal Repeat*) do RNA viral em diferentes linhagens neurogliais na ausência de TAR foi descrita (BELLINO *et al*, 2014). Em consoante, sugere-se que a flexibilidade molecular de Tat favoreça o estabelecimento de ligações a uma variedade de sítios biológicos e resulte na expressão de uma gama de fatores celulares durante a infecção produtiva no SNC, acarretando na ativação de respostas imunogênicas e depleção de células imunocompetentes do tecido nervoso e disfunções na transmissão excitatória e apoptose em células neuronais (DEBAISEIUX *et al*, 2012; BAGASHEV e SAWAYA, 2013; BELLINO *et al*, 2014).

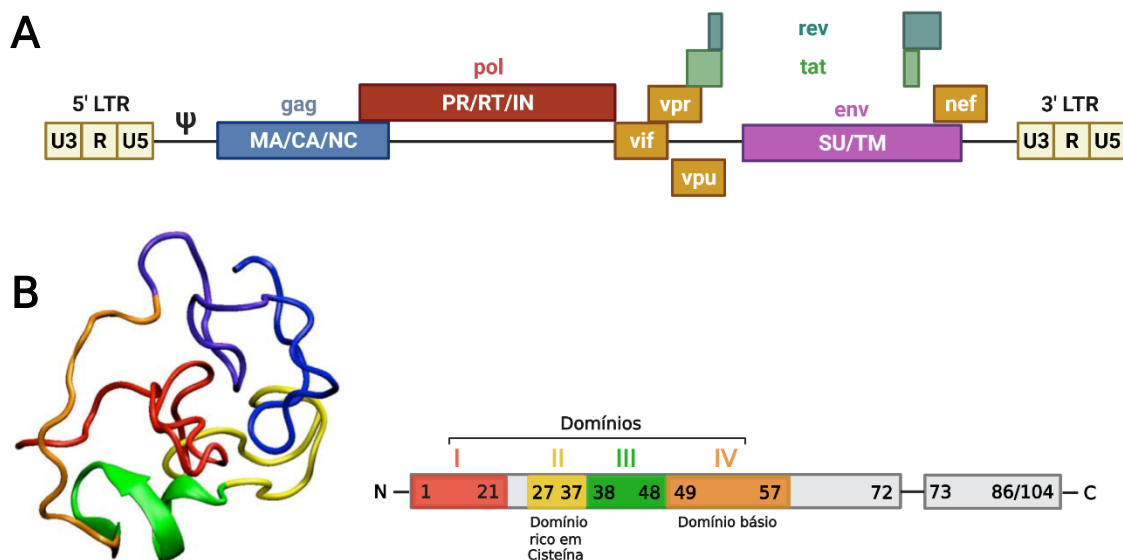


FIGURA 2.2. Representação esquemática da estrutura molecular de Tat. A. Representação do genoma viral, apresentando os éxons que codificam Tat. B. Estrutura tridimensional de Tat, apresentando os principais domínios que a constitui. Adaptado de QUY *et al*, 2012.

Além de sua síntese e atividade intracelular em células infectadas pelo HIV-1, Tat é ativamente liberada no meio extracelular através de um mecanismo não convencional de secreção baseado na estreita relação entre domínios básicos e fosfoinositídeos de membrana, que permeia o recrutamento e exportação da proteína viral através de membranas (BAGASHEV e SAWAYA, 2013; AJASIM e EUGENIN, 2020). Uma vez circulante, Tat pode interagir de forma promíscua com uma série de moléculas de superfície celular, como receptores de dipeptidil aminopeptidase IV (CD26), receptores neuronais NMDAR (*N-Methyl-D-aspartate Receptor*), CXCR4 e os ubíquos LPR (*Lipoprotein Receptor-Related Protein*) HSPGs (*Heparan Sulphate*

Proteoglycans), sendo internalizada por endocitose (BELLINO *et al*, 2014). Infere-se que a translocação de Tat do lúmen do endossomo para o citosol é dirigida pela exposição de domínios específicos induzida por diminuição do pH endossomal, permitindo a inserção membranar e posterior reestruturação conformacional catalisada na face *cis* citosólica por chaperonas endógenas da família Hsp90 (*Heat shock protein 90*). Estudos recentes têm demonstrado a entrada direta de Tat circulante através de endocitose por células componentes da barreira hematoencefálica e sua atividade deletéria na integridade das junções ocludentes entre células endoteliais (BAGASHEV e SAWAYA, 2013). Relata-se ainda a capacidade de Tat em alterar o *status* metabólico do SNC, ocasionando estresse oxidativo, distúrbios das vias glicolíticas e inibição da biogênese mitocondrial com impacto decorrente nas redes de sinalização e aporte neuronal de astrócitos e micróglia (THANGARAJ *et al*, 2020; SIVALINGAM *et al*, 2021). Dessa forma, Tat destaca-se como um ator fundamental na patogenicidade e neurodegeneração exercida pelo HIV-1 no SNC.

2.4 A VIA UPR (*Unfolded Protein Response*)

O Retículo Endoplasmático (RE) é o primeiro compartimento membranar constituinte das vias metabólicas de síntese e secreção em células eucarióticas. Dentre suas principais funções biológicas, atua na biossíntese e processamento de polipeptídeos, lípidios e esteróis, além de sítio de reserva de Ca^{2+} intracelular. Em paralelo às vias de síntese, o RE abriga uma série de mecanismos moleculares responsáveis pela homeostase e correta conformação de proteínas recém-formadas, designada *Unfolded Protein Response* (UPR). Trata-se de uma via molecular de resposta tempo-dependente deflagrada pelo acúmulo de proteínas não funcionais e/ou agregados polipeptídicos, decorrentes de intensa atividade metabólica, mutações, hipoxia, depleção de Ca^{2+} , infecções virais, entre outras condições de estresse celular (SCHRÖDER, 2008; WALTER e RON, 2011; HETZ e PAPA, 2018; KOHLI *et al*, 2021).

A presença de proteínas mal-dobradas na porção intraluminal do RE é reconhecida pela interação com chaperonas moleculares capazes de remodelar a proteína à sua conformação nativa ou dirigí-la à translocação e degradação via

proteossomo – mecanismo denominado ERAD (*ER-associated Degradation*, WALTER e RON, 2011). Dentre estas, a enzima ATP-dependente BiP/GRP78 (*Binding Protein/Glucose Regulated Protein 78*) destaca-se como a mais abundante chaperona expressa no lúmen endoplasmático. Em condições fisiológicas, moléculas de BiP/GRP78 ligam-se a resíduos hidrofóbicos de proteínas nascentes e encontra-se acopladas às proteínas transmembrana residentes IRE1 (*Inositol Requiring Enzyme 1*), PERK (*Protein Kinase-like ER Kinase*) e ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*). Sob estresse do RE e o consequente aumento da expressão de proteínas desenoveladas, ocorre o desligamento BiP/GRP78 em relação à IRE1, PERK e ATF6 e a exposição de suas porções intraluminais. Uma vez livres, estas proteínas transmembrana atuam como gatilho de diferentes cascatas de sinalização molecular inerentes à via UPR e sua ativação pode resultar sequencialmente em atenuação da síntese proteica, processamento e degradação de proteínas no RE e, por fim, apoptose (SCHRÖDER, 2008; WALTER e RON, 2011; HETZ e PAPA, 2018; KOHLI *et al*, 2021).

Após a liberação de BiP/GRP78, PERK e IRE1 sofrem oligomerização e transfosforilação e suas porções citoplasmáticas tornam-se efetoras de dois diferentes braços da via UPR (Figura 2.3). A ativação de PERK expõe seu domínio quinase e leva à fosforilação de resíduos de serina da subunidade α do fator de iniciação da tradução eucariótico 2 (*Eukariotic Inicitation Factor 2 α* , eIF2 α), inibindo a interação entre as subunidades ribossomais e resultando em atenuação do processo de síntese proteica. (HUGHES e MALLUCCI, 2019). Em adição, a atenuação geral do processo de síntese mediado por PERK resulta na depleção de proteínas de meia-vida curta envolvidas na regulação do ciclo celular, bloqueando a progressão da fase G₁/S em células sob estresse do RE (WALTER e RON, 2011; HETZ *et al*, 2020). A ação de PERK é transiente à medida que seu domínio citoplasmático é desfosforilado por fosfatases específicas como CReP (*Constitutive Repressor of eIF2 α Phosphorilation*), de expressão constitutiva, e GADD34 (*Growth Arrest and DNA Damage-Inducible 34*) e p58^{IPK}, induzidas pelas vias deflagradas por PERK e ATF6, respectivamente (HETZ e PAPA, 2018). Curiosamente, o estado de atenuação traducional mediado por eIF2 α fosforilado leva à expressão do fator de transcrição ATF4 (*Activating Transcription Factor 4*), uma proteína de 39kDa que regula promotores de genes envolvidos na via UPR, incluindo os genes codificantes para BiP/GRP78 e GADD34 - contribuindo assim

para o restabelecimento da proteostase do RE. ATF4 pode induzir tardiamente o processo apoptótico através da expressão do fator de transcrição CHOP (*C/EBP homology protein*), uma proteína capaz de inibir a expressão de fatores antiapoptóticos, como a molécula Bcl-2 (WALTER e RON, 2011; HETZ *et al*, 2020).

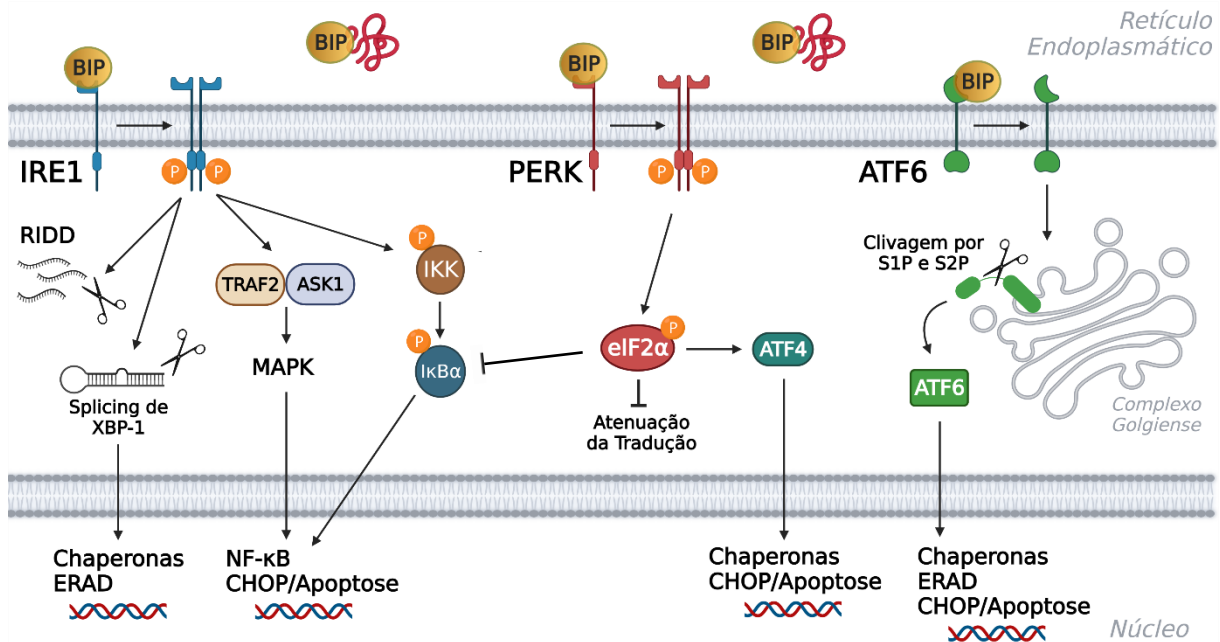


FIGURA 2.3. Os três braços da via UPR. (1) Após liberação de BIP, IRE1 sofre oligomerização e fosforilação, com ativação de seus domínios quinase e endoribonuclease. IRE1 é capaz de promover diretamente o splicing alternativo de XBP-1, resultando na expressão do fator de transcrição XBP-1s, ao passo que seu domínio endoribonuclease cliva outros transcritos, atenuando o processo transcrricional. IRE1 induz a fosforilação de MAPKs e IKK, levando à translocação de NF-κB e componentes apoptóticos. (2). Após oligomerização e fosforilação, PERK age sinergicamente com IRE1 na ativação de NF-κB. Sua ação contempla a fosforilação de eIF2α, inibindo a formação do complexo de iniciação da Tradução e levando à expressão do fator de transcrição ATF4. A atenuação do processo transcrricional leva à depleção de IκBα e liberação de NF-κB. (3). ATF6 libera BIP e é deslocado ao Complexo Golgiense, onde é clivado e, em sequência, dirigido ao núcleo. Fonte: autoria própria.

A ativação de IRE1 parte da exposição dos domínios quinase e endoribonuclease da porção citoplasmática da molécula após liberação de BiP/GRP78 no lúmen endoplasmático, catalisando a remoção de um fragmento de 26 nucleotídeos do pré-mRNA de XBP-1 (*X-box-binding-protein 1*). O mRNA processado por IRE1α traduz uma proteína de aproximadamente 41 kDa (*X-box-binding-protein 1 spliced*, XBP-1s) atuante na ativação da transcrição de componentes da ERAD e aumento da expressão de chaperonas. Em paralelo, o domínio de endoribonuclease de IRE1 pode iniciar uma segunda resposta adaptativa, denominada RIDD (*Regulated IRE1-dependent decay*), associada à degradação de

micros RNAs do lúmen retinal através da clivagem de sítios consenso semelhantes aos encontrados em XBP-1, limitando o processo de tradução (BASHIR *et al*, 2021; KOHLI *et al*, 2021). A via deflagrada por IRE1 também é capaz de atuar de maneira muito semelhante a TRAF2 (*TNF- α Receptor Associated Factor 2*), ativando quinases envolvidas em processos inflamatórios e de morte programada. Neste mecanismo, a porção citoplasmática de IRE1 associa-se a TRAF2 e a ASK1 (*Associated Signal-related Kinase 1*), formando um complexo capaz de induzir quinases da família MAPKs como p38 e JNK-1; a ação das cascatas de sinalização mediadas por MAPKs culmina na expressão e ativação de moléculas pró-apoptóticas como CHOP (TAM *et al*, 2012) e fatores de resposta inflamatória como AP-1 e NF- κ B. Sugere-se que o fator de transcrição NF- κ B pode ser diretamente ativado via IRE1 através da interação de seu domínio quinase com I κ K (*I κ B Kinase*), acarretando na fosforilação e proteólise de I κ B α (SCHRÖDER, 2008; BASHIR *et al*, 2021). A depleção de I κ B α é sinérgica à ativação da via UPR mediada por PERK, uma vez que a atenuação transcricional induzida pela fosforilação de eIF2 α reduz a concentração citoplasmática deste inibidor; contudo, a ativação de NF- κ B durante o estresse do RE requer a ação conjunta das vias mediadas por PERK e IRE1 (TAM *et al*, 2012; HETZ e PAPA, 2018; HUGHES e MALLUCCI, 2019; HETZ *et al*, 2020). De fato, PERK e IRE1 parecem ter uma ação complementar dentro da via UPR. Estima-se que regiões conservadas do domínio intraluminal de IRE1 e PERK possuem aproximadamente 22% de identidade e 45% de homologia entre si e são funcionalmente intercambiáveis. A estrutura tridimensional de IRE1 α obtida após sua cristalização mostra que esta proteína forma filamentos construídos a partir de uma unidade dimérica de maneira semelhante ao MHC (*Major Histocompatibility Complex*), sugerindo que IRE1 α e possivelmente PERK sejam capazes de efetuar uma interação direta com as proteínas desoveladas do lúmen do RE (BORSA *et al*, 2015)

O terceiro braço da via UPR é ativado por ATF6, cuja porção citoplasmática apresenta um domínio de ligação ao DNA contendo um zíper de leucina-básica e um domínio de ativação transcricional. Em consequência à dissociação de BiP/GRP78, a porção intraluminal expõe seu sinal de endereçamento vesicular e é translocada ao complexo de Golgi (SCHRÖDER, 2008). No complexo de Golgi, ATF6 sofre clivagens sequenciais por proteases designadas S1P (*Site 1 Protease*) e S2P (*Site 2 Protease*), liberando fragmentos N-terminais dirigidos ao núcleo e destinados à ativação de

genes relacionados a via UPR. Destacam-se como principais elementos de resposta ao estresse induzidos por ATF6 a expressão de componentes do mecanismo ERAD, enzimas dissulfeto isomerase, chaperonas - calreticulinas, BiP/GRP78 e GRP94 (*Glucose Regulated Protein 94*), uma chaperona pertencente à família Hsp90 e, em estágios tardios, CHOP. Uma forma alternativa de ativação de ATF6 foi relatada e seria induzida pela depleção de Ca^{2+} do lúmen do RE, levando à inibição da interação dessas chaperonas com as proteínas recém-sintetizadas que se apresentam parcialmente glicosiladas. Assim, ATF6 torna-se incapaz de atingir seus níveis normais de glicosilação e associação com moléculas de calnexina e calreticulina. Essa perda de afinidade auxilia sua liberação do retículo endoplasmático, permitindo sua migração até o complexo de Golgi e posterior clivagem (WALTER e RON, 2011; HETZ e PAPA, 2018; HETZ *et al*, 2020; KOHLI *et al*, 2021).

2.5 O HIV-1 E A VIA UPR

Em eucariotos superiores, diversos processos biológicos são regidos por interações de mecanismos celulares estruturalmente complexos, o que requer a expressão de proteínas relevantes com adequação temporal e alta fidelidade conformacional. Por conseguinte, as funções de correção e depleção de proteínas mal enoveladas exercidas pela via UPR frente ao estresse do RE despontam como um aspecto importante da biologia celular, com implicações em diferentes mecanismos homeostáticos e patológicos. Apesar dos recentes avanços relacionados ao entendimento da via UPR, questões referentes à ativação, sinalização e regulação desta via induzida por determinados estímulos estressores, em especial infecções virais, permanecem não totalmente elucidadas (ZHANG e WANG, 2012; DE GASSART *et al*, 2016; KOHLI *et al*, 2021).

A ativação viral da via UPR é desencadeada pela intensa expressão de novas partículas virais pela maquinaria de síntese do RE. Entretanto, a resposta celular mediada por determinados efetores da via UPR torna-se impediente ao processo de replicação viral. O sucesso da infecção de um vírus é, portanto, alcançado através da inibição ou potencialização de diferentes etapas das vias UPR, demonstrando a capacidade de modular estes mecanismos intrínsecos ao estresse do RE. A estratégia de modulação da via UPR está aparentemente relacionada ao vírus infectante, à

temporalidade da infecção e ao tipo celular infectado (JHENG *et al*, 2010; ASSELAH *et al.*, 2010; CROSS *et al*, 2011; ZHANG e WANG, 2012).

As primeiras evidências da relação entre o HIV e a via UPR foram relatadas em estudos sobre os efeitos biológicos de Tat (PUGLIESE *et al*, 2005). Tat é capaz de promover a fosforilação e inibição de eIF2 α através de uma proteína heteróloga à PERK, designada PKR (*RNA-dependent Protein Kinase*). A inibição dessa fosforilação permite a tradução de novas proteínas no RE, aumentando o acúmulo em seu lúmen (CROSS *et al*, 2011). Ademais, a infecção por HIV foi associada à expressão de ATF4, causando um acúmulo deste fator durante a fase aguda da infecção. ATF4 é também responsável por promover a reativação da replicação do HIV em células infectadas, sugerindo que eventos de estresse no RE indutores de ATF4 podem ser relevantes para o fim do estado de latência viral (CASELLI *et al*, 2011). O vírus também é capaz de promover um aumento dos níveis de eIF2 α fosforilado em estágios precoces da infecção e durante picos de carga viral em macrófagos cultivados *in vitro* (CROSS *et al*, 2011). Relata-se ainda que a infecção pelo HIV aumenta os níveis de expressão de BiP/GRP78 e resulta na ativação dos três braços da via UPR - PERK, IRE1 e ATF6 - em linfócitos T CD4⁺ e monócitos provenientes de pacientes submetidos ou não ao tratamento antirretroviral. Aparentemente, os sensores PERK e IRE1 nestas células sofrem ativação sinérgica mediante a ação viral e a presença de antiretrovirais, enquanto a indução do braço mediado por ATF6 não é influenciada pelo tratamento farmacológico (BORSA *et al*, 2015). Outro estudo demonstrou a indução de apoptose mediada por gp120 em astrócitos *in vitro* através do eixo IRE1/JNK-1/AP-1, indicando a relevância das respostas de estresse do RE na neurodegeneração provocada pelo HIV (SHAH *et al*, 2016). Recentemente, a relação entre a resposta inflamatória de células gliais induzida pelo HIV e a ativação de cascatas de sinalização dependentes de PERK-eIF2 foi demonstrada em um modelo multicelular *in vitro* baseado na diferenciação de células-tronco pluripotentes humanas, recapitulando achados clínicos e evidenciando o papel central das vias UPR na instauração do processo inflamatório durante a infecção do tecido nervoso (RYAN *et al*, 2020). Contudo, não obstante ao extenso corpo de relatos acerca da relação viral com as respostas celulares de estresse e homeostase presentes em literatura, o exato mecanismo pelo qual o HIV-1 modula as respostas desencadeadas pela via UPR permanece parcialmente compreendido.

2.6 HIPÓTESE

Considerando o papel central da atividade microglial na neurodegeneração induzida pelo HIV-1 e o caráter regulatório da via UPR nas respostas de estresse celular, a hipótese do presente trabalho estabelece que a via UPR é modulada durante a ativação de células microgliciais mediada pela ação da proteína viral Tat.

2.7. OBJETIVOS

2.7.1 Objetivo principal

Investigar os mecanismos celulares envolvidos na potencial modulação da via UPR em células microgliciais induzida pela ação da proteína Tat do HIV-1 *in vitro*.

2.7.2 Objetivos específicos

- a. Estabelecer um sistema experimental *in vitro* a partir da expressão heteróloga de Tat biologicamente ativa e um modelo celular;
- b. Analisar o perfil de ativação de células microgliciais sob estímulo *in vitro* de Tat;
- c. Analisar a expressão tempo-dependente de genes e moléculas envolvidos com a via UPR em células microgliciais sob estímulo *in vitro* de Tat;
- d. Avaliar a potencial relação entre a ativação e expressão de componentes da via UPR e os perfis de ativação observados em células microgliciais sob estímulo *in vitro* de Tat.

2.8 REFERÊNCIAS

ABULWERDI, Fardokht A.; LE GRICE, Stuart F.J. Recent Advances in Targeting the HIV-1 Tat/TAR Complex. *Current Pharmaceutical Design*, v. 23, n. 28, 2 nov. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2174/1381612823666170616081736>>.

AJASIN, David; EUGENIN, Eliseo. HIV-1 Tat: Role in Bystander Toxicity. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, n. 61, 25 fevereiro 2020. Disponível em: <<http://doi:10.3389/fcimb.2020.00061>>.

BAGASHEV, Asen; SAWAYA, Bassel E. Roles and Functions of HIV-1 Tat Protein in the CNS: An Overview. *Virology Journal*, v. 10, n. 1, dez. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-10-358>>.

BANDERA, A.; TARAMASSO, L.; BOZZI, G.; MUSCATELLO, A.; ROBINSON, J. A.; BURDO, T. H.; GORI, A. HIV-Associated Neurocognitive Impairment in the Modern ART Era: Are We Close to Discovering Reliable Biomarkers in the Setting of Virological Suppression? *Frontiers in Aging Neuroscience*, [s. l.], v. 11, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fnagi.2019.00187>>.

BASHIR, Samirul; BANDAY, Mariam; QUADRI, Ozaira; BASHIR, Arif, *et al.* The molecular mechanism and functional diversity of UPR signaling sensor IRE1. *Life Sciences*, v. 265, p. 118740, 15 janeiro 2021. Disponível em : <<http://doi:10.1016/j.lfs.2020.118740>>.

BELLINO, Stefania et al. The Presence of Anti-Tat Antibodies in HIV-Infected Individuals Is Associated with Containment of CD4+ T-Cell Decay and Viral Load, and with Delay of Disease Progression: Results of a 3-Year Cohort Study. *Retrovirology*, v. 11, n. 1, p. 49, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-11-49>>.

BORRAJO, Ana; PENEDO, Maria Aranzázu; OLIVARES, Jose Manuel; AGÍS-BALBOA, Roberto Carlos. Important role of microglia in HIV-1 associated neurocognitive disorders and the molecular pathways implicated in its pathogenesis, *Annals of Medicine*, v. 53, n. 1, p. 43 69, 17 setembro 2020. Disponível em: <<http://doi:10.1080/07853890.2020.1814962>>.

BORRAJO LÓPEZ. Ana; PENEDO, Maria Aranzázu; RIVERAS-BALTANAS, Tania; PÉREZ-RODRIGUES, Daniel, et al. Microglia: The Real Foe in HIV-1-Associated Neurocognitive Disorders? *Biomedicines* v. 9, n. 925, 31 julho 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/biomedicines9080925>>.

BORSA, Mariana.; FERREIRA, Pedro.; PETRY, Andrea.; FERREIRA, Luiz.; CAMARGO, Maristela. M.; BOU-HABIB, Dumith.; PINTO, Aguinaldo. HIV infection and antiretroviral therapy lead to unfolded protein response activation. *Virology Journal*, v. 12, p. 1-11, 2015. Disponível em: < <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0298-0>>.

CASTELLANO, Paul; PREVEDEL, Lisa; EUGENIN, Eliseo A. HIV-Infected Macrophages and Microglia That Survive Acute Infection Become Viral Reservoirs by a Mechanism Involving Bim. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, 9 out. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-12758-w>>.

CHIVERO, E. T.; GUO, M.-L.; PERIYASAMY, P.; LIAO, K.; CALLEN, S. E.; BUCH, S. HIV-1 Tat Primes and Activates Microglial NLRP3 Inflammasome-Mediated Neuroinflammation. *The Journal of Neuroscience*, [s. l.], v. 37, n. 13, p. 3599–3609, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3045-16.2017>>.

CHEN, Natalie C. et al. Fate of Microglia during HIV-1 Infection: From Activation to Senescence? *Glia*, v. 65, n. 3, p. 431–446, 26 nov. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/glia.23081>>.

CASELLI, Elisabetta et al. Activating transcription factor 4 (ATF4) promotes HIV-1 activation. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v. 28, n.8, p. 907-912, 20 jul 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/aid.2011.0252>>.

CROSS, S. et al. Induction of the unfolded protein response attenuates HIV replication in macrophages. In: *Anais da 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, CROI, San Francisco, CA, 2011*.

DEBAISIEUX, Soléne et al. The Ins and Outs of HIV-1 Tat. *Traffic*, v. 13, n. 3, p. 355–363, 11 outubro 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01286.x>>.

DE GASSART, Aude et al. An inhibitor of HIV-1 protease modulates constitutive eIF2 α dephosphorylation to trigger a specific integrated stress response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 113, n. 2, p. 117-126, 12 jan. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1514076113>>.

GALARRETA, Mariana R. et al. Unfolded protein response induced by Brefeldin A increases collagen type I levels in hepatic stellate cells through an IRE1 α , p38 MAPK and Smad-dependent pathway. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*, v. 1863, n. 8, p. 2115-2123, 3 maio 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.05.002>>.

GRAZIANO, Francesca; VICENZI, Elisa; POLI, Guido. Plastic Restriction of HIV-1 Replication in Human Macrophages Derived from M1/M2 Polarized Monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 100, n. 5, p. 1147–1153, 30 jun. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1189/jlb.4AB0316-158R>>.

HERBEIN, Georges et al. Macrophage Signaling in HIV-1 Infection. *Retrovirology*, v. 7, n. 1, 9 abr. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-7-34>>.

HERBEIN, Georges; VARIN, Audrey. The Macrophage in HIV-1 Infection: From Activation to Deactivation? *Retrovirology*, v. 7, n. 1, 9 abr. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-7-33>>.

HETZ, Cláudio.; ZHANG, Kezhong.; KAUFMAN, Randal. J. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 21, n. 8, p. 421–438, 21 agosto 2020. Disponível em : <<http://doi:10.1038/s41580-020-0250-z>>.

HETZ, Cláudio; PAPA, Feroz R. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Molecular Cell*, v. 69, n. 2, p. 169-181, 18 jan 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.017>>.

HONG, Suzi; BANKS, William A. Role of the Immune System in HIV-Associated Neuroinflammation and Neurocognitive Implications. *Brain, Behavior, and Immunity*,

v. 45, p. 1–12, mar. 2015. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2014.10.008>>.

HUGHES, Daniel; MALLUCCI, Giovanna R. The unfolded protein response in neurodegenerative disorders – therapeutic modulation of the PERK pathway. *The FEBS Journal*, v. 286, n. 2, p. 342-355, 24 fev. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/febs.14422>>.

IROLLO, Elena; LUCHETTA, Jared; HO, Chunta, et al. Mechanisms of neuronal dysfunction in HIV-associated neurocognitive disorders. *Cellular and Molecular. Life Science*, v. 78, p. 4283–4303, 14 jan 2021. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1007/s00018-021-03785-y>>.

JHENG, Jia-Rong et al Endoplasmic Reticulum stress is induced and modulated by enterovirus 71. *Cell Microbiology*, v. 12, n. 6, p. 796-813, 5 jun. 2010. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01434.x>>.

JIANG, Xintong, et al. Effects of GSK2606414 on cell proliferation and endoplasmic reticulum stress-associated gene expression in retinal pigment epithelial cells. *Molecular Medicine Reports*, v. 15, n. 5, p. 3105-3110, 30 março 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6418>>.

KATURI, A.; BRYANT, J.; HEREDIA, A.; MAKAR, T. K. Role of the inflammasomes in HIV-associated neuroinflammation and neurocognitive disorders. *Experimental and Molecular Pathology*, [s. l.], v. 108, p. 64–72, 2019. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2019.03.008>

KOHLI, Evelyne; CAUSSE, Sébastien; BAVEREL, Valentin; DUBREZ, Laurence, *et al.* Endoplasmic Reticulum Chaperones in Viral Infection: Therapeutic Perspectives. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 85, n. 4, p. e0003521, 15 dez. 2021. Disponível em: <<http://doi:10.1128/MMBR.00035-21>>.

ORIHUELA, Ruben; MCPHERSON, Christopher A; HARRY, Gaylia Jean. Microglial M1/M2 Polarization and Metabolic States. *British Journal of Pharmacology*, v. 173, n. 4, p. 649–665, 11 maio 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/bph.13139>>.

PUGLIESE, A. et al. A Review of HIV-1 Tat Protein Biological Effects. *Cell Biochemistry and Function*, v. 23, n. 4, p. 223–227, 2005. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1002/cbf.1147>>.

QUY, Vo Cam; PANTANO, Sergio; ROSSETTI, Giulia; GIACCA; CARLONI, Mauro HIV-1 Tat Binding to PCAF Bromodomain: Structural Determinants from Computational Methods. *Biology*, v.1, n. 2, p. 277-296, 13 agosto 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/biology1020277>>.

RAO, Vasudev R; RUIZ, Arthur P; PRASAD, Vinayaka R. Viral and Cellular Factors Underlying Neuropathogenesis in HIV Associated Neurocognitive Disorders (HAND). *AIDS Research and Therapy*, v. 11, n. 1, p. 13, 2014. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1186/1742-6405-11-13>>.

RYAN, Sean K; GONZALEZ, Michael V; GARIFALLOU, James P. Garifallou; BENNETT, Frederick C., *et al.* Neuroinflammation and EIF2 Signaling Persist despite Antiretroviral Treatment in an hiPSC Tri-culture Model of HIV Infection. *Stem Cell Reports*, v. 14, n. 5, p. 991-1010, 12 maio 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.02.010>>.

SCHRÖDER, M. Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell Molecular Life Science*, v. 65, n. 6, p. 862-894, 26 nov. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00018-007-7383-5>>.

SHAH, Akit *et al.* HIV-1 gp120 induces type-1 programmed cell death through ER stress employing IRE1 α , JNK and AP-1 pathway. *Scientific Reports*, v. 6, n. 7, 7 jan 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/srep18929>>.

SIVALINGAM, Kalaiselvi; CIRINO, Thomas; McLAUGHLIN, Jay, *et al.* HIV-Tat and Cocaine Impact Brain Energy Metabolism: Redox Modification and Mitochondrial Biogenesis Influence NRF Transcription-Mediated Neurodegeneration. *Molecular Neurobiology*, v. 58, p. 490–504, 25 setembro 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12035-020-02131-w>>.

SU, P. *et al.* The Role of Autophagy in Modulation of Neuroinflammation in Microglia. *Neuroscience*, v. 319, p. 155–167, abr. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.01.035>>.

TAM, Arvin B. *et al.* ER stress activated NF- κ B by integration functions of basal IKK activity, IRE1 and PERK. *Plos One*, v. 7, n. 10, 26 out. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045078>>.

TANG, Yu; LE, Weidong. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*, v. 53, n. 2, p. 1181–1194, 20 jan. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5>>.

THANGARAJ, Annadurai; PERYASAMY, Palsamy; LIAO, Ke; BENDI, Venkata; *et al.* HIV-1 TAT-mediated microglial activation: role of mitochondrial dysfunction and defective mitophagy. *Autophagy*, v. 14, n. 9, p. 1596-1619, 26 julho 2018. Disponível em: <<http://doi:10.1080/15548627.2018.1476810>>.

THANGARAJ, Annadurai; CHIVERO, Ernest, TRIPATHI, Ashutosh, SINGH, *et al.* HIV TAT-mediated microglial senescence: Role of SIRT3-dependent mitochondrial oxidative stress. *Redox Biology*, v. 40, p.101843, 23 dezembro 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101843>>.

WANG, Yi-wei, *et al.* Mild endoplasmic reticulum stress ameliorates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and cognitive impairment via regulation of microglial polarization. *Journal of Neuroinflammation*, v. 14, n. 1, 28 nov. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12974-017-1002-7>>.

ZHANG, Lingrui; WANG, Aiming. Virus-induced ER stress and the unfolded protein response. *Frontiers in Plant Science*. v. 3, n. 293, 28 dez. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2012.00293>>.

3. CAPÍTULO 2

ABORDAGEM EXPERIMENTAL *In Vitro*

3.1 INTRODUÇÃO

As desordens cognitivas associadas ao HIV-1 acometem mais da metade dos indivíduos infectados sob cART (*Combination Antiretroviral Therapy*). Compreender os mecanismos moleculares e a complexidade dos arranjos entre os diferentes tipos celulares que participam do processo neurodegenerativo instaurado é central ao objetivo de elucidar sua totalidade, bem como no desenvolvimento de terapêuticas e manejo clínico efetivos. De forma semelhante a outros distúrbios de ordem neurológica, os desafios ao estudo da infecção pelo HIV-1 no SNC incluem acesso limitado às amostras clínicas e dificuldades em reproduzir seu cenário neuropatogênico em modelos experimentais (HATZIOANNOU e EVANS, 2012). Congruente à essa prerrogativa, a extrapolação de achados em de modelos *in vivo* apresenta falhas e pode não ser capaz de recapitular com fidelidade todas as nuances fisiológicas de uma infecção viral em humanos, frequentemente levando à conclusões errôneas ou pouco confiáveis, além de acarretar em um série de implicações éticas (FAGUNDES e TAHA, 2004; HATZIOANNOU e EVANS, 2012; RAI *et al*, 2020). Em contraponto, sistemas experimentais *in vitro*, nos quais populações celulares definidas são estudadas sob condições controladas e, conseqüentemente, reproduzíveis, propiciam a simplificação de um fenômeno biológico ao ponto de interações celulares e moleculares poderem ser analisadas individualmente e, embora também apresentem limitações, constituem alternativas ética e cientificamente factíveis na investigação das interações HIV-célula (RAI *et al*, 2020; FAIA *et al*, 2020).

Sistemas *in vitro* baseados no estabelecimento de culturas primárias e/ou linhagens celulares de neurônios, astrócitos, microglia e/ou co-culturas de células neuronais e glia vêm sendo amplamente utilizadas no estudo de vários aspectos da modulação que o HIV-1 exerce sobre o tecido neuronal (FAIA *et al*, 2020). Em vias gerais, estes trabalhos têm contribuído sobremaneira para a caracterização de eventos moleculares envolvidos na neurotoxicidade de fatores virais circulantes como gp120, Nef e Tat, dentre os quais a desregulação do influxo de cálcio (MEEKER *et al*; 2016; ZOU *et al*, 2015), estresse oxidativo (KIM *et al*, 2015; FITTING *et al*, 2014) e morte apoptótica (DONG *et al*, 2019). Da mesma forma, o componente

neuroinflamarório do HIV-1, assim como a dinâmica da deflagração de vias moleculares associadas às respostas de inflamação de células imunes residentes do SNC durante o curso da infecção pelo HIV-1 apresentam-se extensivamente explorados em diferentes modelos celulares. Como exemplo, Zheng e colaboradores (2008) empregaram co-culturas de astrócitos e macrófagos humanos para demonstrar a regulação da expressão astrocítica de CXCL8 (*Chemokine C-X-C motif ligand 8*) e SCF-1 (*Stromal Cell-derived Factor 1*) pela ação de citocinas pró-inflamatórias liberadas por macrófagos infectados, contribuindo para a neuropatogênese do HIV-1. Ojeda e colaboradores (2018) utilizaram culturas primárias de astrócitos humanos para demonstrar que a degradação mitocondrial é um mecanismo de proteção contra apoptose quando em infecção produtiva, enquanto desencadeia a formação de inflamossoma e apoptose em células infectadas com HIV-1 não replicante. Recentemente, Hsiao e colaboradores (2021) evidenciaram o processo de encurtamento telomérico, senescência celular e estresse metabólico mediados por Tat e/ou cART em células microgliais humanas imortalizadas via expressão de antígeno T SV40 (*Simian Virus 40*), sugerindo estes mecanismos como acessórios à contínua resposta inflamatória da micróglia nas HAND. Ainda, como alternativa à culturas primárias ou à abordagens experimentais *ex vivo*, a utilização da linhagem celular BV-2 – derivada de células microgliais murinas transfectadas com os oncogenes *ras/myc* (HENN, 2009) – assume lugar central em diversos estudos acerca do potencial neuroinflamatório do HIV-1, revelando uma gama de mecanismos pelos quais Tat e outros fatores virais podem desencadear a ativação exacerbada de células microgliais, incluindo a montagem de inflamossomas NLRP3 (*NLR family pyrin domain containing 3*), supressão de receptores de fractalina (CX3CR1) e ativação de vias de ativação inflamatória como MAPKs e translocação de NF-κB, além do aumento da expressão de receptores e sinalizadores inflamatórios e co-receptores utilizados para a entrada viral (BOKHARI *et al*, 2009; DUAN *et al*, 2014; CHIVERO *et al*, 2017; THANGARAJ *et al*, 2021). Dados sua alta fidelidade em relação aos mecanismos de ativação microglial e resposta inflamatória observados *in vivo*, estabilidade, robustez e reprodutibilidade *in vitro*, o emprego da linhagem celular BV-2 destaca-se como importante ferramenta no estudo da atividade neuroinflamatória induzida pelo HIV-1.

Em paralelo à vasta literatura reportando o uso de modelos celulares na investigação de aspectos distintos da sinalização deflagrada pelo HIV-1, diferentes

estratégias de produção e purificação têm sido descritas para a obtenção de Tat biologicamente ativa. Uma das abordagens mais comumente empregada parte da utilização de sistemas de expressão heterólogos seguida da purificação da proteína recombinante obtida em colunas de cromatografia de fase reversa (ARMENGAUD *et al*, 1991; HAKANSSON *et al*, 2008). Contudo, tal protocolo pode apresentar limitações quanto ao rendimento de Tat alcançado, uma vez que seus resíduos hidrofóbicos podem permanecer fortemente aderidos à fase estacionária, enquanto a atividade biológica do montante protéico eluído pode ser comprometida em resultado à exposição a solventes orgânicos (SIDDAPPA *et al*, 2006). Em vista deste artefato, o presente trabalho buscou padronizar uma estratégia de produção de Tat recombinante simples e factível com a infraestrutura disponível, de forma a garantir sua atividade biológica e pureza em relação à potenciais contaminantes. Dessa forma, o delineamento da abordagem experimental *in vitro* apresentada neste capítulo fundamentou-se na adoção da linhagem BV-2 como modelo celular, capaz de emular o processo neuroinflamatório mediado pela ativação microglial decorrente do estímulo de Tat; na adição de Tat recombinante diretamente em cultura; e na definição de condições experimentais e padrões comparativos que propiciem a avaliação do modelo empregado quanto à ativação ou supressão de suas funções imunes e respostas de estresse celular, conforme discutido detalhadamente a seguir.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Transformação

A transformação de bactérias quimiocompetentes *E. coli* BL21(DE3) foi realizada através da adição de 100 ng do vetor de expressão pET-15b contendo a construção gênica codante para a proteína Tat (grupo M, subtipo B, cepa BH10 86 aa.) e 6 aminoácidos histidina na porção N-terminal (pet-15b-6xHis-HIV-Tat, 5952 pb) (Genone) em microtubos contendo 400-600µl de cultura bacteriana. Em seguida, os microtubos foram incubados em gelo por 20 minutos. Imediatamente após, os microtubos foram aquecidos em termobloco a 42° C por 2 minutos e incubados novamente em gelo por 1,5 minutos, seguidos da adição de 500 µl de meio Luria-Bertani (LB, Sigma-Aldrich) e incubação a 37° C sob agitação a 150 rpm durante 1

hora. Por fim, inoculou-se todos os volumes dos microtubos em placas de Petri previamente preparada com 25ml de meio LB-Ágar (Sigma-Aldrich) contendo antibiótico ampicilina 100 mg/mL. Em seguida, incubou-se as placas em estufa a 37° C durante a noite e na manhã seguinte as placas foram armazenadas a 4° C.

3.2.2 Expressão da proteína Tat recombinante

Para a expressão da proteína recombinante, colônias individuais foram selecionadas das placas e crescidas em 250 mL de meio LB (Miller) suplementado com 100mg/mL de ampicilina durante a noite. No dia seguinte, a indução da expressão foi realizada com adição de 1mM de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) às culturas com densidade ótica de 0,6-0,8 em 600nm de absorbância. Em seguida, foram incubadas por 4 horas a 37°C sob agitação de 150 rpm. Então as culturas foram centrifugadas a 4000 rpm por 40 minutos a 4°C. O sobrenadante da centrifugação foi descartado e o precipitado ressuspendido em *Buffer A* (50mM NaH₂PO₄·H₂O, 50mM NaCl, 20mM Imidazol, pH 7,4) acrescido de 10 μ g/mL de PMSF (fluoreto de fenilmetano sulfonil). Em seguida, as células foram lisadas por sonicação em 10 ciclos de 30 segundos (QSonica). O lisado foi centrifugado a 13000 rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante (fração solúvel) e o precipitado (fração insolúvel) foram filtrados em filtros 0,22 μ m (Milipore) e coletados para posterior purificação. A expressão foi avaliada através da coleta de amostras seguida da adição de tampão desnaturante fervura a 95°C durante 5 minutos para posterior resolução em gel de poliacrilamida 12%.

3.2.3 Purificação da proteína Tat recombinante

A purificação foi realizada utilizando uma coluna de Ni-NTA e uma SP-Sepharose em *tandem*. Primeiramente, uma coluna Ni-NTA (HisTrap HP™ 1mL, GE Healthcare LifeSciences) foi lavada com 10 mL de água ultradestilada e equilibrada com 5 mL de *Buffer A*. Em seguida, realizou-se a aplicação da amostra com auxílio de uma seringa, com velocidade aproximada de 1ml/minuto. A coluna foi lavada sequencialmente com (I) 20mL de *Buffer A* acrescido de 2% de Triton X-100, (II) 10mL de *Buffer A*, (III) 5 mL de *Buffer C* (50mM NaH₂PO₄·H₂O, 500mM NaCl, pH 7,4) e (IV) 5 mL de solução *Buffer*

A/D 1:2 (*Buffer D*: 50mM NaH₂PO₄·H₂O, 50mM NaCl, pH 7,4). Por fim, a eluição de Tat foi realizada com 5mL de solução *Buffer A/B* 1:2 (*Buffer B*: 50mM NaH₂PO₄·H₂O, 50mM NaCl, 1M Imidazol, pH 6,8).

Prosseguiu-se com a purificação em coluna SP Sepharose (HiTrap™ SP FF 1mL, GE Healthcare LifeSciences), sem maiores intervalos. Inicialmente, a coluna foi lavada com 10 mL de água ultradestilada e equilibrada com 5mL de *Buffer E* (50 mM NaH₂PO₄·H₂O, pH 6,8). Em seguida, o eluído da coluna Ni-NTA foi aplicado com auxílio de seringa, a uma velocidade aproximada de 1 mL/minuto. Por fim, a SP Sepharose coluna foi lavada com (I) 10 mL de de *Buffer E* acrescido de Triton X-100 2% e (II) 5 mL de solução *Buffer E/F* 1:2 e a proteína eluída com 5 mL de *Buffer F* (50mM NaH₂PO₄·H₂O, 500mM NaCl, pH 6,8).

O eluído final foi ultrafiltrado em tubos Amicon™ (Milipore, ponto de corte 3 kD), diluído em *Buffer D*, aliqotado em microtubos e finalmente armazenados a -80°C. Com a finalidade de analisar o eluído da purificação da proteína Tat recombinante, amostras foram adicionadas a tampão desnaturante e submetidas à fervura em 95°C durante 5 minutos para posterior resolução em gel de poliacrilamida. A quantificação foi realizada por ensaio de Bradford (Bio-Rad), lido em espectrofotômetro a 595 nm (KRUGER, 2002).

3.2.4 Eletroforese e Dot-blot

A fim de verificar a expressão da proteína Tat recombinante, amostras das frações solúvel e insolúvel dos cultivos de bactérias BL21(DE3) transformadas após indução de expressão foram lisadas em tampão de lise (1% SDS, 2mM EDTA, 50mM Tris) e aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-Page, 12%) para separação eletroforética em cuba vertical (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad) em tampão TBE [89 mM Tris base, 89 mM H₃BO₃, 2 mM EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético)] a 20 mA. As bandas proteicas foram coradas em solução 0,1% de Comassie Blue G-250 (25% CH₃OH, 5% de CH₃COOH) por 12 horas. Paralelamente, alíquotas dos lisados foram aplicadas em membrana de nitrocelulose (Bio-Rad), seguido de incubação em solução de bloqueio [20 mM Tris base, 150 mM NaCl (TBS 1x), 0,05% Tween20, 5% leite desnatado) durante 1 hora sob agitação a temperatura ambiente. Logo após, a membrana foi lavada (TBS 1x, 0,05% Tween 20) e incubada com

anticorpo primário anti-6xHis (1:5000, Sigma) em solução (TBS 1x, 0,05% Tween20, 5% BSA, 15 mM Azida de sódio) por 12 horas. O protocolo seguiu com a incubação do anticorpo secundário anti-Ig de camundongo conjugado à peroxidase (1:20000, Sigma) em solução TBS 1x, 0,05% Tween 20, 5% leite desnatado durante 1 hora. As membranas foram reveladas utilizando o reagente ECL (Thermo-Scientific) com auxílio do Fotodocumentador ChemiDoc MP (Bio-Rad), conforme instruções do fabricante.

3.2.5 Espectrometria de Massas

A análise de pureza e caracterização bioquímica de Tat recombinante foram realizadas através de análises de dessorção/ionização a laser assistida por matriz seguida de espectrometria de massas por tempo de voo (MALDI-TOF) e em *tandem* (MALDI-MS/MS). Para tanto, amostras obtidas do processo de purificação foram analisadas em gel SDS-PAGE conforme descrito e bandas correspondentes à Tat recombinante cuidadosamente excisadas e descoradas em solução contendo 50% (v/v) de acetonitrila (em 25 mM NH_4HCO_3 , pH 8,5) durante aproximadamente 12 h a 25°C, seguido de extração extraídos em lavagens sequenciais com solução de 0,1% (v/v) ácido trifluoroacético e 50% (v/v) acetonitrila (em 25 mM NH_4HCO_3 , pH 8,5). Para as análises em MALDI-MS/MS, fragmentos de gel foram submetidos ao processo de redução através da adição de solução de ditioneitol (DTT) 5 mM (em 25 mM NH_4HCO_3 , pH 8,5) durante 30 minutos a 60°C e posterior alquilação com a adição de iodoacetamida (IAA) 14 mM (em 25 mM NH_4HCO_3 , pH 8,5) durante 30 minutos ao abrigo da luz, garantindo assim a máxima exposição dos sítios de clivagem da proteína. Logo após, os fragmentos de gel foram ressuspensos em solução de acetonitrila e drenados em câmara de vácuo. Aos fragmentos de gel cristalizados foram adicionados 10 μL de tripsina [20 ng/ μL , *Trypsin Gold, Mass Spectrometry grade*, Promega) em solução contendo 0,04 M NH_4HCO_3 , pH 8,5, 9% (v/v) acetonitrila] e incubados durante noite a 37°C ao abrigo da luz. Os peptídeos resultantes foram extraídos em lavagens sequenciais em solução 0,1% (v/v) ácido trifluoroacético e 50% (v/v) acetonitrila.

As amostras foram diluídas na razão de 1:1 à matrix [ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico 10mg/mL em acetonitrila 50% (v/v) com 0.1% (v/v) de ácido

trifluoroacético] e aplicadas à placa de MALDI (*MTP 384 target plate*, Bruker Daltonics). Após as amostras secarem completamente em temperatura ambiente, a placa foi inserida no equipamento MALDI-TOF *Autoflex III* (Bruker Daltonics) e análises de espectrometria de massas realizada de modo automatizado utilizando o programa *FlexControl 3.3*, conforme o protocolo reportado por Rossi e colaboradores (2017). Os espectros de fragmentação foram analisados através do *software FlexAnalysis 3.0* (Bruker Daltonics) e a identificação da proteína realizada pelo método *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) com a utilização da ferramenta MASCOT 2.4.00 (Matrix Science, Boston, MA) utilizando a base de dados obtida do *website UniProt Knowledgebase* [entrada *UniProtKB* - P69697 (TAT_HV1B1)]. Os parâmetros utilizados para a identificação da proteína foram a oxidação da metionina a carbamidometilação da cisteína como modificações variável e fixa, respectivamente; peptídeos trípticos com ausência de um único fragmento; tolerância de erro entre 100–200 ppm; carga do peptídeo 1 H⁺. A validação da identificação de Tat recombinante utilizou o *score* global do *software* MASCOT correspondente à significância estatística de $p < 0,05$.

3.2.6 Cultura celular e estimulação

Os procedimentos experimentais realizados neste estudo utilizaram a linhagem celular BV-2 (Banco de Células do Rio de Janeiro, Cat. #0356), cultivadas conforme instruções do fornecedor. As células foram mantidas em garrafas de 25 cm³ em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma-Aldrich) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab) e 1% de solução 100U/mL penicilina/estreptomicina - 0.125µg/mL anfotericina B (PSA, Sigma-Aldrich), com aclimação a 37° C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Para a realização dos ensaios, células foram semeadas em placas de cultura de 12 poços em densidade inicial de 0,5x10⁶ células/poço e cultivadas durante a noite para aderência celular nas condições de meio e aclimação anteriormente descritas.

A realização dos ensaios seguiu com a adição de Tat recombinante em cultura e posterior coleta de amostras celulares para a análise de marcadores de ativação microglial e via UPR em diferentes intervalos após estimulação. A concentração de Tat utilizada nos ensaios foi previamente estabelecida através de curvas de

concentração e análise de respostas de ativação após 48 h. Os controles experimentais de estimulação microglial foram realizados com a adição em cultura de lipopolissacarídeo (*E. Coli* O55:B5, Sigma-Aldrich, 1µg/mL) ou Tat recombinante inativada por aquecimento (90°C durante 1 hora).

3.2.7 Dosagem de NO

A dosagem de NO seguiu o método de Griess conforme protocolo adaptado por Scheschowitsch e colaboradores (2013). Para tanto, 100 µL de sobrenadantes de cada condição experimental foram transferidos para placas de 96 cavidades com adição de 100 µL do reagente de Griess, [naftiletilenodiamino 0,1% (p/v) em ácido orto-fosfórico 5% (v/v) e sulfonamina p-aminobenzeno 1% (p/v) em ácido fosfórico 5% (v/v, Sigma-Aldrich), na proporção 1:1, misturados imediatamente antes do uso]. As placas foram incubadas à temperatura ambiente ao abrigo da luz por aproximadamente 10 minutos seguido da leitura da absorbância em 540 nm (Multileitora *SpectraMax Paradigm*). As concentrações de NO foram estimadas por regressão linear utilizando-se uma curva padrão de NaNO₂ (Sigma-Aldrich) solubilizado em meio DMEM.

3.2.8 Análise de viabilidade celular

Os níveis de apoptose de células BV-2 em diferentes condições experimentais foram avaliados através do FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD (Biolegend, Cat. # 640922) conforme instruções do fabricante. Em resumo, células foram submetidas à digestão por Tripsina 0,05% (Cultilab) durante 3 minutos a 37° C, seguindo-se a inativação enzimática com a adição de SFB (3:1). O volume dos poços foi distribuído em tubos de citometria 12x75 mm e centrifugado a 350 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso em Annexin V Binding Buffer [10 mM Hepes (pH 7,4), 140 mM NaCl, 25 mM CaCl₂] em concentração celular aproximada de 2,5 x10⁶ células/mL. O procedimento foi repetido e o precipitado resultante suspenso em 100 µL de Annexin V Binding Buffer. Logo após, as amostras foram incubadas com 5 µL das soluções FITC (isotiocianato de fluoresceína) Annexin V e 7-AAD (7-Aminoactinomicina D) por 15 minutos à temperatura ambiente

na ausência de luz. Ao final, 400 μ L de Annexin V Binding Buffer foram adicionados a cada tubo e células adquiridas em Citômetro de Fluxo (BD FACSCanto II) após calibração e compensação fluorocromática do aparelho. As análises foram realizadas através do programa FlowJo-VX, sendo consideradas em processo de apoptose as populações celulares presentes nos quadrantes inferior direito e superior direito em relação ao gate determinado.

3.2.9 Cytometric Bead Array – CBA

Os níveis de secreção de moléculas de resposta de ativação pós-estimulação foram analisados através da metodologia de dosagem CBA por meio do *CBA Mouse Inflammation kit* (BD Pharmingen, Cat. #552364), conforme instruções do fabricante. De forma resumida, sobrenadantes foram incubados previamente com microesferas revestidas com anticorpos específicos contra TNF- α , IL-6 e MCP-1 eguido da adição de anticorpos de detecção conjugados ao fluorocromo ficoeritrina (PE) e aquisição em citômetro de fluxo (FACSCanto II®, BD Pharmigen) após calibração e compensação fluorocromática do aparelho. Análises de intensidade de fluorescência, quantificação e demais parâmetros foram realizadas através do *FCAP Array™ Software v3.0* (BD Pharmigen).

3.2.10 Análise da expressão de marcadores das vias UPR por RT-qPCR

Após estimulação com Tat, células foram submetidas à digestão por Tripsina e o volume dos poços distribuído em microtubos estéreis livres de nucleases e centrifugados a 350 x g por 5 minutos. O precipitado celular resultante foi utilizado para extração do RNA total por meio do *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) conforme instruções do fabricante. Em resumo, a cada microtubo foi adicionado 600 μ L do *Buffer RLT* fornecido pelo kit acrescido de 1% de β -mercaptoetanol, sendo o precipitado homogeneizado através de aspiração por seringa e agulha *gauge 20* (0.9 mm). Aos lisados celulares foi adicionado 1 volume de etanol 70% (Invitrogen, Applied Biosystems) e, após homogeneização por micropipeta, o volume dos microtubos foi transferido para colunas de purificação e centrifugados a 8.000 x g por 15 segundos à temperatura ambiente. O volume coletado foi desprezado e à cada coluna foi

adicionado 700 µl do *Buffer RW1*, com sequente centrifugação a 8.000 x g por 15 segundos. Em seguida, cada coluna foi submetida a nova etapa de lavagem com o *Buffer RPE*, acrescido de etanol 96% (Invitrogen, Applied Biosystems), com centrifugação a 8.000 x g por 15 segundos. Ao fim das etapas de lavagem a coluna foi centrifugada novamente a 8.000 x g por 2 minutos a fim de evitar eventuais contaminações. A eluição do RNA total foi realizada através da adição de 50 µl de água livre de nucleases à coluna seguida da centrifugação a 8.000 x g por 2 minutos à temperatura ambiente.

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

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

Por fim, as análises de expressão transcricional foram realizadas utilizando a técnica de qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*). As reações foram realizadas com a adição de 7,5 µL de *FastSYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 1 µl de cDNA (1:2), 0,3 µM de cada iniciador e água livre de nucleases em volume final de 15 µl por poço em placas de 96 cavidades, com auxílio do termociclador *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 95° C por 10 segundos seguido de 40 ciclos de desnaturação

em 95° C por 15 segundos e hibridização/extensão a 60° C por 1 minuto. A especificidade das reações foi confirmada pela análise de curvas de dissociação (60-95° C, 0,3° C/s), realizada após as etapas de amplificação (Figura 1, Apêndice C). Análises de eficiência dos iniciadores utilizados foram realizadas por meio da construção de curva de diluição seriada a partir de uma mistura de amostras de cDNA e calculada utilizando o valor de inclinação da reta (Tabela 1, Apêndice C). As sequências dos iniciadores utilizados foram obtidas da literatura ou desenvolvidas para este estudo através da ferramenta *Primer-BLAST* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e sintetizados pela empresa *Integrated DNA Technologies* (IDT Inc., USA), conforme ilustrado na Tabela X. Os resultados obtidos foram analisados por meio do programa *StepOnePlus™ Software v.2.3* e normalizados em relação aos genes de referência endógena utilizados. Os níveis de expressão relativa foram calculados por meio do método de Pfaffl modificado conforme Vandersompele e colaboradores (2002), com auxílio da ferramenta Quiagen REST2009 (*Relative Expression Software Tool*), empregando os valores observados para os grupos celulares sem tratamento como controles de calibração.

TABELA 3.1. Iniciadores utilizados para as análises de RT-qPCR.

Gene	Sequência (5' - 3')	NCBI Refseq	Amplicon	Ref.
XBP1-s	<i>Fw.</i> ACACGCTTGGGAATGGACAC <i>Rv.</i> CCATGGGAAGATGTTCTGGG	NM_001271730.1	145 bp	Kim <i>et al</i> , 2016
BIP	<i>Fw.</i> GCTTCGTGTCTCCTCCTGAC <i>Rv.</i> TAGGAGTCCAGCAACAGGCT	NM_022310.3	93 bp	Sowers <i>et al</i> , 2018
ATF4	<i>Fw.</i> TGAGGCTCTGAAAGAGAAGGCAGA <i>Rv.</i> AGCACAAAGCACCTGACTACCCTA	NM_009716.3	154 bp	Juknat <i>et al</i> , 2018
GAPDH*	<i>Fw.</i> CATCACTGCCACCCAGAAGACTG <i>Rv.</i> ATGCCAGTGAGCTTCCCCTTCAG	XM_017321385.1	153 bp	**
HPRT*	<i>Fw.</i> GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG <i>Rv.</i> GATTCAACTTGCGCTCATCTTAGGC	NM_013556.2	163 bp	***
18S*	<i>Fw.</i> TAGAGGGACAAGTGCGCTTC <i>Rv.</i> CGCTGAGCCAGTCAGTGT	NR_003278.3	104 bp	***

Fw. Forward; *Rv.* Reverse. *Genes utilizados como referência endógena de expressão. **Iniciador desenhado para o corrente estudo. *** Iniciadores gentilmente cedidos pelo Laboratório de Imunofarmacologia e Doenças Infecciosas (LIDI) da Universidade Federal de Santa Catarina

3.2.11 Análise estatística

Os valores obtidos foram tabulados e sumarizados através de medidas de estatística descritiva. A significância estatística foi avaliada pelo teste t de Student

para a análise entre dois grupos e a múltipla análise entre variáveis foi realizada através do método *one way* ANOVA.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Expressão, purificação e caracterização de Tat recombinante

Embora altamente conservada entre cepas do mesmo subtipo viral, a sequência peptídica de Tat é significativamente diversa em relação às diferentes variantes do HIV-1 descritas. Estas variações estruturais ocasionam alterações nas propriedades funcionais de Tat e podem resultar em diferenças na atividade biológica observada para cada subtipo viral em experimentações *in vivo* e *in vitro* (SPECTOR *et al*, 2019). Uma vez que o HIV-1 subtipo B é o que tem sido alvo do maior número de investigações, o objetivo inicial deste estudo foi desenvolver um sistema de expressão heteróloga de Tat baseado na sequência de 86 resíduos descrita por Kirsch e colaboradores (1996), identificado originalmente no isolado BH10 do HIV-1 subtipo B. O sistema de expressão partiu da síntese e clonagem da sequência peptídica em vetor de expressão bacteriano sob indução do promotor T7 (pET-15B), observada a inclusão de um motivo adicional de 6 resíduos de histidina na porção N-terminal da proteína a fim de facilitar sua posterior purificação em cromatografia de afinidade (Figura 3.1a, 3.1b). A opção por um sistema de expressão bacteriano justifica-se pelo maior rendimento da proteína recombinante e menor dispêndio de recursos em relação à estratégia originalmente proposta e desenvolvida para a execução deste trabalho, baseada na transfecção plasmidial em células HEK293 como reportado no Apêndice A.

A expressão de Tat recombinante foi confirmada em 4 e 16 horas após indução na fração solúvel do lisado bacteriano, bem como presente em corpos de inclusão insolúveis (Figura 3.1c), corroborando resultados descritos para sistemas de expressão heteróloga de Tat semelhantes (KIRSCH *et al*, 1996; SIDDAPPA *et al*, 2007). A etapa seguinte de purificação de Tat recombinante empregou somente sua forma solúvel, excluindo assim os potenciais problemas técnicos e perda de atividade biológica derivados dos processos de desnaturação de agregados proteicos. A estratégia de purificação empregada neste trabalho seguiu a abordagem descrita por

Siddappa e colaboradores (2007), utilizando de forma sequencial os métodos de cromatografia de afinidade (resina Ni-NTA) e cromatografia de exclusão aniônica. A fração eluída da coluna de Ni-NTA mostrou a presença de Tat recombinante relativamente livre de contaminantes, conforme análise em gel de poliacrilamida (Figura 3.2a, coluna 3), apresentando pequena quantidade proteínas bacterianas, possíveis multímeros de Tat (bandas de migração lenta) e produtos de degradação proteica (bandas de migração rápida).

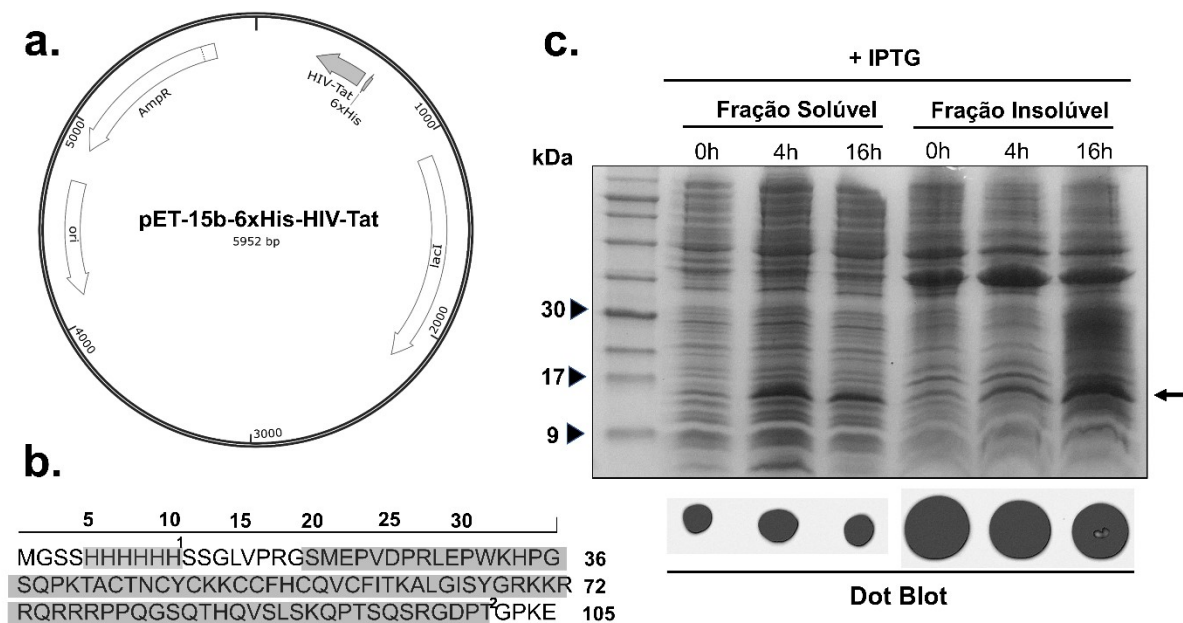


FIGURA 3.1. Sistema de expressão de Tat baseado no vetor pET-15b. **a.** Representação gráfica do plasmídeo pET-15b-6xHis-HIV-Tat codando para Tat recombinante (*Genone*). **b.** Representação do produto gênico do inserto clonado em pET-15b indicando o motivo peptídico de afinidade 6xHis¹ e a sequência teórica de Tat BH10². **c.** Perfil de expressão proteica em gel de poliacrilamida e identificação do epítipo 6xHis por *Dot Blot* das frações solúvel e insolúvel de *E. Coli* BL21(DE3) transformadas com pET-15b-6xHis-HIV-Tat em 0, 4 e 16 horas após indução com IPTG.

A eluição obtida da coluna Ni-NTA foi diretamente aplicada em coluna de exclusão aniônica (SP-sepharose), sem passos adicionais de remoção do Imidazol. Uma vez que o ponto isoelétrico (pI) da maior parte das variantes de Tat é ligeiramente alcalino em contraste com a natureza ácida das proteínas nativas de *E. Coli* (SIDDAPPA *et al*, 2007; SAMPATH, 2018), tal diferença eletroquímica foi considerada no delineamento desta estratégia de purificação. Dessa forma, no tampão de eluição da coluna Ni-NTA ajustado em pH 6,8, Tat apresenta-se positivamente carregada,

permitindo sua ligação eletrostática à resina aniônica e a exclusão de proteínas bacterianas com carga negativa, possibilitando a obtenção de uma eluição final virtualmente livre de proteínas contaminantes (Figura 3.2a, coluna 5). Adicionalmente, o protocolo utilizado incluiu extensivas lavagens com tampão acrescido do detergente Triton X-100 em concentração 2% com o intuito de minimizar a copurificação de lipopolissacarídeos de parede celular bacteriana – uma das maiores limitações de sistemas de expressão heteróloga em *E. coli*, dado sua natureza anfipática, sua capacidade de adsorção e seu potente efeito indutor em células imunocompetentes (SAMPATH, 2018). Em concentrações ótimas de Triton X-100, o componente lipídico dos lipopolissacarídeos interage com as estruturas micelares do detergente e, como consequência dessa interação, as endotoxinas são eficientemente separadas da fase aquosa (PETSCH, 2000), resultando em potencial diminuição dos níveis de lipopolissacarídeos copurificados junto à Tat na ordem de 500 à 9.000 vezes (SIDDAPPA *et al*, 2007).

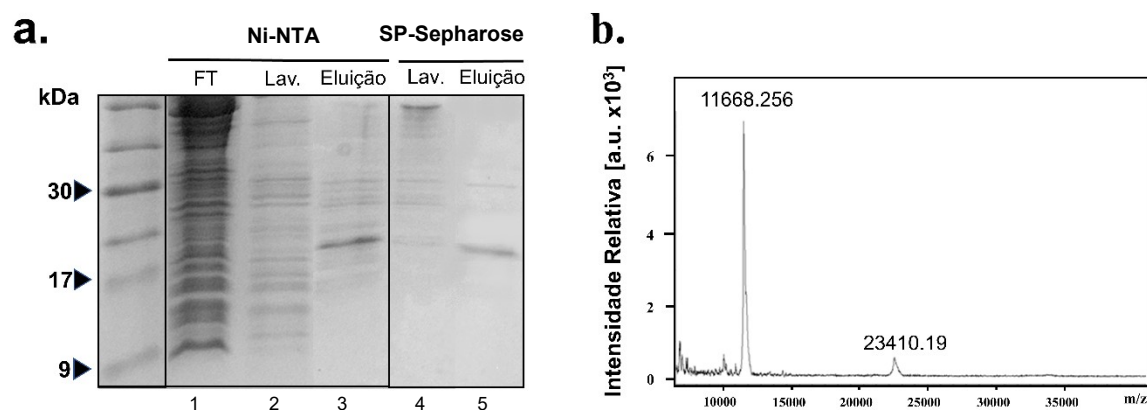


FIGURA 3.2. Purificação de Tat expressa em *E.coli* BL21(DE3). **a.** Purificação da fração solúvel da proteína Tat recombinante realizada com coluna Ni-NTA, seguida de purificação da eluição em coluna SP-Sepharose. **b.** Espectro de massas (MALDI-TOF) de fração eluída de coluna SP Sepharose, apresentando os picos correspondentes à forma monomérica e dimérica de Tat recombinante.

Por fim, a fração purificada de Tat obtida da cromatografia de exclusão aniônica foi ultrafiltrada para concentração e troca de tampão, eliminando assim traços residuais de Imidazol e excesso de NaCl, com rendimento final aproximado de 800 µg por litro de cultivo em 16 h de indução. A pureza da fração final foi confirmada pela análise do espectro de massas (Figura 3.2b), apresentando um pico maior de massa 116668.256, atribuído à forma monomérica de Tat (massa teórica de 11810.45), bem

como um segundo pico de massa 23419.19, que corresponde a forma dimérica da proteína recombinante. Picos de menor massa representam possíveis produtos de degradação de Tat recombinante. A confirmação da identidade da proteína expressa foi alcançada pela análise do espectro de massas dos fragmentos gerados após digestão enzimática (Figura 3.3), revelando 11 picos compatíveis com o espectro peptídico calculado para a sequência de Tat recombinante (Tabela 3.1) e um grau de similaridade de 78,2% conforme a ferramenta MASCOT ($p < 0,05$).

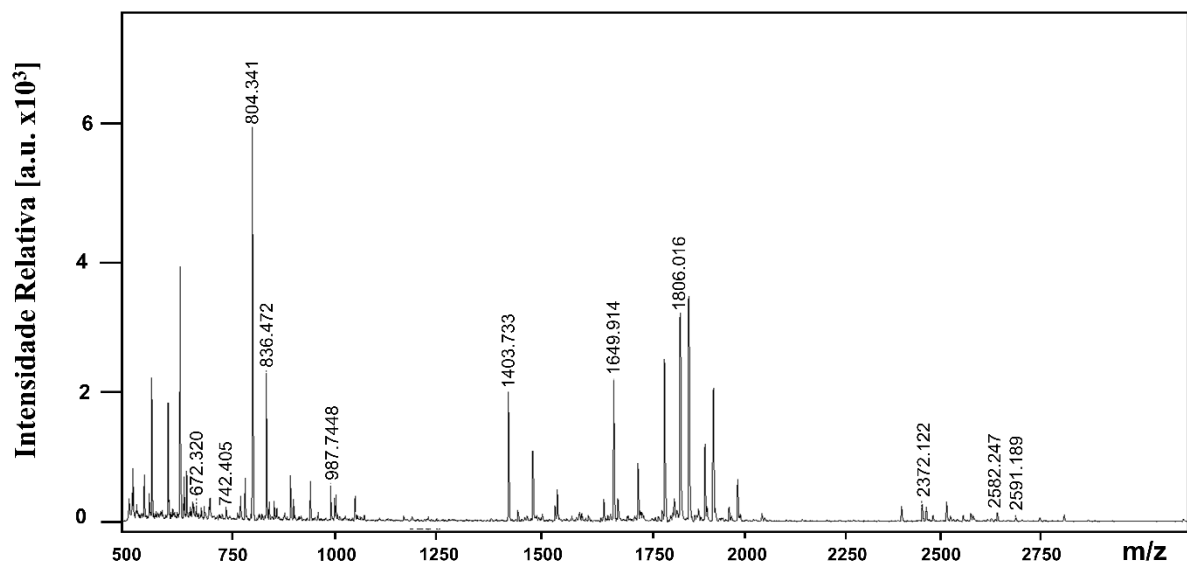


FIGURA 3.3. Caracterização bioquímica de Tat recombinante por espectrometria de massas (MALDI-MS/MS). Amostras de Tat recombinante foram submetidas à digestão por tripsina e fragmentos peptídicos extraídos e analisados em tandem conforme o protocolo previamente descrito. Os números indicam as massas observadas dos fragmentos compatíveis com Tat (TAT_HV1B1).

TABELA 3.2 Identificação e caracterização dos fragmentos peptídicos de Tat recombinante através de MALDI-MS/MS – PMF (*Peptide Mass Fingerprint*)

Pico	M/z Observado	M/z Calculado	Posição	Sequência Peptídica
1	672.320	672.372	23-27	LEPWK
2	742.405	743.475	66-70	KRRQR
3	804.341	803.401	87-93	QPTSQSR
4	836.472	836.462	57-64	ALGISYGR
5	987.448	987.456	14-22	GSMEPVDPR
6	1403.733	1403.743	23-24	LEPWKHPGSQPK
7	1649.914	1649.872	72-86	RPPQGSQTHQVLSK
8	1806.016	1805.973	71-86	RRPPQGSQTHQVLSK
9	2372.122	2372.182	14-34	GSMEPVDPRLEPWKHPGSQPK
10	2582.247	2547.060	35-56	TACTNCYCKKCCFHCQVCFITK
11	2591.189	2590.356	71-93	RRPPQGSQTHQVLSKQPTSQR

3.3.2 Avaliação da atividade biológica de Tat recombinante

A forma extracelular de Tat é amplamente descrita como um dos fatores centrais da patogênese do HIV-1, podendo induzir a expressão de moléculas de potencial imunológico através de distintos mecanismos e espécies celulares (DEBAISEIUX *et al*, 2012). Em especial, o estímulo *bystander* de Tat é capaz de ativar células microgлияis e está associado à resposta neuroinflamatória, contribuindo para o processo neurodegenerativo observado nas HAND (MINGHETTI *et al*, 2004; BAGASHEV e SAWAYA, 2013; BORRAJO LÓPEZ *et al*, 2021). Assim, como forma de avaliar a atividade biológica de Tat recombinante e explorar diferentes propriedades de sua potencial ação indutora sobre células microgлияis, as experimentações *in vitro* deste trabalho contaram com a utilização da linhagem BV-2 como modelo celular, conforme anteriormente apresentado.

O radical livre óxido nítrico (NO), produto da conversão enzimática de L-arginina em L-citrulina, é um importante mediador de diversas funções fisiológicas e, quando sintetizado em grande quantidade por macrófagos, glia ou células endoteliais, pode tornar-se um efetor citotóxico da resposta imune (MINGHETTI *et al*, 2004; TURCHAN-CHOLEWO *et al*, 2009). A contribuição do estresse nitrosativo na injúria neuronal é extensamente descrita para diversas doenças neurodegenerativas, incluindo as HAND (CHUGH *et al*, 2007; IVANOV *et al*, 2016), sendo intrinsecamente relacionado ao efeito indutor de Tat sobre astrócitos e células microgлияis (MINGHETTI *et al*, 2004; COSENZA *et al*, 2004; BAGASHEV e SAWAYA, 2013). Dessa forma, os achados iniciais aqui relatados partiram da análise dos níveis de NO em sobrenadantes de células BV-2 cultivadas na presença de Tat recombinante, em um gradiente crescente de concentrações e intervalo experimental arbitrariamente determinado. Os resultados demonstraram o evidente efeito indutor de Tat recombinante sobre o mecanismo relacionado à síntese de NO, evidenciando ainda a potencial relação dose/resposta de Tat em razão do aumento linear e concentração-dependente dos níveis de NO observados (Figura 3.4a). As concentrações relativamente altas de Tat requeridas para a indução de NO em células BV-2 sugerem o envolvimento de um mecanismo direto de transativação desencadeado pela internalização da proteína e subsequente indução do maquinário celular de transcrição, uma vez que a ativação mediada por receptores é geralmente deflagrada por doses menores de Tat

(MINGHETTI *et al*, 2004). Em paralelo à utilização de grupos celulares não tratados como controle negativo de estimulação, um controle adicional foi incluído a partir de células expostas à alíquotas de Tat purificadas pelo processo anteriormente descrito e submetidas à inativação por calor. Sobrenadantes de células BV-2 expostas à Tat inativada não apresentaram diferença significativa na quantidade de NO comparado ao grupo celular não tratado, sugerindo a relação entre a atividade efetora de Tat recombinante e sua integridade estrutural. Este resultado confirma a ausência de quantidades significativas de lipopolissacarídeos bacterianos na eluição final de Tat, dado que estes contaminantes são termicamente estáveis e, portanto, resistentes à processos de inativação por calor (SAMPATH, 2018). Ressalta-se que a linhagem BV-2 mostrou-se reativa ao estímulo à endotoxinas mesmo em concentrações relativamente baixas, como constatado em ensaio piloto (secreção de NO mensurável a partir de 200 ng/mL, Figura 3.4b), o que valida sua utilização como controle positivo de ativação microglial no modelo empregado. Para fins de padronização, os demais ensaios conduzidos durante a realização deste estudo utilizaram a concentração ótima de 400 nM da proteína recombinante.

Assim como a exacerbação na síntese de NO, a secreção de mediadores pró-inflamatórios por células imunocompetentes representa um relevante mecanismo de defesa durante o processo infeccioso, embora potencialmente danoso quando em grande volume ou períodos prolongados (MINGHETTI *et al*, 2004; HONG e BANKS, 2015; ORIHUELA *et al*, 2015; GRAZIANO *et al*, 2016; CHIVERO *et al*, 2017). Um extenso número de dados clínicos e experimentais revelam que a liberação precoce e contínua de efetores inflamogênicos como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ e MCP-1 está intrinsicamente ligada à neuropatogênese associada ao HIV-1 e é atribuída à reatividade de células gliais em resposta à infecção produtiva ou a fatores virais circulantes como Nef, gp120 e Tat (PUGLIESE *et al*, 2005; BAGASHEV e SAWAYA, 2013; GRAZIANO *et al*, 2016; CHIVERO *et al*, 2017). A capacidade de Tat recombinante em desencadear a expressão de moléculas relacionadas à atividade neuroinflamatória em células BV-2 foi avaliada ao longo de diferentes tempos experimentais por meio de *cytometric bead arrays* para a análise e quantificação de TNF- α em cultura. Como mostra a Figura 3.4c, o tratamento com Tat aumentou significativamente o montante da citocina analisada em relação aos controles celulares negativos em todos os intervalos ensaiados, confirmando a ação pró-

inflamatória da proteína viral. O robusto efeito estimulatório de Tat nos intervalos iniciais de exposição (6-12 h) reforça a hipótese da participação de mecanismos diretos de sinalização celular e evidencia o papel central que esses efetores inflamatórios desempenham na ativação microglial e decorrente neurotoxicidade mediadas por Tat. Essa asserção é sustentada pela descrição de TNF- α como molécula-chave na instauração e progressão do processo inflamatório e sua ação sinérgica com Tat e outros fatores solúveis na exacerbação da resposta imune (EL-HAGE *et al*, 2005; EUGENIN *et al*, 2005; BORRAJO LÓPEZ *et al*, 2021). O entendimento do papel de Tat na modulação dos mecanismos de indução de um fenótipo inflamogênico em células microgliais foi corroborado por ensaios subsequentes e será abordado novamente nos próximos capítulos deste trabalho.

A atividade apoptótica de Tat tem sido relatada para uma extensa gama de espécies celulares – incluindo linfócitos, células endoteliais, neurônios e astrócitos e atribuído a diferentes mecanismos celulares (MIDDE *et al*, 2012; BAGASHEV e SAWAYA, 2013; CHE *et al*, 2014; ÁNCHEZ-DEL COJO *et al*, 2017; CAMPESTRINI *et al*, 2018). A fim de determinar a temporalidade e extensão do potencial apoptótico de Tat recombinante em células BV-2, as experimentações seguiram com a avaliação do perfil de viabilidade celular através de análises fluorimétricas de marcadores de integridade de membrana (Figura 3.4d). Como apresentado, observa-se queda nas porcentagens de células viáveis em relação aos grupos controle após 48 h de exposição, sugerindo uma ativação tempo-dependente dos processos de morte celular modulados por Tat. Esses resultados concordam com dados da literatura que indicam que Tat não é capaz de induzir a perda da viabilidade microglial *in vitro* após períodos de exposição menores que 24 h (TURCHAN-CHOLEWO *et al*, 2009) e indicam que a ação apoptótica de Tat em células BV-2 dá-se em provável consequência de sua atividade excitatória e o decorrente estresse celular ocasionado. Tomados em conjunto, os dados obtidos das análises de secreção de TNF- α e apoptose permitem traçar um perfil cinético da ação estimulatória de Tat recombinante no modelo microglial, indicando máxima atividade celular e inflamogênica entre 24 e 48 horas de ensaio.

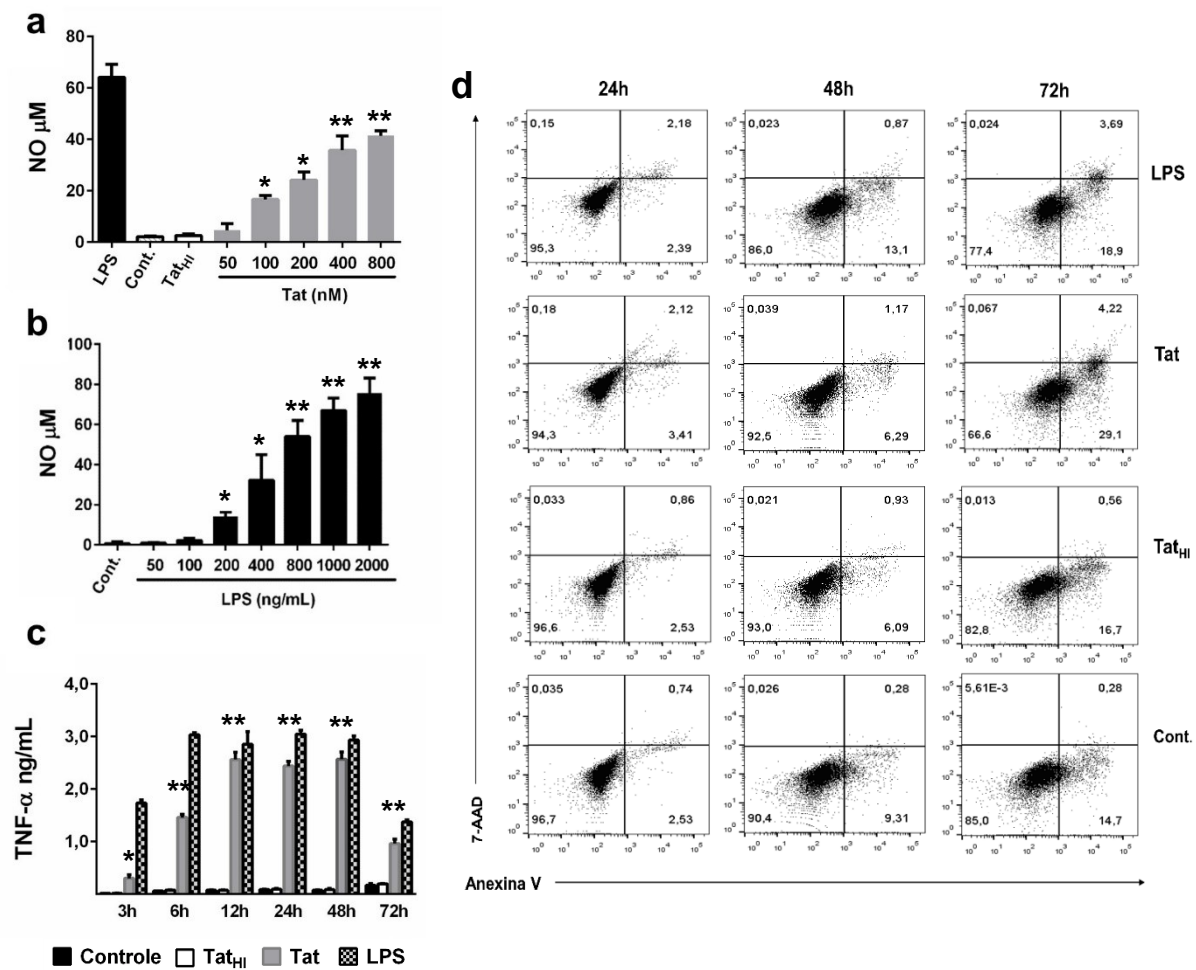


FIGURA 3.4. Atividade *in vitro* de Tat recombinante. **a.** Células BV-2 ($0,5 \times 10^6$) foram tratadas com concentrações crescentes de Tat, Tat inativada por calor (Tat_{HI}, 400 nM) ou LPS (1 µg/mL) e níveis secretados de NO avaliados Método de Griess após 48h. **b.** Células BV-2 foram tratadas com concentrações crescentes de LPS e níveis secretados de NO avaliados após 48h. **c.** Células BV-2 ($0,5 \times 10^6$) foram tratadas com Tat (400 nM), Tat inativada por calor (Tat_{HI}, 400 nM) ou LPS (1 µg/mL) nem diferentes intervalos experientais sobrenadante submetido à análise da expressão de TNF-α por CBA. **d.** Representação gráfica do perfil de apoptose de células BV-2 tratadas com Tat (400 nM), Tat_{HI} ou LPS em 24, 48 e 72h avaliado através da intensidade de fluorescência dos marcadores Anexina V/7-AAD por citometria de fluxo. Gráficos de barras apresentando dados como média da percentagem \pm desvio-padrão. Como controle (Cont) foram utilizadas células não tratadas. Resultados representativos de três experimentos independentes e considerados estatisticamente relevantes em relação ao controle sem tratamento ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$).

Por fim, como forma de validar o modelo *in vitro* quanto à experimentação da potencial ação moduladora de Tat recombinante nas respostas de estresse do RE, realizou-se a análise da expressão transcricional de componentes centras das vias UPR – BIP, ATF4 e XBP-1s, relacionados à diferentes cascatas de sinalização deflagradas a partir da quebra da proteostase. Para tanto, células BV-2 foram estimuladas com Tat recombinante em intervalos crescentes de exposição e as

expressões relativas dos genes de interesse avaliadas. Como apresentado na Figura 3.5, o estímulo de Tat promoveu um aumento significativo e tempo-dependente nos níveis dos transcritos dos genes analisados, evidenciando a capacidade da proteína viral em induzir a ativação de diferentes braços da UPR e reafirmando a natureza temporal deste processo. Estes dados preliminares concordam com estudos anteriores que demonstraram a ativação da UPR mediada por Tat concomitante à ativação celular de astrócitos e células T ao longo de diferentes intervalos experimentais (FAN e HE, 2016; CAMPESTRINI *et al*, 2018). Em particular, observa-se o robusto aumento na expressão das moléculas analisadas após 48 h de ensaio, congruente ao perfil temporal de atividade celular dirigido por Tat recombinante em células BV-2 previamente descrito. Nota-se ainda a expressão significativa de ATF4 no maior intervalo avaliado, em paralelo ao efeito apoptótico de Tat exibido em 72 h de exposição; este achado permite inferir que a morte celular tardia induzida por Tat em células BV-2 é desencadeada, ao menos em parte, pela sobreexpressão de ATF4, dado que a sinalização mediada por este fator pode levar uma resposta pró-apoptótica (WANG *et al*, 2017; CAMPESTRINI *et al*, 2018).

Em síntese, os achados sumarizados nesta seção confirmam a competência de Tat recombinante em modular diferentes facetas da ativação/atividade de células microgliais, corroborando o corpo de dados disponível em literatura e suportando a exequibilidade da abordagem *in vitro* utilizada neste estudo.

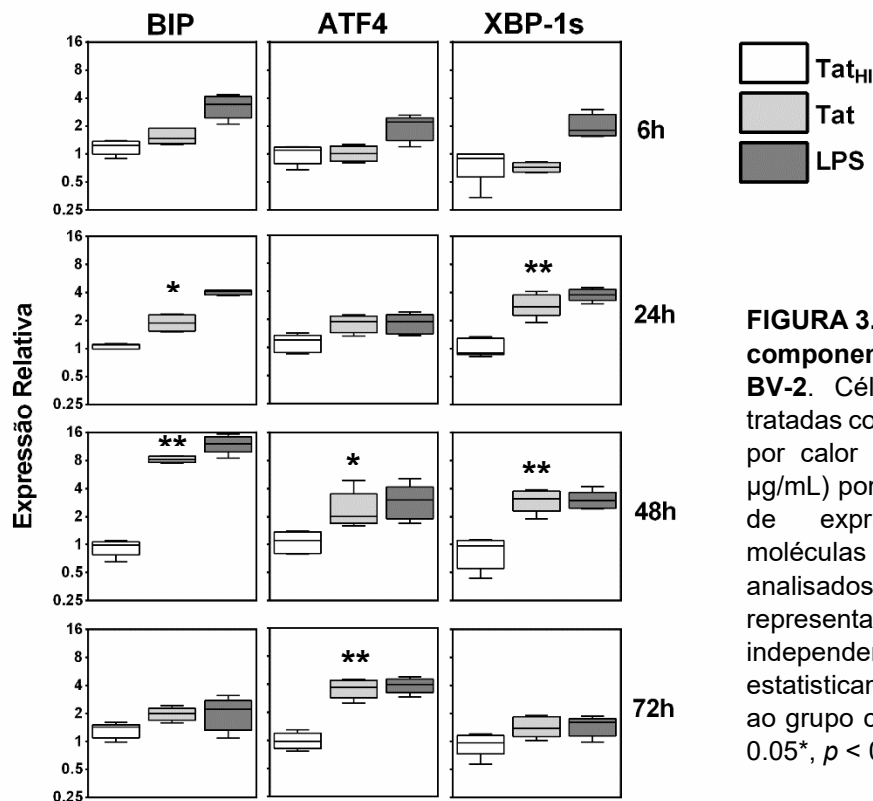


FIGURA 3.5. Tat induz a expressão de componentes da via UPR em células BV-2. Células BV-2 ($0,5 \times 10^6$) foram tratadas com Tat (400 nM), Tat inativada por calor (Tat_{HI}, 400 nM) ou LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 6, 24, 48 ou 72h e os níveis de expressão transcricional de moléculas relacionadas à via UPR analisados por RT-qPCR. Resultados representativos de três experimentos independentes e considerados estatisticamente relevantes em relação ao grupo celular tratado com Tat_{HI} ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$).

3.4 REFERÊNCIAS

ÁNCHEZ-DEL COJO, María et al. Changes in the Cellular microRNA Profile by the Intracellular Expression of HIV-1 Tat Regulator: A Potential Mechanism for Resistance to Apoptosis and Impaired Proliferation in HIV-1 Infected CD4+ T Cells. *PLOS One*, v. 12, n. 10, 2 outubro 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0185677>>.

ARMENGAUD, Jean; PEREZ, Lidia; LEMAY, Piere; MASSON, Jean-Michel. Production of a full length Tat protein in *E. coli* and its purification. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, v. 282, p. 1873-3468, 22 abril 1991. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80467-H](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80467-H)>.

BAGASHEV, Asen; SAWAYA, Bassel E. Roles and Functions of HIV-1 Tat Protein in the CNS: An Overview. *Virology Journal*, v. 10, n. 1, dez. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-10-358>>.

BOKHARI, Sirosh; YAO, Honghong; BETHEL-BROWN, Crystal; et al. Morphine enhances Tat-induced activation in murine microglia, *Journal of Neurovirology*, v. 15, n. 3, p. 219-228, 6 janeiro 2009. Disponível em: <[doi:10.1080/13550280902913628](https://doi.org/10.1080/13550280902913628)>.

BORRAJO LÓPEZ, Ana; PENEDO, Maria Aranzázu; RIVERAS-BALTANAS, Tania; PÉREZ-RODRIGUES, Daniel, et al. Microglia: The Real Foe in HIV-1-Associated Neurocognitive Disorders? *Biomedicines* v. 9, n. 925, 31 julho 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/biomedicines9080925>>.

CAMPESTRINI, Jéssica; SILVEIRA, Douglas Bardini; PINTO, Aguinaldo Roberto. HIV-1 Tat-induced bystander apoptosis in Jurkat cells involves unfolded protein responses. *Cell Biochemistry and Function*, v. 36, n. 7, p. 377-386, 24 setembro 2018. Disponível em: <<http://doi:10.1002/cbf.3357>>.

CHE, Xim, et al. HIV-1 tat-mediated apoptosis in human blood-retinal barrier-associated cells. *PLOS One*, v. 9, n. 4, p. 1-9, 16 abril 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095420>>.

CHIVERO, E. T.; GUO, M.-L.; PERIYASAMY, P.; LIAO, K.; CALLEN, S. E.; BUCH, S. HIV-1 Tat Primes and Activates Microglial NLRP3 Inflammasome-Mediated Neuroinflammation. *The Journal of Neuroscience*, [s. l.], v. 37, n. 13, p. 3599–3609, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3045-16.2017>>.

CHUGH, Pauline; et al. Infection of Human Immunodeficiency Virus and Intracellular Viral Tat Protein Exert a Pro-Survival Effect in a Human Microglial Cell Line. *Journal of Molecular Biology*, v. 366, n. 1, p. 67–81, fev. 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2006.11.011>>.

COSENZA, M. A.; ZHAO, M.-L.; LEE, S. C. HIV-1 Expression Protects Macrophages and Microglia from Apoptotic Death. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, v. 30, n. 5, p. 478–490, out. 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2990.2004.00563.x>>.

DEBAISIEUX, Soléne; et al. The Ins and Outs of HIV-1 Tat. *Traffic*, v. 13, n. 3, p. 355–363, 11 outubro 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01286.x>>.

DONG Huaqian; YE Xiang; ZHONG, Ling; et al. Role of FOXO3 Activated by HIV-1 Tat in HIV-Associated Neurocognitive Disorder Neuronal Apoptosis. *Frontiers in Neuroscience*, v. 13, 4 fevereiro de 2019. Disponível em: <<http://doi:10.3389/fnins.2019.00044>>.

DUAN, Ming; YAO, Honghong; CAI, Yu; LIAO Ke; et al. HIV-1 Tat disrupts CX3CL1-CX3CR1 axis in microglia via the NF- κ BYY1 pathway. *Current HIV research*, v. 12, n. 3, p. 189–200, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.2174/1570162x12666140526123119>>.

EL-HAGE, Nazira; et al. HIV-1 Tat and Opiate-Induced Changes in Astrocytes Promote Chemotaxis of Microglia through the Expression of MCP-1 and Alternative Chemokines. *Glia*, v. 53, n. 2, p. 132–146, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/glia.20262>>.

EUGENIN, Eliseo; et al. HIV-1 Tat Protein Induces a Migratory Phenotype in Human Fetal Microglia by a CCL2 (MCP-1)-Dependent Mechanism: Possible Role in NeuroAIDS. *Glia*, v. 49, n. 4, p. 501–510, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/glia.20137>>.

FAGUNDES, Djalma; TAHA, Murched Omar. Animal disease model: choice criteria and current animals specimens. *Acta Cirúrgica Brasileira*, vol. 19, n. 1, p. 59-65, janeiro 2004.

FAIA, Celeste; PLAISANCE-BONSTAFF, Karlie; PERUZZI, Francesca. In vitro models of HIV-1 infection of the central nervous system, *Drug Discovery Today: Disease Models*, v. 21, p. 5-11, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2019.10.007>>.

FAN, Yan; HE, Johnny. HIV-1 Tat Induces Unfolded Protein Response and Endoplasmic Reticulum Stress in Astrocytes and Causes Neurotoxicity through Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) Activation and Aggregation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 291, n. 43, p. 22819-22829. Outubro 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1074/jbc.M116.731828>>.

FITTING, Sylvia; KNAPP, Pamela; ZOU, Shiping; et al. HIV-1 Tat and Morphine-Induced Synaptodendritic Injury Is Triggered through Focal Disruptions in Na⁺ Influx, Mitochondrial Instability, and Ca²⁺ Overload. *Journal of Neuroscience*, v. 34, n. 38, p. 12850-12864, 17 setembro 2014. Disponível em <<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5351-13.2014>>.

GRAZIANO, Francesca; VICENZI, Elisa; POLI, Guido. Plastic Restriction of HIV-1 Replication in Human Macrophages Derived from M1/M2 Polarized Monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 100, n. 5, p. 1147–1153, 30 junho 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1189/jlb.4AB0316-158R>>.

HAKANSSON, Susanna; JACOBS, Amy; CAFFREY, Michael. Heparin binding by the HIV-1 tat protein transduction domain. *Protein Science*, v. 10, p. 2138-2139, 31 dezembro 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1110/ps.23401>>.

HATZIOANNOU, Theodora; EVANS, David. Animal models for HIV/AIDS research. *Nature Reviews Microbiology*, v. 10, p. 852–867, 16 novembro 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrmicro2911>>.

HENN, Anja. The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX*, p. 83–94, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.14573/altex.2009.2.83>>.

HONG, Suzi; BANKS, William A. Role of the Immune System in HIV-Associated Neuroinflammation and Neurocognitive Implications. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 45, p. 1–12, março 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2014.10.008>>.

HSIAO, Chiu_Bin; BEDI, Harneet; GOMEZ, Raquel; et al. Telomere Length Shortening in Microglia: Implication for Accelerated Senescence and Neurocognitive Deficits in HIV. *Vaccines*, v. 9, n. 721, 1 julho 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/vaccines9070721>>.

ITO, Sachiko et al. GADD34 Inhibits Activation-Induced Apoptosis of Macrophages through Enhancement of Autophagy. *Scientific Reports*, v. 5, n. 1, 9 fev. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep08327>>.

IVANOV, Alexander V; et al. Oxidative Stress during HIV Infection: Mechanisms and Consequences. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016, p. 1–18, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2016/8910396>>.

JUKNAT, Ana et al. Differential Transcriptional Profiles Mediated by Exposure to the Cannabinoids Cannabidiol and Δ 9-Tetrahydrocannabinol in BV-2 Microglial Cells. *British Journal of Pharmacology*, v. 165, n. 8, p. 2512–2528, 23 mar. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01461.x>>.

KIM, Seol-Hee; SMITH, Adam; TAN, Jun; et al. “MSM ameliorates HIV-1 Tat induced neuronal oxidative stress via rebalance of the glutathione cycle.” *American journal of Translational Research*, v.7, n. 2, p. 328-38, 15 fevereiro 2015.

KIM, Rosa S. et al. The XBP1 Arm of the Unfolded Protein Response Induces Fibrogenic Activity in Hepatic Stellate Cells Through Autophagy. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, dez. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep39342>>.

KIRSCH, Thomas; et al. Cloning, High-Yield Expression in *Escherichia Coli*, and Purification of Biologically Active HIV-1 Tat Protein. *Protein Expression and Purification*, v. 8, n. 1, p. 75–84, ago. 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1006/prep.1996.0076>>.

MIDDE, Narasimha M.; GOMEZ, Adrian M.; ZHU, Jun. HIV-1 Tat Protein Decreases Dopamine Transporter Cell Surface Expression and Vesicular Monoamine Transporter-2 Function in Rat Striatal Synaptosomes. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, v. 7, n. 3, p. 629–639, 5 maio 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11481-012-9369-9>>.

MEEKER, Rick; POUTTON, Winona; CLARY, Gillian; SCHRIVER, Michael; et al. Novel p75 neurotrophin receptor ligand stabilizes neuronal calcium, preserves mitochondrial movement and protects against HIV associated neuropathogenesis. *Experimental Neurology*, v. 275, janeiro 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.09.012>>.

MINGHETTI, Luisa et al. Multiple Actions of the Human Immunodeficiency Virus Type-1 Tat Protein on Microglial Cell Functions. *Neurochemical Research*, v. 29, n. 5, p. 965–978, maio 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1023/b:nere.0000021241.90133.89>>.

OJEDA, Diego; GRASSO, Daniel; JAVIER Urquiza; et al. Cell death is counteracted by mitophagy in HIV-productively infected astrocytes but is promoted by inflammasome activation among non-productively infected cells. *Frontiers in Immunology*, v. 9, 20 novembro 2019. Disponível em: <<http://doi=10.3389/fimmu.2018.02633>>.

ORIHUELA, Ruben; MCPHERSON, Christopher A; HARRY, Gaylia Jean. Microglial M1/M2 Polarization and Metabolic States. *British Journal of Pharmacology*, v. 173, n. 4, p. 649–665, 11 maio 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/bph.13139>>.

PETSCH, D. Endotoxin removal from protein solutions. *Journal of Biotechnology*, v. 76, n. 2–3, p. 97–119, 21 janeiro 2000. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656\(99\)00185-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656(99)00185-6)>.

PUGLIESE, Andrew; et al. A Review of HIV-1 Tat Protein Biological Effects. *Cell Biochemistry and Function*, v. 23, n. 4, p. 223–227, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/cbf.1147>>.

RAI, Mohammad; HAMMONDS, Jason; PUJATO, Mário; et al. Comparative analysis of human microglial models for studies of HIV replication and pathogenesis. *Retrovirology*, v. 17, n. 35, 19 janeiro 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12977-020-00544-y>>.

SAMPATH, VishnuPriya. Bacterial Endotoxin-Lipopolysaccharide; Structure, Function and Its Role in Immunity in Vertebrates and Invertebrates. *Agriculture and Natural Resources*, v. 52, n. 2, p. 115–120, abr. 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anres.2018.08.002>>.

SIDDAPPA, Nagadenahalli; VENKATRAMANAN, Mohanhan; VENKATESH, Prasanna; et al. Transactivation and signaling functions of Tat are not correlated: biological and immunological characterization of HIV-1 subtype-C Tat protein *Retrovirology*, v. 3, n. 1, p. 53, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-3-53>>.

SOWERS, Carrie R. et al. The Protein Kinase PERK/EIF2AK3 Regulates Proinsulin Processing Not via Protein Synthesis but by Controlling Endoplasmic Reticulum Chaperones. *Journal of Biological Chemistry*, v. 293, n. 14, p. 5134–5149, 14 fev. 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M117.813790>>.

SPECTOR, Cassandra; et al. Genetic Variation and Function of the HIV-1 Tat Protein. *Medical Microbiology and Immunology*, v. 208, n. 2, p. 131–169, 5 mar. 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00430-019-00583-z>>.

THANGARAJ, Annadurai; CHIVERO, Ernest; ASHUTOSH, Tripathi; et al. HIV TAT-mediated microglial senescence: Role of SIRT3-dependent mitochondrial oxidative stress. *Redox Biology*, v. 40, n. 101843, abril 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101843>>.

TURCHAN-CHOLEWO, Jadwiga; et al. Morphine and HIV-Tat Increase Microglial-Free Radical Production and Oxidative Stress: Possible Role in Cytokine Regulation. *Journal of Neurochemistry*, v. 108, n. 1, p. 202–215, janeiro 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05756.x>>.

WANG, Yi-wei, et al. Mild endoplasmic reticulum stress ameliorates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and cognitive impairment via regulation of microglial polarization. *Journal of Neuroinflammation*, v. 14, n. 1, 28 nov. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12974-017-1002-7>>.

ZHENG, Jialin; HUANG, Yunlong; TANG, Kang; et al. HIV-1-infected and/or immune-activated macrophages regulate astrocyte CXCL8 production through IL-1 β and TNF- α : Involvement of mitogen-activated protein kinases and protein kinase R. *Journal of Neuroimmunology*, v. 200, n. 1–2, p. 100-110, 30 agosto 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.06.015>>.

ZOU, Shiping; FUSS, Babette; FITTING, Sylvia; et al. Oligodendrocytes Are Targets of HIV-1 Tat: NMDA and AMPA Receptor-Mediated Effects on Survival and Development. *The Journal of Neuroscience*, v. 33, n. 32, p. 11384 –11398, 15 agosto 2015. Disponível em: <<http://doi:10.1523/JNEUROSCI.4740-14.2015>>.

4. CAPÍTULO 3

PHARMACOLOGICAL INHIBITION OF UPR SENSOR PERK ATTENUATES HIV TAT-INDUCED INFLAMMATORY M1 PHENOTYPE IN MICROGLIAL CELLS

Publicado originalmente em: SILVEIRA, Douglas Bardini; AMÉRICO, Monique Ferrary; FLORES, Natália; TERENZI, Hernán; PINTO, Aguinaldo Roberto. Pharmacological inhibition of UPR sensor PERK attenuates HIV Tat-induced inflammatory M1 phenotype in microglial cells. *Cell Biochemistry and Function*. 18 janeiro 2022. Disponível em: <<http://doi:10.1002/cbf.3685>>.

4.1 ABSTRACT

HIV-1-associated neurocognitive disorders (HAND) are a major concern in HIV-infected individuals despite the currently available antiretroviral therapy regime. Impaired M1 pro-inflammatory microglial activation is considered one of the hallmark features of HAND neuropathogenesis and it has been suggested that circulant HIV-1 transactivator protein (Tat) can play a critical role in this process. At the same time, Endoplasmatic Reticulum (ER) stress has also been implicated in neurodegenerative conditions resulting from the accumulation of misfolded proteins and subsequent Unfolded Protein Response (UPR) deflagration. Here, we demonstrate that pharmacological inhibition of UPR-related protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) can attenuate HIV-1 Tat-induced M1 inflammatory state in microglia *in vitro*. Our initial experiments demonstrate that the bystander stimulus of recombinant Tat on BV-2 microglial cells result in the coupled overexpression of central UPR markers and pro-inflammatory mediators such as iNOS, surface CD16/32, and secreted TNF- α , IL-6, MCP-1 and NO. We show that blocking PERK-eIF2 α -ATF4 signaling using the PERK inhibitor GSK2606414 leads to reduced inflammatory response in M1-like BV-2 cells activated by recombinant Tat. Taken together, these findings suggest that PERK targeting may provide a therapeutic intervention to mitigate against lasting neuroinflammation and neuronal loss in of HAND.

Keywords: HIV-1 Tat; ER stress; PERK pathway; HAND; Microglia.

4.2 INTRODUCTION

Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-associated neurocognitive disorders (HAND) refer to a spectrum of neurologic impairments that range from asymptomatic, mild cognitive decline to severe dementia (SAYLOR *et al*, 2016). Neurological impairments observed in HAND can persist in patients who have well-suppressed HIV-1 replication with the use of antiretroviral therapy, indicating factors beyond viral load contribute to these neurological features (SAYLOR *et al*, 2016; SMAIL e BREW, 2018). The underlying pathogenesis of HAND remains only partially understood but it has been highlighted that HIV-1 trans-activator (Tat) protein, an early viral product continually secreted from infected cells, is a key component in HIV-1-mediated brain damage (LI *et al*, 2009; DONG *et al*, 2019). Extracellular Tat is biologically active and can directly depolarize neurons by interacting with a variety of surface receptors, and thus potentiating glutamate-induced excitotoxicity and death (FITTIPALDI e GIACCA, 2005; SAYED *et al*, 2011; WU *et al*, 2018; MARINO e WIGDHAL, 2020). Additionally, Tat induces neurotoxicity through indirect mechanisms via bystander effects on glial cells by modulating the synthesis of potentially neuroinflammatory mediators. (THANGARAJ *et al*, 2018; MARINO *et al*, 2020). HIV-1 Tat-derived activation of microglia, the brain-resident immune cells, triggers a proinflammatory cell phenotype (M1) characterized by overexpression of cytokines and chemokines such as tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), as well as reactive oxygen species and nitric oxide (NO). Increased M1-like microglial cells is consistent with high levels of neurodegeneration observed in HAND-affected brain, and may potentially play an important role in the pathophysiology of these disorders (BORRAJO *et al*, 2020).

In neurodegenerative diseases, several processes may lead to neuronal impairment and injury, including the accumulation of misfolded proteins and sequential endoplasmic reticulum (ER) stress. ER stress, in turn, triggers a coordinated molecular response that involves adaptive signaling pathways - ie. unfolded protein response (UPR). The UPR is mediated by trans-ER membrane proteins such as protein kinase RNA-like ER kinase (PERK), inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), and activating transcription factor (ATF6, SPRENKLE *et al*, 2017). Initial responses inhibit protein synthesis via PERK-dependent phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α) and promote selective up-regulation of transcriptional regulators and chaperones to redress protein misfolding overload and restore ER homeostasis (HETZ

e SAXENA, 2017). In parallel, apoptotic mechanisms are triggered in case adaptive responses fail, typically mediated by the translation of activating transcription factor 4 (ATF4) and its downstream cell death pathways (CAMPESTRINI *et al*, 2018). There is an increasing body of evidence indicating a coupling between ER stress and neuroinflammatory signaling networks, which suggest a link between UPR pathways in neurons and glia with the progression of neurodegenerative features such as those found in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and Prion-related disorders (CAO *et al*, 2015; SPREngle *et al*, 2017; HETZ e SAXENA, 2017) Based on this, we hypothesise that, by targeting UPR signaling, it may be possible to break or reduce the aberrant neuroinflammation program within nervous tissue that drives neuronal dysfunction. In this scenario, PERK is a particularly promising target owing to its pivotal role in ER stress-induced inflammation and given existing evidence that the disruption of PERK can be beneficial in experimental models of neurodegenerative diseases (GUTHRIE *et al*, 2016; HUGHES e MALLUCCI, 2018).

Here, we aimed to explore whether HIV-1 Tat-induced inflammatory phenotype of microglia could be selectively regulated by disrupting ER stress responses. To investigate this, we pharmacologically modulated UPR signaling with a PERK inhibitor using an *in vitro* model and demonstrate that downregulation of the PERK-eIF2 α -ATF4 axis significantly suppresses M1 microglial profile evoked by Tat. Our findings provide an important proof of concept for PERK as an regulatory factor in neuroinflammation and reinforce the assumption that the UPR pathway may be used as a therapeutic target for HAND.

4.3 MATERIAL AND METHODS

4.3.1 Recombinant HIV-1 Tat protein production and purification

Recombinant HIV-1 Tat protein was obtained using an heterologous expression system and a purification approach based on Siddappa *et al* (2006). Briefly, full-length HIV-1 Tat clade B sequence (isolate BH10, UniProtKB - P69697, TAT_HV1B1) was cloned into pET-15b vector (pET-15b-6xHis-HIV-Tat, 5952 pb, Genone, Brazil), which was used for *E. coli* BL21(DE3) transformation. Individually transformed bacterial colonies were cultured in Luria Bertani medium (Sigma, USA) supplemented with 100

$\mu\text{g/ml}$ of ampicillin and recombinant protein expression was induced by adding 1 mM isopropyl β -D-thiogalactoside (Sigma, USA). Cells were harvested, resuspended in lysis buffer, sonicated, centrifuged to remove cell debris and stored at -80°C . Two different chromatography techniques, Ni-NTA and SP-Sepharose, were used in tandem for purification of Tat recombinant. The fraction eluted from the Ni-NTA column (HisTrap HP, GE Healthcare LifeSciences, USA) was directly loaded onto SP-Sepharose columns (HiTrap SP FF, GE Healthcare LifeSciences, USA). Sequential washes with washing buffers adding 2% Triton X-100 were interspersed throughout the chromatographies. The bulk of the Tat protein was identified in soluble form and observed on a 15% SDS-PAGE gel.

The purified recombinant Tat was concentrated by ultrafiltration, mixed (1:1) with 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid solution 0.05% trifluoroacetic acid, and spotted onto MALDI Plate (MTP 384 Target Plate, Bruker Daltonics, USA). After the spot dried completely, the mass of recombinant Tat was determined using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) on a MALDI-TOF Ultra Flex III (Bruker Daltonics). Additionally, fingerprinting-based MALDI-TOF MS analysis was performed for peptide sequence confirmation and purity analyses. Spotted samples were previously subjected to reduction, alkylation and trypsin digestion. Peak lists were created using FlexAnalysis 3.0 software (Bruker Daltonics) and protein identification was performed by MASCOT software 2.4.00 (Matrix Science, USA) using the database from UniProt Knowledgebase web site. The following search parameters were used: fixed modifications, carbamidomethylation of cysteine; variable modification, methionine oxidation; one trypsin missed cleavage; error tolerance was set from 100–200 ppm, and peptide charge 1 H⁺. Protein identification was considered with E-value < 0.05. The overall results of purification and further characterization of recombinant Tat are shown in Supplementary Information (Supporting Figure 1 and Supporting Table 1, Supporting Information).

4.3.2 Cell culture and treatments

BV-2 microglial cells (Banco de Células do Rio de Janeiro, Brazil, #0356, RRID:CVCL_0182) were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich, USA) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum

(Cultilab, Brazil), 1mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, and maintained at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. BV-2 cells were seeded (5x10⁶) in 12-well plates and cultured until reached total confluency for subsequent experiments, when culture media was replaced with serum-free medium and recombinant Tat protein was added at different concentrations and incubating intervals. For experiments targeting PERK inhibition, the PERK-specific inhibitor GSK2606414 (Merck KGaA, GE) was solubilized according to supplier's instructions and assayed with or without recombinant Tat. Bacterial lipopolysaccharides (LPS, E. Coli O55:B5, Sigma-Aldrich, USA) were employed at 1 µg/mL to perform experimental M1 phenotype controls, whereas heat-inactivated recombinant Tat (boiled at 90° C for 1 h) was used as a negative control.

4.3.3 Measurement of CD16/32 and CD206 expression

BV-2 cells were detached from plates using trypsin (0.05%, Sigma-Aldrich, USA), washed with phosphate buffered saline (PBS), labelled with PE anti-CD206 (Biolegend, USA, #141705, RRID:AB_10896421, 0,5 µg/10⁶ cells) or FITC anti-CD16/32 (Biolegend, USA, #101305, RRID:AB_312804, 1 µg/10⁶ cells) during 40 min at 4° C. Cells were then washed, resuspended in PBS, and analyzed in BD FACSCanto II flow cytometer (Becton & Dickinson, USA) and FlowJo-VX software.

4.3.4 Cell viability and apoptosis assessment

Cell viability was evaluated by the Mosmann *et al* (1983), modified as described here. BV-2 cells were assayed and 100 µL of MTT [3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, Merck KGaA, GE] solution (5 mg/mL in DMEM without serum) was added to each well. After incubation for 4 h at 37° C in 5% CO₂, supernatants were removed and 1 mL of dimethyl sulphoxide (Sigma-Aldrich, USA) was added per well. Absorbance at 540 nm was measured using a spectrophotometer (SpectraMax Paradigm Multi-mode Microplate Reader, Molecular Devices, LLC, USA). In addition, the apoptotic profile of BV-2 cells was assessed by FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD (Biolegend, USA, # 640922) according to the supplier's recommendations. Apoptotic cells were analysed in FACSCanto II flow

cytometer and FlowJo-VX software. Double-stained cells (late apoptotic events) and Annexin V-stained cells (early apoptotic events) were considered.

4.3.5 Cytometric bead array and NO dosage

BV-2 cells were treated as described above and supernatants collected to assess inflammatory-related molecules using a bead-based immunoassay (CBA Mouse Inflammation kit, BD Pharmingen, USA) according to supplier recommendations. For NO dosage, supernatants from each experimental cell group were collected and assayed using a colorimetric method based on NO₂ formation, a primary stable and nonvolatile product of NO. In brief, supernatants were mixed (1:1) with 0.1% naphthyl ethylenediamine and 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid solution (Sigma-Aldrich, USA) for 5 min at room temperature in the dark. Absorbance was then measured at 540 nm using a spectrophotometer (SpectraMax Paradigm Multi-mode Microplate Reader, USA). NO concentrations were estimated by linear regression using a standard NaNO₂ curve (Sigma-Aldrich, USA) solubilized in DMEM.

4.3.6 Western blotting analysis

BV-2 cells were lysed using CellLytic MT Cell Lysis reagent (Sigma-Aldrich, USA) and total protein concentrations were quantified by the Bradford assay (Bio-Rad, USA). Samples were loaded (50 µg) and separated in 15% SDS-PAGE gel, followed by transferring (3 h at 200 mA) onto a nitrocellulose filter membrane (Bio-Rad, USA). The membranes were incubated at room temperature with 5% nonfat milk for 1 h, followed by incubation with primary anti-eIF2α (Santa Cruz Biotechnology, USA, #sc-133132, RRID:AB_1562699, 1:500), anti-p-eIF2α (Thermo Fischer, USA, #44-728G, RRID:AB_2533736, 1:1000), anti-ATF4 (Santa Cruz Biotechnology, USA, #sc-390063, RRID:AB_2810998, 1:500) and anti-β-actin (Abcam, USA, #ab8227, RRID:AB_2305186, 1:5000). Then, membranes were incubated with goat anti-rabbit (Sigma-Aldrich, #A0545, RRID:AB_257896, 1:5000) or goat anti-mouse (Sigma-Aldrich, USA, #A9309, RRID:AB_258443, 1:1000) secondary antibodies in skimmed milk for 1 h at room temperature. ECL Western blot substrates (Pierce, Thermo Fisher Scientific, USA) were used to identify immunoreactive bands, which were visualized

by ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, USA) and analyzed using ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

4.3.7 Quantitative real-time PCR

BV-2 cells were treated as described here, total RNA was extracted using RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA), and cDNA templates were synthesized from DNase-treated RNA with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific), according to the supplier's instructions. Gene expression was measured using FastSYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, USA) and StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies, USA). Reactions were performed in triplicate and the relative expression ratios were calculated according to the Pfaffl method modified by Vandesompele *et al* (2002) with the REST2009 tool (Qiagen, USA). Primer sequences were obtained from previous publications or designed using the PrimerBlast tool (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) and are available in Supporting Table 2 (Supporting Information).

4.3.8 Statistical analysis

Statistical significance was evaluated using the Student's t test when considering differences between two experimental groups, or by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's *post hoc* test in the case of multiple groups. Statistical significance level was determined at $p < 0.05$.

4.4 RESULTS

4.4.1 Effects of recombinant HIV-1 Tat on BV-2 cell viability and NO synthesis

To evaluate the potential for Tat-mediated coupling between M1 activation and ER stress in microglia, we employed a model system using a biologically active recombinant Tat and BV-2 cells, a cell line described as a substitute for primary microglial cultures due to its high fidelity and suitability *in vitro* (GRESA-ARRIBAS *et*

al, 2012). Firstly, as HIV-1 Tat has been well-characterized to promote microglial up-regulation of NO, a key neuroinflammatory marker, we sought to verify the activation capability of recombinant Tat in BV-2 cells by assessing the NO synthesis. To address this, cells were treated with increasing amounts of recombinant Tat and NO secretion was measured at an arbitrary time-point (48 h) through Griess assay. As shown in Figure 4.1A, Tat treatment induced NO synthesis in BV-2 cells in a concentration-dependent manner, reaching higher levels when stimulated with 400 nM ($p < 0.01$). This dose of recombinant Tat was thus chosen for all ensuing experiments. Furthermore, and as expected, NO production was undetectable in cells exposed to heat-inactivated recombinant Tat but robustly increased by LPS - a canonical inflammatory agent, validating their use for assaying negative and positive experimental controls, respectively.

Next, we investigated the time course of modulatory effects evoked by recombinant Tat in BV-2 cells based on assessments of NO production and cell viability profiling. Figure 4.1B shows that exposure of cells to recombinant Tat resulted in significantly increased secretion of NO starting at 12 h onwards ($p < 0.05$), with a sustained increase up to 48 h ($p < 0.01$). Conversely, Tat-treated BV-2 cells assessed for apoptotic death using 7-AAD / Annexin V staining exhibited a substantial decay in the rate of viable cells following 48 h (Fig 4.1C); a similar temporal pattern was checked for metabolic activity of cells under recombinant Tat stimuli using MTT cleavage assay (Fig 4.1D). Taken together, these initial findings confirm the ability of our in-house produced recombinant Tat to induce bystander inflammatory signaling and activation of microglia, as well as providing evidence for a potential Tat-modulated late apoptotic mechanism in these cells.

4.4.2 Pro-inflammatory microglial phenotype is induced by recombinant HIV-1 Tat stimulation

Having verified that recombinant Tat is capable of inducing an activation state in BV-2 cells, we further explored whether exposure of microglial cells to Tat could lead to M1-like phenotype by assessing the expression of M1/alternative activation profile (M2) signature markers. Thus, BV-2 cells were treated with recombinant Tat during 48 h and subjected to immunolabeling for CD16/32 (M1 marker) and CD206 (M2 marker)

followed by flow cytometry. Surface levels of M1-associated marker CD16/32 were clearly increased based on M1/M2 expression rates (Fig 4.2A) and fluorescence intensity (Fig 4.2B) of Tat-stimulated BV-2 cell groups regarding to negative controls. We also sought to examine the induction of other secreted molecules related to M1 polarization dynamics such as TNF- α , IL-6 and MCP-1. In addition to the previously reported NO induction, we found a significant enhancement of secretory levels of TNF- α ($p < 0.01$), IL-6 ($p < 0.001$) and MCP-1 ($p < 0.05$) in supernatants of cells exposed to recombinant Tat for 48 h using a bead-based immunoassay (Fig 4.2C). Lastly, we analyzed the potential Tat-mediated up-regulation of inducible NO synthase (iNOS) and its counterbalance with Arginase 1 (Arg-1) in BV-2 cells through a gene expressing approach. Interestingly, by using arginine, which is the same substrate used by iNOS, Arg-1 can effectively outcompete iNOS in downregulating NO synthesis, thus representing a relatively straightforward set of markers to follow M1 versus M2 phenotypes (JABLONSKI *et al*, 2015). Figure 4.2D shows the expected and significant increase of iNOS levels ($p < 0.01$) concurrently with the lowering of Arg-1 gene expression elicited by recombinant Tat. This corroborates our data from the previous experiment (Figure 4.1) and reinforces the hypothesis that HIV-1 Tat can directly interact with molecular pathways related to microglial NO synthesis. Overall, these findings highlight the inductive effects of recombinant Tat and provide strong evidence of its ability to drive a pro-inflammatory, M1-like activation state in BV-2 cells.

4.4.3 Recombinant HIV-1 Tat triggered UPR pathway in BV-2 cells

We next determined whether the bystander stimuli of recombinant Tat results in ER stress with consequent UPR activation by verifying the expression of ER stress markers such the UPR stress-sensing factors PERK, ATF6, and IRE1, as well as their downstream molecules. Thus, BV-2 cells were treated with recombinant Tat for 48 h and gene expression was assessed by RT-qPCR. As shown in Figure 4.3A, recombinant Tat promoted significant changes in expression levels of all genes assayed when compared to the negative control cell group, therefore suggesting a potential ER stress-related mechanism underlying the previously described inductive effects caused by Tat in microglia. To extend these findings and considering that PERK has emerged as a critical signaling node linking ER stress and inflammation (GUTHRIE

et al. 2016), we sought to confirm the triggering of PERK-related UPR branch through protein expression analyses by Western blotting. Our results show that eIF2 α phosphorylation and ATF4 expression were markedly up-regulated ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) in Tat-treated BV-2 cells (Fig 4.3B and 4.3C). Based on these data, we hypothesized that it may be possible to target PERK inhibition as a way to selectively modulate Tat-induced pro-inflammatory responses in BV-2 cells.

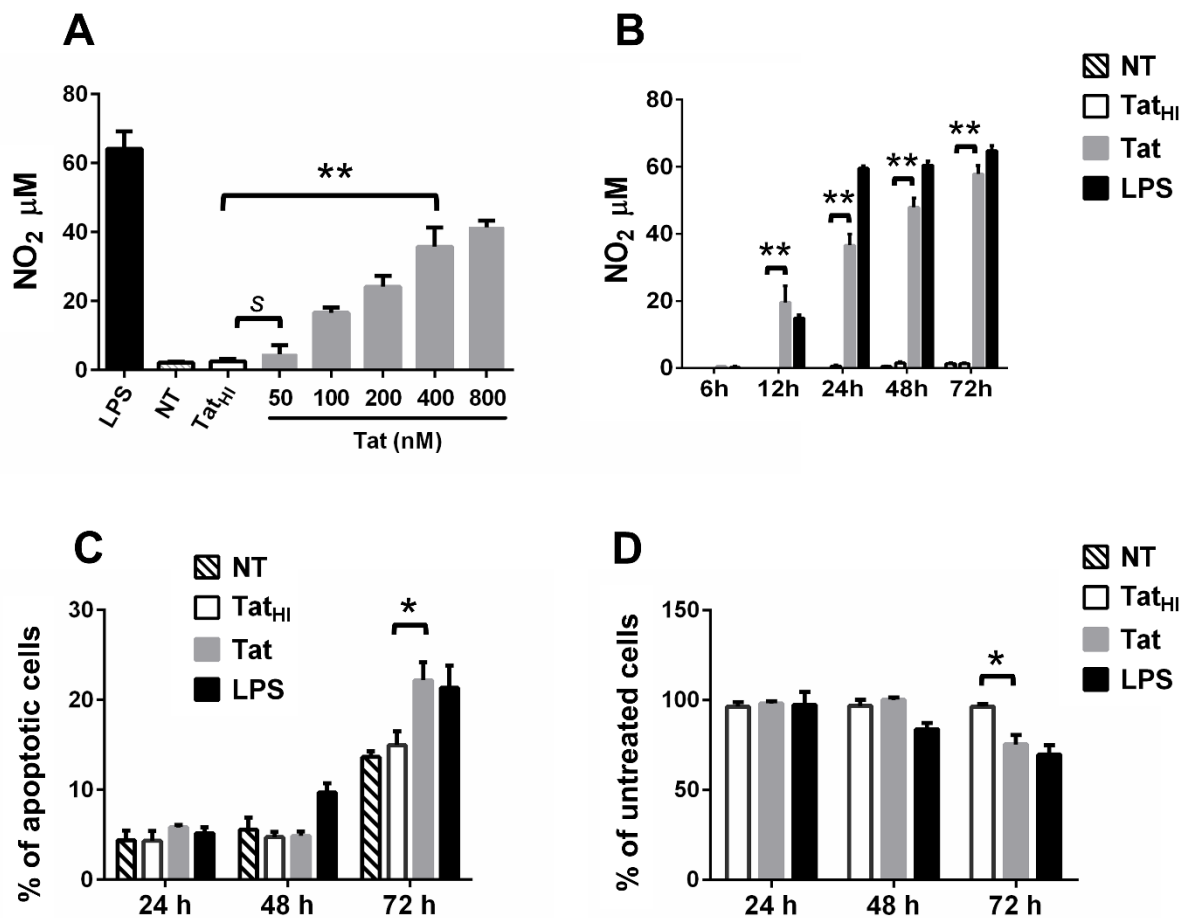


FIGURE 4.1. Initial assessment of HIV-Tat activity profile on BV-2 cells. (A) BV-2 cells were incubated for 48 h with increasing concentrations of recombinant Tat, and levels of secreted NO were indirectly measured by Griess assay. (B) BV-2 cells were cultured with recombinant Tat (400 nM) at different time-points and NO secretion was assayed. (C) Bar graph showing apoptotic cell rates as percentage \pm SD for BV-2 cells incubated with 400 nM of Tat for 24, 48 or 72h. Data acquired by flow cytometry after 7-AAD/Anexin V staining. (D) Bar graph showing cell viability rates for BV-2 cells incubated with 400 nM of Tat for 24, 48 or 72h. Data acquired by MTT assay and expressed as percentage of untreated cells \pm SD. Experimental controls were performed with LPS (1 μ g/mL), heat-inactivated Tat (Tat_{HI}, 400 nM) and untreated cells (NT). The data are representative of three independent experiments. Statistical significance is indicated in relation to heat-inactivated Tat-treated cells ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$).

4.4.4 GSK2606414 reduces HIV-1 Tat-mediated PERK-dependent ER stress in BV-2 cells

To test this assumption, we used the small molecule GSK2606414, a pharmacological inhibitor of PERK, at a non-cytotoxic concentration (120 nM) experimentally determined through BV-2 cells viability assays (Fig 4.4A). To verify the pharmacological inhibition of PERK-induced ER stress in our model, we analyzed the expression of PERK signaling components in Tat-treated BV-2 cells with or without GSK2606414 by RT-qPCR and Western blotting. Gene expression data confirmed that, when paired with recombinant Tat cultured cells, GSK2606414 significantly decreased PERK, eIF-2 α , and ATF4 ratios amongst others markers related to this pathway such as BIP (Binding Immunoglobulin Protein), XBP-1s (spliced X Binding Protein), GADD34 (Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein 34) and CHOP (C/EBP Homologous Protein) (Fig 4.4B). In line with this, we observed that GSK2606414 led to the downregulation of Tat-triggered p-eIF2 α /ATF4 axis (Fig 4.4C and 4.4D), further confirming a blockage in PERK downstream signaling led by Tat.

4.4.5 GSK2606414 inhibition of PERK impairs Tat-induced M1 phenotype in BV-2 cells.

Finally, we sought to determine whether PERK signaling is involved in microglial inflammatory state under HIV-1 Tat exposure by hindering PERK deflagration. BV-2 cells were treated with recombinant Tat in presence or absence of GSK2606414, and M1 phenotype markers were assessed as described above. Our experiments revealed that recombinant Tat-induced iNOs gene expression (Fig 4.5A) and the levels of secretion of NO, TNF- α , IL-6 and MCP-1 (Fig 4.5B) were significantly decreased by inhibiting PERK-dependent pathways. Such pharmacological inhibition of PERK was also able to notably reduce expression levels of CD16/32 marker triggered by the use of recombinant Tat in our model (Fig 4.5C and 4.5D). Collectively, these data suggest a potential role of ER stress-related PERK arm in inflammatory effects of Tat in microglial cells.

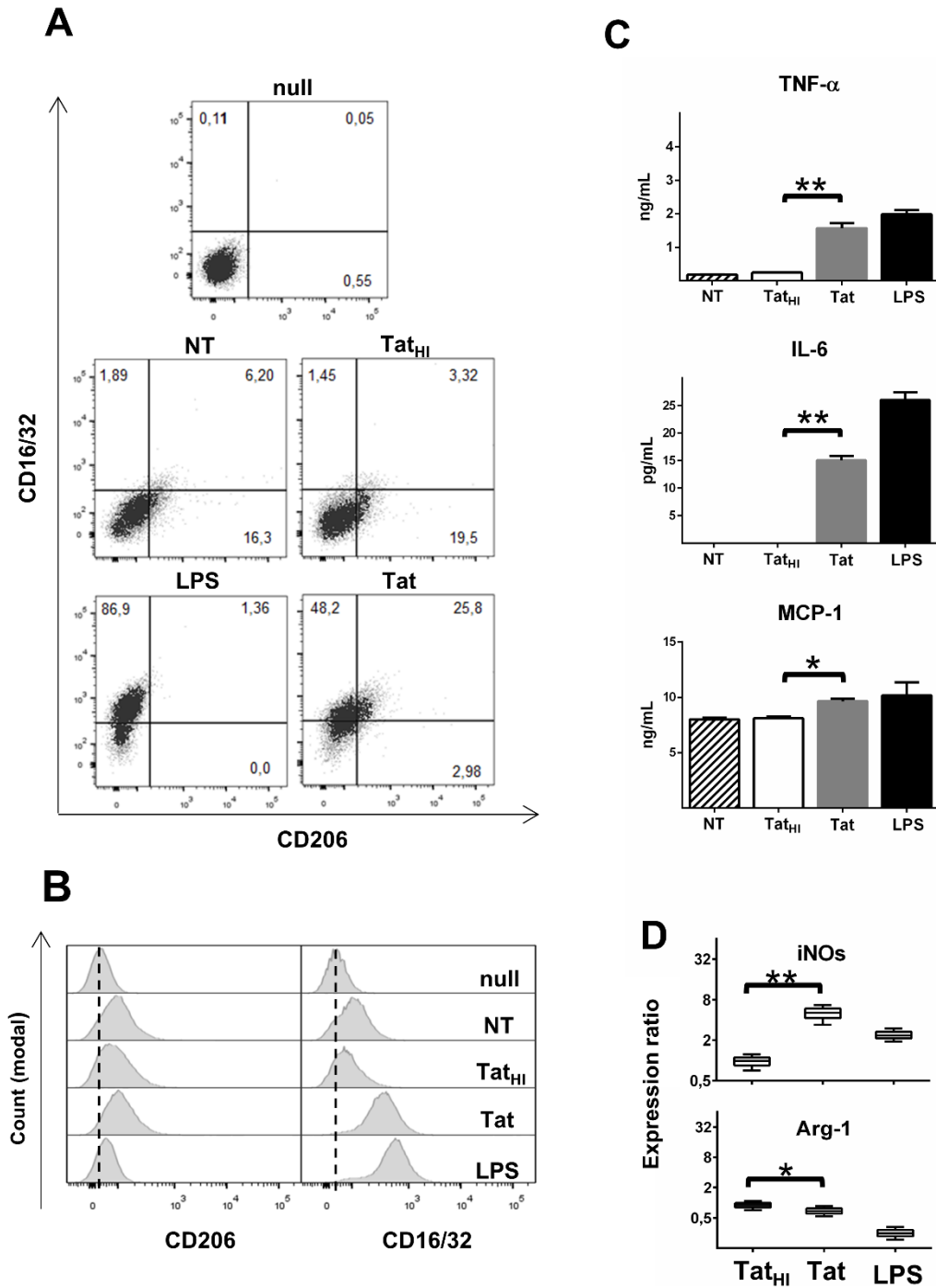


FIGURE 4.2. HIV Tat induces M1 inflammatory phenotype in BV-2 cells. (A) Representative dot plots showing the expression rates of M1/M2 markers CD16/32 and CD206 on BV-2 cells incubated with recombinant 400 nM of Tat for 48 h. (B) Representative histograms showing fluorescence values of M1/M2 markers emitted by BV-2 cells treated with 400 nM of Tat for 48 h. *Null* refers to unmarked cells as controls for flow cytometry assessments (C) Bar graph expressing the levels of secreted TNF- α , IL-6 and MCP-1 of BV-2 cells incubated with Tat (400 nM) for 48 h. Data acquired by CBA. (D) Whisker-box plots showing the iNOs and Arg-1 gene expression of Tat-treated BV-2 cells (400 nM) after 48 h. Data acquired by RT-qPCR and shown as normalized expression ratios. Experimental controls were performed with LPS (1 μ g/mL), heat-inactivated Tat (Tat_{HI}, 400 nM) and untreated cells (NT). The data are representative of three independent experiments. Statistical significance is indicated in relation to heat-inactivated Tat-treated cells ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$).

4.5 DISCUSSION

HIV-1-associated neurocognitive disorders are a growing public health problem. Although an extensive body of research has greatly expanded our knowledge about HIV biology and HAND over the past few decades, these advances have not yet led to effective therapies, largely due to the complex nature of these disorders (IROLLO *et al*, 2017). Among the many cell types in the Central Nervous System (CNS), microglial cells are the ones that can become activated in a broad range of neuroinflammatory conditions. It has been well-recognized that microglial activation cells are the ones that can become activated in a broad range of neuroinflammatory conditions. It has been well-recognized that microglial activation plasticity is strictly stimuli-dependent and ordinarily categorized into two opposite functional status – a classical, pro-inflammatory M1 phenotype and an alternative, M2 phenotype, marked by enhanced expression of genes involved in inflammation resolution, immunomodulation, homeostasis, scavenging, angiogenesis, and wound healing (ORIHUELA *et al*, 2015; GRAZIANO *et al*, 2016). Activated M1 microglia can promote neural dysfunction secondary to infections, exposure to misfolded proteins (as occurs in many neurodegenerative disorders), or CNS injury by secreting a plethora of inflammatory mediators; thus far, most documented evidence for microglia-associated neurodegeneration points to an uncontrolled and prolonged M1-activated state that promotes continuous neuronal damage (DELERY e McLEAN, 2019). As a result, microglial activation and its neurophysiological behavior have emerged as possible targets for neurodegenerative diseases and other CNS impairments.

In relation to HAND, microglia represent a major life-long reservoir of latent HIV-1 which maintains low-level virus replication and CNS accumulation of released viral proteins. Among these, extracellular Tat stands out in HIV-1 neuropathogenesis due in part to its capability to induce increased microglial activation which undermines neuronal cells and, ultimately, contribute to HAND breakthrough (DONG *et al*, 2019). Mechanisms for bystander Tat-induced microglial activation include the modulation of multiple inflammamogenic pathways that settle the release of pro-inflammatory cytokines, chemokines, oxygen-derived cytotoxic factors and

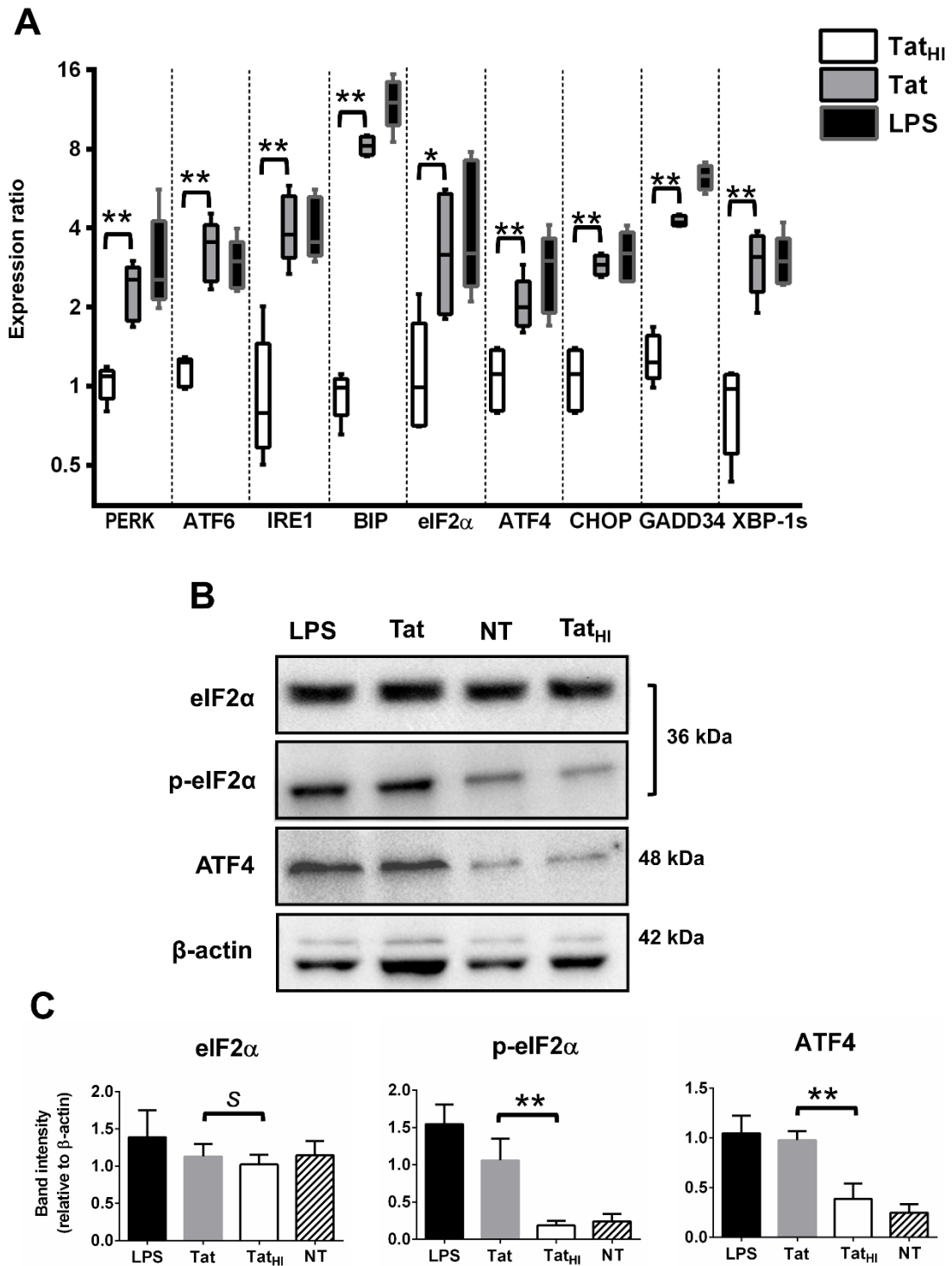


FIGURE 4.3. HIV-Tat upregulates UPR-related molecules in BV-2 cells. (A) BV-2 cells were incubated for 48 h with recombinant Tat (400 nM) and expression profiling of UPR pathway-related genes was assessed by RT-qPCR and displayed as whisker-box plots of normalized expression ratio. (B) Expression of PERK pathway-related proteins of BV-2 cells treated with Tat (400 nM) for 48 h evaluated by Western blot. (C) Bar graph expressing the normalized band intensity values of Western blots as mean \pm SE. Experimental controls were performed with LPS (1 μ g/mL), heat-inactivated Tat (Tat_{HI}, 400 nM) and not treated cells (NT). The data are representative of two or three independent experiments. Statistical significance is indicated in relation to heat-inactivated Tat-treated cells ($p < 0.05^*$, $< 0.01^{**}$, S = not significant).

prostaglandins, disclosing a M1 state (PU et al, 2003; CHIVERO et al, 2017; PERIYASAMY et al, 2019; BORRAJO et al, 2020). Consistent with this, we found that exposure of BV-2 cells to a recombinant Tat up-regulates the neuroinflammatory phenotype markers iNOS, surface CD16/32, and secreted TNF- α , IL-6, MCP-1 and NO, further substantiating an inductive role of Tat towards M1 microglial activation program. Intriguingly, recombinant Tat stimuli did not alter CD206 baseline expression in BV-2 cells, indicating a potential 'wandering' activation status between M1 and M2 phenotypes. This inference is supported by increasing evidence suggesting that microglia activation is a continuous spectrum, instead of the simplistic binary M1, M2 distinction (ORIHUELA et al, 2015). In contrast to M1-polarized microglia, although M2 activated cells solve neuroinflammation, they are not refractory to HIV replication which can result in an endless cycle of resolving and relapsing M1 activation and leading to chronic damage (DELERY e McLEAN, 2019). To this point, Tat-mediated activation of microglial cells could drive an interchangeable, wandering M1/M2 phenotype, which possibly accommodates the fluctuating degeneration rates observed during HAND progression. Unraveling the potential mechanism underlying this would be important in future investigations. At last, the findings presented in our study also demonstrate the successful generation of a HAND-related neuroinflammation model.

In healthy tissue, inflammatory responses are finely tuned and flawlessly effective at restoring homeostasis; once homeostasis is restored, the inflammatory process tends to resolve. For chronic diseases, ER stress may contribute to sustained inflammation, thus obstructing homeostatic mechanisms (GROOTJANS *et al*, 2016). The ER stress response/UPR relies on a highly coordinated and time-regulated machinery involving three parallel signaling cascades using the transmembrane proteins PERK, IRE1 and ATF6 as proximal sensors localized at the ER. Under stress, the ER chaperone BIP dissociates from luminal domains of UPR sensors and triggers their respective branches that conjunctly regulate a subset of stress-responsive genes encoding chaperones and protein-degradation factors. Additional regulatory adaptations include the delay of comprise through PERK-mediated eIF2 α phosphorylation, splicing and activation of transcription factor XBP-1(s), and, in the case of unsuccessful homeostasis recovery, expression of pro-apoptotic mediators such CHOP and its downstream molecule GADD34 (SPRENKLE *et al*, 2017; HETZ e SAXENA, 2017). Importantly, along with this truncated signaling network, UPR initiates

inflammatory pathways via mitogen activated protein kinases (MAPKs) and translocation of the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) and/or activating protein 1 (AP-1). This can further amplify inflammatory responses which, reciprocally, may increase ER burden (CIRONE, 2021). Our experiments demonstrated this ongoing interplay between inflammatory and UPR signalings by showing an increased expression of key UPR-related markers in Tat-activated M1-like BV-2 cells. Specifically, we found the consistent activation of PERK/eIF2 α axis, marked by growing levels of phosphorylated eIF2- α and the consecutive preferential translation of ATF4 - recapitulating previous studies that implicated dysregulated eIF2- α signaling in experimentally HIV-infected microglia and brains of older HIV-positive patients (SOLOMON *et al*, 2019; RYAN *et al*, 2020). It has been suggested that ATF4 plays a defining role in the establishing early stages of HIV-1 infection and its expression may be explored for maintaining viral latency. Because ATF4 can bind to a region on the HIV-1 long terminal repeat (LTR) promoter, its accumulation potentially increases HIV-1 LTR activation and replication synergistically with Tat (CASELLLI *et al*, 2012; JIANG *et al*, 2017). Therefore, we assume that the activation of PERK-eIF2- α induced by Tat uptake could be a bolster strategy to hijack ATF4 signaling in microglia for HIV-1 replication and facilitating CNS infection.

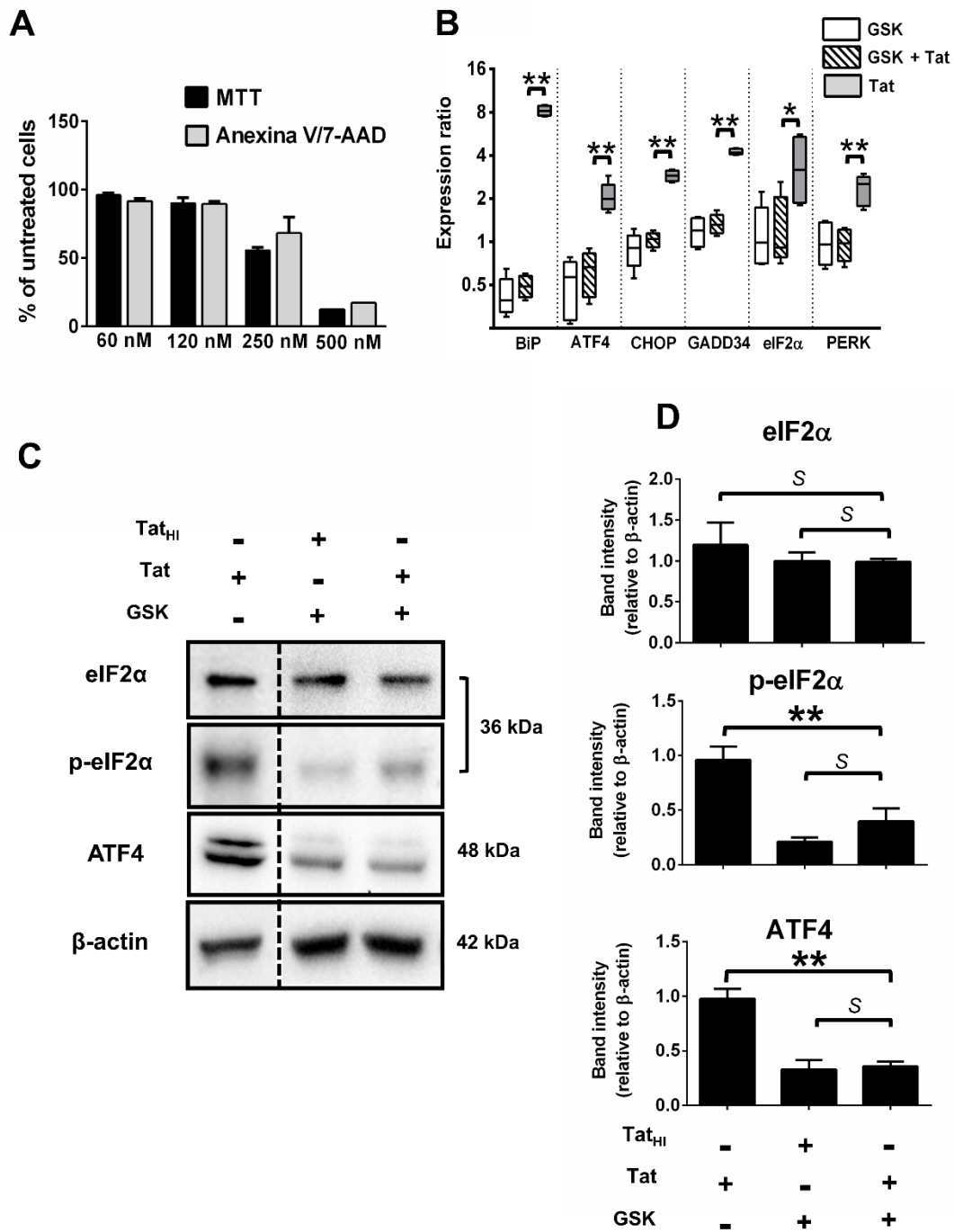


FIGURE 4.4. Pharmacological inhibition of PERK downregulates the Tat-induced ER stress in BV-2 cells. (A) BV-2 cells were incubated with or without increasing concentrations of the pharmacological PERK-specific inhibitor GSK2606414 for 48 h and the cell viability and apoptotic rates were assessed by MTT and 7-AAD/Anexin V protocols, respectively. (B) BV-2 cells were incubated for 48 h with recombinant Tat (400 nM) with or without GSK2606414 (GSK, 120 nM), and expression profiling of PERK pathway-related genes was assessed by RT-qPCR and displayed as whisker-box plots of normalized expression ratio. (C) Expression of PERK pathway-related proteins of Tat-treated BV-2 cells (400 nM) with or without GSK2606414 (GSK, 120 nM) for 48 h evaluated by Western blotting. The figure was prepared from different fields of same western blot images and this editing is indicated by the dotted line. (D) Bar graph showing the normalized band intensity values of Western blottings as mean \pm SE. Experimental controls were performed with heat-inactivated Tat (Tat_{HI}, 400 nM) and untreated cells (NT). The data are representative of two or three independent experiments. Statistical significance is indicated in relation to Tat-treated or heat-inactivated Tat-treated cells ($p < 0.05^*$, $< 0.01^{**}$, S = not significant).

Given the compelling evidence for PERK- eIF2 α -ATF4 signaling as a central node that couples ER stress and inflammatory responses, its activation has been investigated and implicated in several neuroinflammatory disorders. As a consequence, PERK has become the most studied UPR target for the development of pharmacological interventions aimed at suppressing stress-mediated inflammation and neurodegeneration. GSK2606414, a selective PERK inhibitor, is a highly specific compound that can cross the blood-brain barrier and has been extensively used as a pharmacological approach to assess the role of PERK-related neurodegeneration in several disease models. In an *in vivo* modeling of prion disease, pharmacological PERK inhibition using GSK2606414 at early stages rescued neurodegeneration and reversed behavioral abnormalities observed using a novel object recognition test and burrowing activity (MORENO *et al*, 2013). Similarly, GSK2606414-mediated PERK inhibition prevented substantia nigra degeneration in a toxin-induced Parkinson disease in mice (MERCADO *et al*, 2018). A previous report demonstrates GSK2606414 treatment suppressed the expression of inflammatory genes in ER-stressed astrocytes, as well as blocking UPR-induced molecules (GUTHRIE *et al*, 2016). This study also shows that PERK inhibition can modulate astrocyte-microglia interactions, attenuating the pro-inflammatory microglial phenotype promoted by ER-stressed astrocytes without impinging on UPR-dependent survival and adaptive responses. Here, we show that GSK2606414 blockage of PERK in BV-2 microglial cells reduces inflammatory and ER stress factors associated with bystander Tat-evoked activation. Although the mode by which PERK inhibition directly relieves microglial M1 state over Tat exposure remains not elucidated, we postulate that impaired eIF2- α phosphorylation enables the translation of homeostatic restoring players, while suppressing ER stress signaling to overcome inflammation. For instance, hindering of PERK-eIF2 α could lead to translational rescue of I κ α , a key regulator of NF- κ B, and suppress the activation mediated by Tat and the downstream inflammatory pathways (BOND *et al*, 2020). Moreover, PERK-dependent pathways that are attenuated by genomic ablation of PERK, leading to reduced inflammatory gene expression, appear to involve eIF2 α -dependent translational repression (SHRESTHA *et al*, 2012). This statement is still consistent with previous studies indicating that at least IL-6 and some pro-inflammatory chemokines expression are reliant on both Janus Kinase-1 and translational repression in response to ER stress

on glial cells (GUTHRIE *et al*, 2016). In addition, it is also noteworthy that PERK-triggered ATF4 may act to induce the synthesis of pro-inflammatory cytokines independently of PERK besides regulating cellular redox states (LEE *et al*, 2018). This could mean that the upstream disruption caused by GSK2606414 could aid in reducing Tat-induced ER stress-linked inflammatory responses. To some extent, these mentioned pathways could be working in concert with each other to trigger an ER stress-driven M1 program that is subjected to translational modulation by PERK-eIF2 α .

In summary, our *in vitro* findings highlight the cross-talk phenotype of ER stress and inflammation on microglia as a result of circulant Tat stimuli. This study also indicates that pharmacological inhibition of PERK could provide a platform for the development of novel strategies to reduce lasting neuroinflammation and neuronal loss in HIV-1-positive individuals. Future investigations might address outstanding issues over the neurophysiological significance of UPR signaling mechanisms and their immunoregulation role in mediating HAND.

4.6 ACKNOWLEDGMENTS

We would like to express our gratitude to Dr. Gislaine Fongaro, Dr. Maristela M. Camargo, Dr. Oscar B. Romero, and Dr. Rafael D. da Rosa and Dr. Oscar B. Romero for providing reagents and equipments, and LabMMass/CEBIME (Laboratório Multiusuário de Espectrometria de Massas/Centro de Biologia Molecular Estrutural) and LAMEB/UFSC (Laroratório Multiusuário de Estudos em Biologia/Universidade Federal de Santa Catarina) for, respectively, mass spectrometry and cell cytometry analysis.

4.7 AUTHORS CONTRIBUTIONS

D.B.S. designed the study, performed experimental investigation, analyzed the data, and wrote the manuscript. M.F.A. performed experimental investigation. N.P.F and H.T assisted in experimental investigation, protein data analysing and resources providing. A.R.P designed the study, supervised the work and revised the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

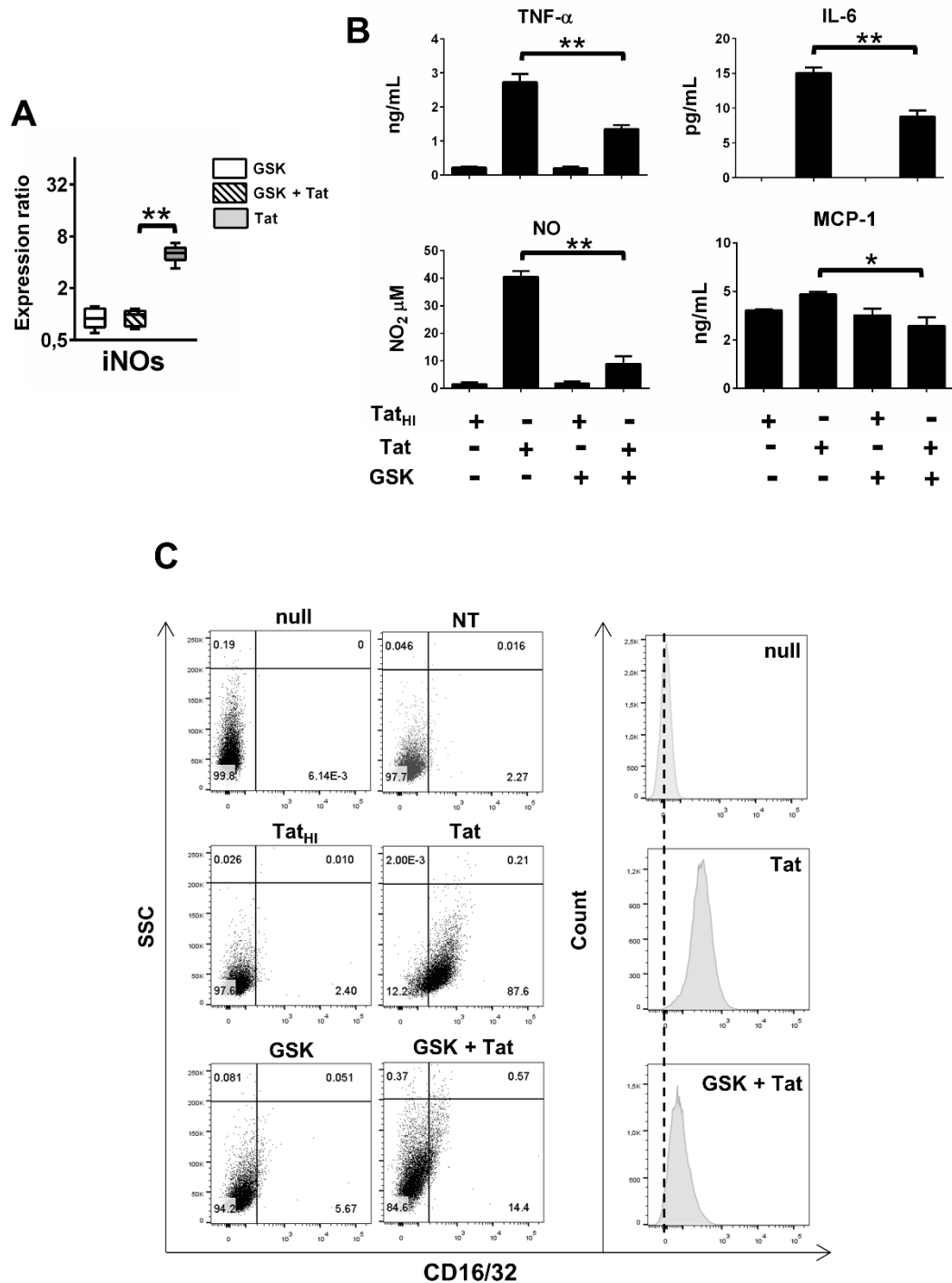


FIGURE 4.5. Pharmacological inhibition of PERK attenuates the Tat-induced M1 phenotype in BV-2 cells. (A) Tat-treated BV-2 cells (400 nM) were incubated with or without GSK2606414 (GSK, 120 nM) for 48 h and the iNOs gene expression was assessed by RT-qPCR and displayed as normalized expression ratio. (B) Bar graphs show the levels of secreted TNF- α , IL-6, NO and MCP-1 of BV-2 cells incubated with recombinant Tat (400 nM) with or without GSK2606414 (GSK, 120 nM) for 48 h. Data acquired by CBA or Griess assay. (C) Flow cytometry analysis of BV-2 cells incubated with recombinant Tat (400 nM) with or without GSK2606414 (GSK, 120 nM) for 48 h and labeled with CD16/32. Expression rates (dot plots) and fluorescence measurements (histograms) are displayed. *Null* refers to unmarked cell control for flow cytometry assessments. Experimental controls were performed with heat-inactivated Tat (Tat_{HI}, 400 nM) and untreated cells (NT). The data are representative of three independent experiments. Statistical significance is indicated in relation to Tat-treated cells ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$).

4.8 REFERENCES

BOND, Sarah; LOPEZ-LLOREDA, Cláudia; GANNON, Patrick; et al. The integrated stress response and phosphorylated Eukaryotic Initiation Factor 2 α in neurodegeneration. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, v. 79, n. 2, p. 123-143, 8 janeiro 2020. Disponível em ><http://doi:10.1093/jnen/nlz129>>.

BORRAJO, Ana; PENEDO, Maria Aranzázu; OLIVARES, Jose Manuel; AGÍS-BALBOA, Roberto Carlos. Important role of microglia in HIV-1 associated neurocognitive disorders and the molecular pathways implicated in its pathogenesis, *Annals of Medicine*, v. 53, n. 1, p. 43-69, 17 setembro 2020. Disponível em: <<http://doi:10.1080/07853890.2020.1814962>>.

CAO, Stewart Syan; LUO, Katherine, SHI, Lynn. Endoplasmic Reticulum Stress interacts with inflammation in Human Diseases. *Journal of Cell Physiology*, v. 231, n. 2, p. 288-294, 22 julho 2015. Disponível em: <<http://doi:10.1002/jcp.25098>>.

CAMPESTRINI, Jéssica; SILVEIRA, Douglas Bardini; PINTO, Aguinaldo Roberto. HIV-1 Tat-induced bystander apoptosis in Jurkat cells involves unfolded protein responses. *Cell Biochemistry and Function*, v. 36, n. 7, p. 377-386, 24 setembro 2018. Disponível em: <<http://doi:10.1002/cbf.3357>>.

CASELLI, Elisabetta et al. Activating transcription factor 4 (ATF4) promotes HIV-1 activation. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v. 28, n.8, p. 907-912, 20 jul 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/aid.2011.0252>>.

CHIVERO, E. T.; GUO, M.-L.; PERIYASAMY, P.; LIAO, K.; CALLEN, S. E.; BUCH, S. HIV-1 Tat Primes and Activates Microglial NLRP3 Inflammasome-Mediated Neuroinflammation. *The Journal of Neuroscience*, [s. l.], v. 37, n. 13, p. 3599–3609, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3045-16.2017>>.

CIRONE, Mara. ER Stress, UPR Activation and the Inflammatory Response to Viral Infection. *Viruses*, v. 13, n. 5, p. 798, 29 abril 2021. Disponível em: <<http://doi:10.3390/v13050798>>.

DELERY, Elizabeth; MACLEAN, Andrew. Chronic Viral Neuroinflammation: Speculation on Underlying Mechanisms. *Viral Immunology*, v. 32, n. 1, p. 55-62, fevereiro 2019. Disponível em: <<http://doi:10.1089/vim.2018.0093>>.

DONG Huaqian; YE Xiang; ZHONG, Ling; et al. Role of FOXO3 Activated by HIV-1 Tat in HIV-Associated Neurocognitive Disorder Neuronal Apoptosis. *Frontiers in Neuroscience*, v. 13, 4 fevereiro de 2019. Disponível em: <<http://doi:10.3389/fnins.2019.00044>>.

FITTIPALDI, Antonio; GIACCA, Mauro. Transcellular protein transduction using the Tat protein of HIV-1. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, n. 4, p. 597-608, 25 janeiro 2005. Disponível em: <<http://doi:10.1016/j.addr.2004.10.011>>. SAYLOR, Deanna; DICKENS, Alex; SAKTOR, Ned, et al. HIV-associated neurocognitive disorder – pathogenesis and prospects for treatment. *Nature Reviews Neurology*, v.

2, n. 4, p. 234-248. 11 março 2016. Disponível em: <<http://doi:10.1038/nrneurol.2016.27>>.

GRAZIANO, Francesca; VICENZI, Elisa; POLI, Guido. Plastic Restriction of HIV-1 Replication in Human Macrophages Derived from M1/M2 Polarized Monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 100, n. 5, p. 1147–1153, 30 jun. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1189/jlb.4AB0316-158R>>.

GRESA-ARRIBAS, Núria; VIÉITEZ, Cristina; DENTESANO, Guido; SERRATOSA, Joan; et al. Modelling Neuroinflammation In Vitro: A Tool to Test the Potential Neuroprotective Effect of Anti-Inflammatory Agents. Tansey MG, ed. *PLoS ONE*. 2012;7(9):e45227. doi:10.1371/journal.pone.0045227.

GROOTJANS, Joep; KASER, Arthur; KAUFMAN, Randal; et al. The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 16, n. 8, p. 469-484, 27 junho 2016. Disponível em: <<http://doi:10.1038/nri.2016.62>>.

GUTHRIE, Lauren; ABIRAMAN, Kavitha; PLYER, Emily; et al. Attenuation of PKR-like ER Kinase (PERK) Signaling Selectively Controls Endoplasmic Reticulum Stress-induced Inflammation Without Compromising Immunological Responses. *Journal of Biological Chemistry*, v. 291, n. 30, p. 15830-15840, 22 julho 2016. Disponível em: <<http://doi:10.1074/jbc.m116.738021>>.

HETZ, Cláudio; SAXENA, Smita. ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration. *Nature Reviews Neurology*, v. 13, n. 8, p. 477-491, 21 julho 2017. Disponível em: <<http://doi:10.1038/nrneurol.2017.99>>.

HUGHES, Daniel; MALLUCCI, Giovanna. The unfolded protein response in neurodegenerative disorders - therapeutic modulation of the PERK pathway. *FEBS Journal*, v. 286, n. 2, p. 342-355, 24 fevereiro 2018. Disponível em: <<http://doi:10.1111/febs.14422>>.

IROLLO, Elena; LUCHETTA, Jared; HO, Chunta, et al. Mechanisms of neuronal dysfunction in HIV-associated neurocognitive disorders. *Cellular and Molecular Life Science*, v. 78, p. 4283–4303, 14 jan 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00018-021-03785-y>>.

JABLONSKI, Kyle; AMICI, Stephany; WEBB, Lindsay; et al. Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. *Plos One*, v. 10, n. 12, 23 dezembro 2015. Disponível em: <<http://doi:10.1371/journal.pone.0145342>>.

JIANG, Guochun; SANTOS ROCHA, Clarissa; HIRAO, Lauren; et al. HIV Exploits Antiviral Host Innate GCN2-ATF4 Signaling for Establishing Viral Replication Early in Infection. *American Society of Microbiology Journals*, v. 8, n. 3, 27 maio 2017. Disponível em: <<http://doi:10.1128/mbio.01518-16>>.

LEE, Seong-Deok; YU, Kiung-Lee; PARK, Seong-Hun; JUNG, Yu-Mi; et al. Understanding of the functional role(s) of the Activating Transcription Factor 4(ATF4) in HIV regulation and production. *BMB Reports*, v. 51, n. 8, p. 388-393, 31 agosto 2018. Disponível em: <<http://doi:10.5483/bmbrep.2018.51.8.054>>.

LI, Wenxue; LI, Guanhan; STEINER, Joseph; NATH, Avindra. Role of Tat Protein in HIV Neuropathogenesis. *Neurotoxicity Research*, v. 16, n. 3, p. 205-220, 21 março 2009. Disponível em: <<http://doi:10.1007/s12640-009-9047-8>>.

MARINO, Jamie; MAUBERT, Monique; MELE, Anthony; SPECTOR, Cassandra; WIGDAHL, Brian; et al. Functional impact of HIV-1 Tat on cells of the CNS and its role in HAND. *Cellular and Molecular Life Science*, v. 77, n. 24, p. 5079-5099, 23 junho 2020. Disponível em: <<http://doi:10.1007/s00018-020-03561-4>>.

MARINO, Jamie; WIGDAHL, Brian. Nonnemacher MR. Extracellular HIV-1 Tat Mediates Increased Glutamate in the CNS Leading to Onset of Senescence and Progression of HAND. *Frontiers in Aging Neuroscience*, v. 12, 9 junho 2020. Disponível em: <<http://doi:10.3389/fnagi.2020.00168>>.

MERCADO, Gabriela; CASTILHO, Valentina; SOTO, Paulina; et al. Targeting PERK signaling with the small molecule GSK2606414 prevents neurodegeneration in a model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, v. 112, p. 136-148, abril 2018. Disponível em: <<http://doi:10.1016/j.nbd.2018.01.004>>.

MORENO, Julie; HALLIDAY, Mark; MOLLOY, Colin; et al. Oral Treatment Targeting the Unfolded Protein Response Prevents Neurodegeneration and Clinical Disease in Prion-Infected Mice. *Science Translational Medicine*, v. 5, n. 206, 9 outubro 2013. Disponível em: <<http://doi:10.1126/scitranslmed.3006767>>.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 16 dezembro 1983. Disponível em: <[http://doi:10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4)>.

ORIHUELA, Ruben; MCPHERSON, Christopher A; HARRY, Gaylia Jean. Microglial M1/M2 Polarization and Metabolic States. *British Journal of Pharmacology*, v. 173, n. 4, p. 649–665, 11 maio 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/bph.13139>>.

PERIYASAMY, Palsamy; THANGARAJ, Annadurai; BENDI, Venkata; et al. HIV-1 Tat-mediated microglial inflammation involves a novel miRNA-34a-NLRC5-NFκB signaling axis. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 80, p. 227-237, agosto 2019. Disponível em: <<http://doi:10.1016/j.bbi.2019.03.011>>.

PU, Hong; TIAN, Jing; FLORA, Govinder, et al. HIV-1 tat protein upregulates inflammatory mediators and induces monocyte invasion into the brain. *Molecular and Cellular Neuroscience*, v. 24, n. 1, p. 224-237, setembro 2003. Disponível em: <[http://doi:10.1016/s1044-7431\(03\)00171-4](http://doi:10.1016/s1044-7431(03)00171-4)>.

RYAN, Sean; GONZALEZ, Michel; GARIFALLOU, James; et al. Neuroinflammation and EIF2 Signaling Persist despite Antiretroviral Treatment in an hiPSC Tri-culture Model of HIV Infection. *Stem Cell Reports*, v. 14, n. 4, p. 703-716, 14 abril 2020. Disponível em: <<http://doi:10.1016/j.stemcr.2020.02.010>>.

SAIYED, Zainulabedin; GANDHI, Nimisha; AGUDELO, Marisela, et al. HIV-1 Tat upregulates expression of histone deacetylase-2 (HDAC2) in human neurons: Implication for HIV-associated neurocognitive disorder (HAND). *Neurochemistry International*, v. 58, n. 6, p. 656-664, 17 fevereiro 2011. Disponível em: <<http://doi:10.1016/j.neuint.2011.02.004>>.

SIDDAPPA, Nagadenahalli; VENKATRAMANAN, Mohanram; VENKATESH, Prasanna, et al. *Retrovirology*, v. 3, n. 1, p. 53, 18 agosto 2006. Disponível em: <<http://doi:10.1186/1742-4690-3-53>>.

SHRESTHA, Niraj; BAHNAN, Wael; WILEY, DAVID; BARBER, Glen; et al. Eukaryotic Initiation Factor 2 (eIF2) Signaling Regulates Proinflammatory Cytokine Expression and Bacterial Invasion. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 34, p. 28738-28744, 17 agosto 2012. Disponível em <<http://doi:10.1074/jbc.m112.375915>>.

SMAIL, Ruadhi Cameron; BREW, Bruce James. HIV-associated neurocognitive disorder. *Handbook of Clinical Neurology*, v. 152, p. 75-97, 2018. Disponível em: <<http://doi:10.1016/b978-0-444-63849-6.00007-4>>.

SOLOMON, Issac; CHETTIMADA, Sukruta; MISRA, Vikas; et al. White Matter Abnormalities Linked to Interferon, Stress Response, and Energy Metabolism Gene Expression Changes in Older HIV-Positive Patients on Antiretroviral Therapy. *Molecular Neurobiology*, v. 57, n. 2, p. 1115-1130, fevereiro 2020. Disponível em: <<http://doi:10.1007/s12035-019-01795-3>>.

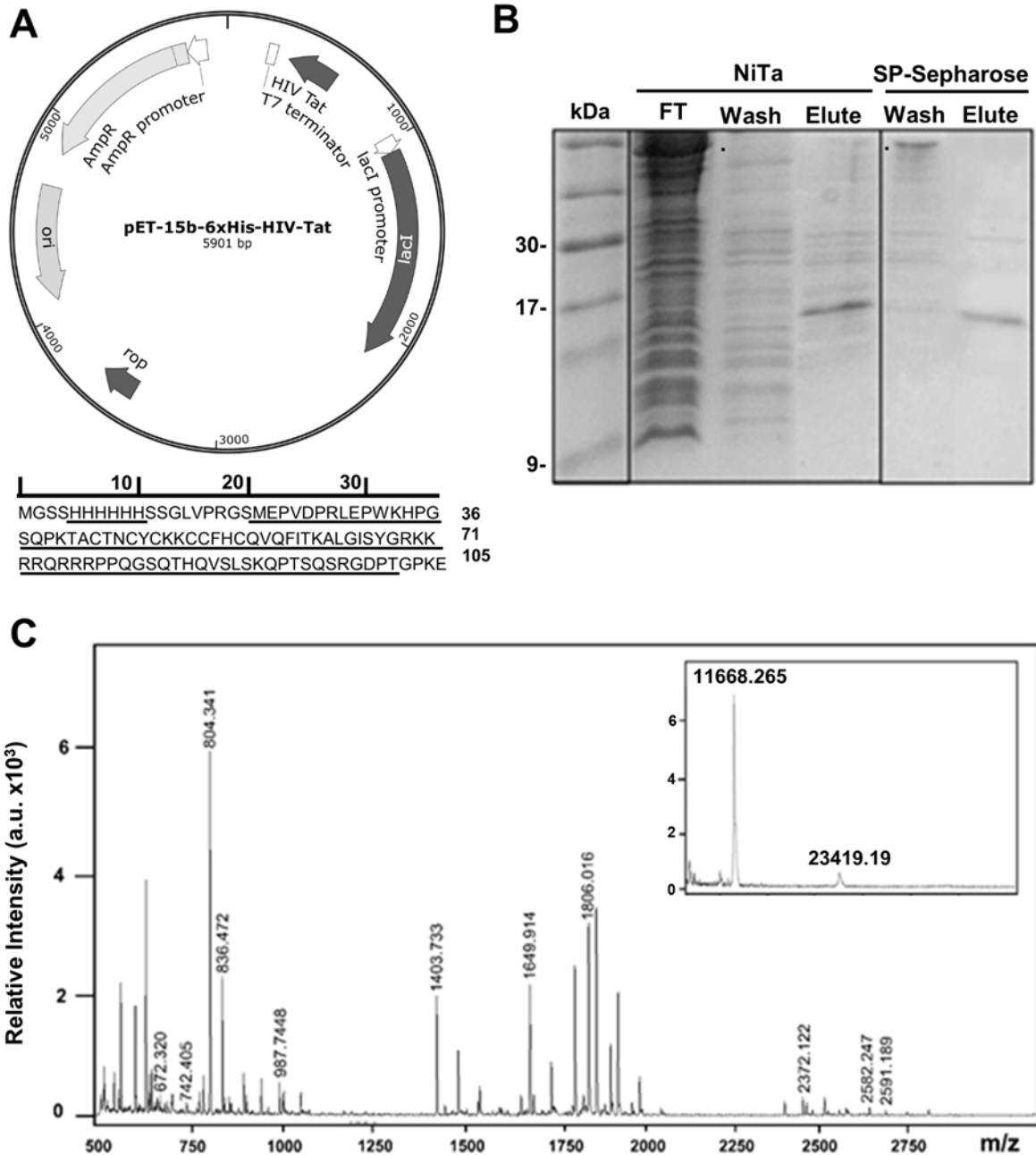
SPRENKLE, Neil; SIMS, Savannah; SÁNCHEZ, Cristina; MEARES, Gordon. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in the central nervous system. *Molecular Neurodegeneration*, v. 12, n. 1, 25 maio 2017. Disponível em: <<http://doi:10.1186/s13024-017-0183-y>>.

THANGARAJ, Annadurai; PERYASAMY, Palsamy; LIAO, Ke; BENDI, Venkata; et al. HIV-1 TAT-mediated microglial activation: role of mitochondrial dysfunction and defective mitophagy. *Autophagy*, v. 14, n. 9, p. 1596-1619, 26 julho 2018. Disponível em: <<http://doi:10.1080/15548627.2018.1476810>>.

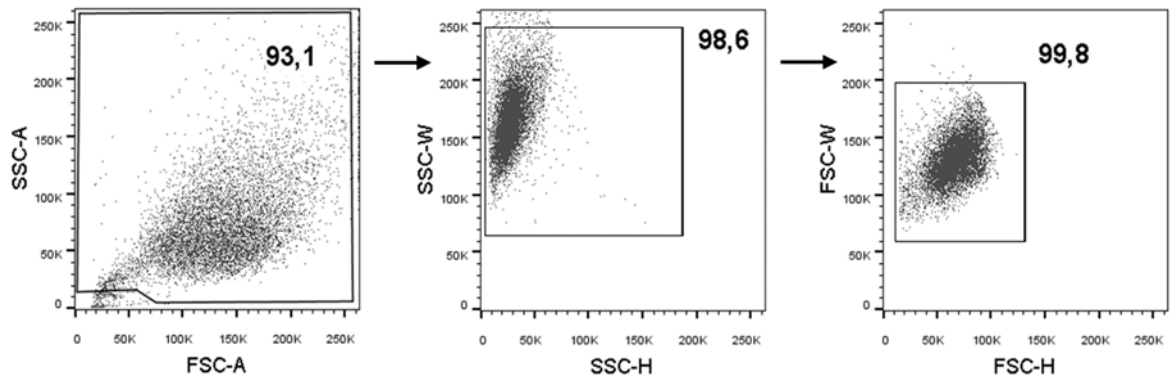
VANDERSOMPELE, Jo; DE PRETER, Katleen; PATTYN, Filip; et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, v. 3, n. 7, 18 junho 2002. Disponível em: <<http://doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034>>.

WU, Xiaoyan; DONG, Huaqian; YE, Xiang; et al. HIV-1 Tat increases BAG3 via NF- κ B signaling to induce autophagy during HIV-associated neurocognitive disorder. *Cell Cycle*, v. 17, n. 13, p. 1614-1623, 21 agosto 2018. Disponível em: <<http://doi:10.1080/15384101.2018.1480219>>.

4.9 SUPPORTING INFORMATION



SUPPLEMENTARY FIGURE 1. Expression, purification, and characterization of recombinant HIV-Tat. (A) Supplementary Figure 1. Map of HIV Tat-expressing vector pET-15b used in the study. Representation of the expressed gene underlining the affinity motif (6xHis) and the predicted sequence of Tat BH10 (86 aa.). (B) SDS-PAGE analysis of purified recombinant Tat. Transformed E.coli BL21(DE3) cells expressing Tat were lysed and soluble fractions subjected to successive purifications by Ni-NTA and SP-Sepharose chromatographies. FT refers to crude fraction flowing through. (C) MALDI mass spectrum of recombinant Tat. Final elution of purified recombinant Tat was subjected to MALDI-TOF analysis (inner frame). Purified recombinant Tat was digested by trypsin and resulting peptides assessed by MALDI-MS/MS (Peptide mass fingerprint, wide frame).



SUPPORTING FIGURE 2. Flow cytometry gating strategy for BV-2 cells. Gating strategy for both apoptosis (7-AAD/Anexin V staining) and M1/M2 markers expression. (anti-CD16/32 and anti-CD206 labeling) based on FSC and SSC parameters to cellular debris and aggregates exclusion.

SUPPORTING TABLE 1. Matched peptide residues of recombinant Tat through MALDI-MS/MS - Peptide Mass Fingerprint*.

Peak	Observed M/z	Calculated M/z	Position	Peptide Sequence
1	672.320	672.372	23-27	LEPWK
2	742.405	743.475	66-70	KRRQR
3	804.341	803.401	87-93	QPTSQSR
4	836.472	836.462	57-64	ALGISYGR
5	987.448	987.456	14-22	GSMEPVDPR
6	1403.733	1403.743	23-24	LEPWKHPGSQPK
7	1649.914	1649.872	72-86	RPPQGSQTHQVLSK
8	1806.016	1805.973	71-86	RRPPQGSQTHQVLSK
9	2372.122	2372.182	14-34	GSMEPVDPRLEPWKHPGSQPK
10	2548.247	2547.060	35-56	TACTNCYCKKCCFHCQVCFITK
11	2591.189	2590.356	71-93	RRPPQGSQTHQVLSKQPTSQR

*78,2% of coverage (MASCOT, $p < 0,05$).

SUPPORTING TABLE 2. Primers used to assess the relative expression of ER stress- and M1/M2-related target genes by RT-qPCR.

Gene	Sequences (5' - 3')	NCBI Refseq	Amplicon	Ref.
PERK	<i>Fw.</i> CTTTTCCATCCTCAGCCCC <i>Rv.</i> AAGACAACGCCAAAGCCACC	NM_010121.3	198 bp	**
ATF6	<i>Fw.</i> ATAGCCAACAGAAAGCCCGC <i>Rv.</i> TTGCAGCTCACTCCCAGA	NM_001081304.1	122 bp	**
EIF2 α	<i>Fw.</i> GTCTCAGACCCATCTATCTTGG <i>Rv.</i> CCTCAGGGCTTCTTTTACAGC	NM_026114.3	171 bp	**
XBP1-s	<i>Fw.</i> ACACGCTTGGGAATGGACAC <i>Rv.</i> CCATGGGAAGATGTTCTGGG	NM_001271730.1	145 bp	Kim <i>et al.</i>
XBP1-u	<i>Fw.</i> TCCGCAGCACTCAGACTATGT <i>Rv.</i> ATGCCCAAAGGATATCAGACTC	NM_013842.3	130 bp	Tsuchiya <i>et al.</i>
BIP	<i>Fw.</i> GCTTCGTGTCTCCTCCTGAC <i>Rv.</i> TAGGAGTCCAGCAACAGGCT	NM_022310.3	93 bp	Sowers <i>et al.</i>
ATF4	<i>Fw.</i> TGAGGCTCTGAAAGAGAAGGCAGA <i>Rv.</i> AGCACAAAGCACCTGACTACCCTA	NM_009716.3	154 bp	Juknat <i>et al.</i>
CHOP	<i>Fw.</i> AGCGACAGAGCCAGAATAAC <i>Rv.</i> CAGGTTCTGCTTTCAGGTGTGG	NM_007837.4	95 bp	**
GADD34	<i>Fw.</i> AGGACCCCGAGATTCCTCTA <i>Rv.</i> AGGTAGGGACCCAGCTTCTC	NM_008654.2	187 bp	Ito <i>et al.</i>
Arg-1	<i>Fw.</i> CACAGTCTGGCAGTTGGAAG <i>Rv.</i> GGGAGTGTGATGTCAGTGTG	NM_007482.3	96 bp	McCarthy <i>et al.</i>
iNOS	<i>Fw.</i> GTTCTCAGCCCAACAATAACAAGA <i>Rv.</i> GTGGACGGGTCGATGTCAC	NM_010927.4	127 bp	McCarthy <i>et al.</i>
GAPDH*	<i>Fw.</i> CATCACTGCCACCCAGAAGACTG <i>Rv.</i> ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG	XM_017321385.1	153 bp	**
HPRT*	<i>Fw.</i> GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG <i>Rv.</i> GATTCAACTTGCGCTCATCTTAGGC	NM_013556.2	163 bp	***

Fw. Forward; Rv. Reverse. . *Reference genes for normalization of expression data. **Primers designed for the current study. ***Primers kindly provided by Laboratório de Imunofarmacologia e Doenças Infecciosas (LIDI) of Universidade Federal de Santa Catarina

4.9.1 Supporting Information References

ITO, Sachiko; TANAKA, Yuriko; OSHINO, Reina; *et al.* GADD34 inhibits activation-induced apoptosis of macrophages through enhancement of autophagy. *Scientific Reports*, v. 5, n. 1, 9 fevereiro 2015. Disponível em: <<http://doi:10.1038/srep08327>>.

JUKNAT, Ana; PIETR, Maciel; KOZELA, Ewa; *et al.* Differential transcriptional profiles mediated by exposure to the cannabinoids cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol in BV-2 microglial cells. *British Journal of Pharmacology*, v. 165, n. 8, p. 2512-2528 abril 2012. Disponível em: <<http://doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01461.x>>.

KIM, Kim Rosa S; HASEGAWA, Daisuke; Goossens, Nicolas, *et al.* The XBP1 Arm of the Unfolded Protein Response Induces Fibrogenic Activity in Hepatic Stellate Cells

Through Autophagy. *Scientific Reports*, v.6, n.1, 20 dezembro 2016. Disponível em: <<http://doi:10.1038/srep39342>>.

McCARTHY, Ryan; LU, Dah-Yuu; ALKHATEEB, Ahmed; *et al.* Characterization of a novel adult murine immortalized microglial cell line and its activation by amyloid-beta. *Journal of Neuroinflammation*, v. 13, n. 1, 27 janeiro 2016. Disponível em <<http://doi:10.1186/s12974-016-0484-z>>.

SOWERS, Carrie; WANG, Rong; BOURNE, Rebecca, *et al.* The protein kinase PERK/EIF2AK3 regulates proinsulin processing not via protein synthesis but by controlling endoplasmic reticulum chaperones. *Journal of Biological Chemistry*, v. 293, n. 14, p. 5134-5149, 14 fevereiro 2018. Disponível em: <<http://doi:10.1074/jbc.m117.813790>>.

TSUCHIYAT, M. TYE, C.E; SHARMA, R; SMITH, C.E; BARTLETT, J.D. XBP1 May Determine the Size of the Ameloblast Endoplasmic Reticulum. *Journal of Dental Research*. V. 87, n. 11, p.1058-1062, 1 novembro 2008. Disponível em: <<http://doi:10.1177/154405910808701115>>.

5. CAPÍTULO 4

INHIBITING IRE-1 RNASE SIGNALING DECREASES HIV-1 TAT-INDUCED INFLAMMATORY M1 STATE IN MICROGLIAL CELLS

Artigo submetido ao periódico *Cellular and Molecular Neurovirology*. SILVEIRA, Douglas Bardini; AMÉRICO, Monique Ferrary; TERENCE, Hernán; PINTO, Aguinaldo Roberto. Inhibiting IRE-1 RNase signaling decreases HIV-1 Tat-induced inflammatory M1 state in microglial cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*. *No Prelo*, 2022

5.1 ABSTRACT

HIV-1 transactivator (Tat) protein plays a critical role in neurological disorders manifestations resulting from the viral infection, commonly known as named as HIV-1-associated neurocognitive disorders (HAND). Previous studies have shown that It has been demonstrated that circulant Tat induces M1 microglial activation, one of the hallmark features of HAND, and this is which is coupled with ER stress and subsequent Unfolded Protein Response (UPR) deflagration. Here, we demonstrate that bystander stimuli of Tat in microglial cells result in the simultaneous coupled the overexpression of IRE1-related markers and production of M1-typed pro-inflammatory mediators. We also show that blocking IRE1/XBP-1 signaling using 4 μ 8C diminishes such inflammatory response. These findings reinforce a role for the of IRE1/XBP-1 pathway in HIV-1 neuropathology and suggest that targeting IRE1 RNase activity using targeting by 4 μ 8C or analogue compounds may provide a therapeutic intervention to mitigate against neuroinflammation in HAND.

Keywords: HIV-1 Tat; ER stress; IRE1; XBP-1; HAND; Microglia.

5.2 INTRODUCTION

The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) trans-activator (Tat) protein is a key mediator involved in the development of HIV-1-associated neurocognitive disorders (HAND). Extracellular Tat is biologically active and continually secreted from infected cells even under antiretroviral therapy (SAYIED *et al*, 2011; DONG *et al*, 2029; MARINO *et al*, 2020). Once circulating, Tat is able to enter the central nervous system (CNS) and can interact with a broad range of cell types leading to dysregulated gene expression, chronic cell activation, inflammation, neurotoxicity, and structural brain

damage (Xu *et al*, 2018; CAMPESTRINI *et al*, 2018; MARINO *et al*, 2020b; SILVEIRA *et al*, 2022). In microglial cells, the immune ‘arm’ of the CNS immune, Tat can drive their transition from a wound healing, neuroprotective M2 microglial phenotype to an inflammatory M1 state characterized by overexpression of neuroinflammation mediators and co-stimulatory surface proteins (TANG *et al*, 2016; BORRAJO *et al*, 2021). Increased M1-like microglia is consistent with high levels of neurodegeneration observed in people living with HIV-1 and may potentially play a central role in the pathophysiology of HAND (BORRAJO *et al*, 2021).

Most neurodegenerative disorders, regardless of what triggered them started the process, could conceivably be viewed as arising from defective protein folding and chronic impairment of endoplasmic reticulum (ER) homeostasis. Perturbations in the ER folding environment elicit a coordinated molecular response that involves several adaptive pathways, commonly termed unfolded protein response (UPR; HETZ *et al*, 2020), which likely has a critical role in HIV-associated neurodegeneration (SPRENKLE *et al*, 2017; TORKZABAN *et al*, 2020; CHEN *et al*, 2020). The UPR is canonically mediated by ER-transmembrane proteins, among which the Inositol-Requiring Enzyme 1 (IRE1) its most conserved branch. IRE1 senses disturbances in ER homeostasis via its luminal domain, resulting in a conformational change and activation of both its cytoplasmic protein kinase and its RNase domain. In turn, IRE1 activation leads to cleavage and subsequent ligation of the mRNA encoding the X-box binding protein-1 (XBP1), bringing on the synthesis of a truncated and transcriptionally active spliced form of XBP1 (XBP1s; BASHIR *et al*, 2021). In an attempt to relieve ER stress, XBP1s enhances the transcription of a genes that facilitate subset important in facilitating protein folding. IRE1 RNase also can cleave ER-localized mRNAs at a consensus site that is similar to the one found in XBP-1 splicing which limits for diminishing protein translation, in a later adaptative mechanism termed “regulated IRE1-dependent decay” (RIDD; MAUREL *et al*, 2014). Notwithstanding, continuous IRE1 activation can lead to an inflammatory states scenery and/or programmed cell death by triggering multiple signaling pathways (STEWART *et al*, 2017; BASHIR *et al*, 2021).

In this study, we hypothesize that HIV-1 Tat-induced microglial M1 state can could be regulated by disrupting IRE1 signaling and the ensuing ER stress alleviation. To investigate this, we modulated UPR in a previously established Tat-activated microglial

model by using 4 μ 8C (7-hydroxy-4-methyl-2-oxo-2H-chromene-8-carbaldehyde), an aromatic aldehyde that binds to IRE1's RNase domain and inhibits its activity. Our findings demonstrate that inhibition of the IRE1-XBP-1 axis significantly suppresses the M1 microglial profile evoked by Tat, shedding light on the possibility of IRE1 RNase inhibitors might be a feasible strategy to attenuate neuroinflammation and neuronal injury in HIV-1-positive individuals.

5.3 MATERIAL AND METHODS

5.3.1 Cell culture and experimental agents

Recombinant HIV-1 Tat protein (full-length HIV-1 Tat clade B sequence, isolate BH10, UniProtKB - P69697, TAT_HV1B1) was produced and purified as described in Silveira *et al* (2022). BV-2 microglial cells were purchase from Banco de Células do Rio de Janeiro (Brazil), and maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich, USA) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum (Cultilab, Brazil), 1mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, at 37°C in 5% CO₂. Cells were seeded (5x10⁶) in 12-well plates and cultured until they reached 80-100% of confluency for subsequent experiments, when media was replaced by serum-free medium. The IRE1 inhibitor 4 μ 8C was purchased from Tocris Bioscience (Minneapolis, USA, #4479/50). For experiments targeting IRE1 inhibition, the small-molecule 4 μ 8C was solubilized according to supplier's instructions and assayed using a range of concentrations, with or without recombinant Tat, at different time-points. Heat-inactivated recombinant Tat (boiled at 90° C for 1 h) was used as an experimental control of non-stimulation.

5.3.2 Cell viability and apoptosis assessment

BV-2 cells were assayed as described aforementioned and 100 μ L of MTT [3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, Merck KGaA, Germany] solution (5 mg/mL in DMEM without serum) was added to each well. After 4 h incubation, supernatants were removed and 1 mL of dimethyl sulphoxide (Sigma-Aldrich, USA) was added to each per well. Amounts of reduced MTT were

spectrophotometrically measured at 540 nm (SpectraMax Paradigm Multi-mode Microplate Reader, Molecular Devices, LLC, USA). In addition, the apoptotic profile of BV-2 cells was assessed by FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD (Biolegend, USA). Apoptotic cells were analyzed in FACSCanto II flow cytometer (Becton & Dickinson, USA) and FlowJo-VX software. Double-stained cells (late apoptotic events) and Annexin V-stained cells (early apoptotic events) were considered.

5.3.3 Measurement of CD16/32 expression

BV-2 cells were assayed as described, and detached from plates after 48h for washing with phosphate buffered saline and labelling with FITC anti-CD16/32 (Biolegend, USA, #101305, 1 µg/10⁶ cells, 40 min at 4° C). Cells were analyzed in BD FACSCanto II flow cytometer (Becton & Dickinson, USA) and FlowJo-VX software.

5.3.4 Cytometric bead array and NO dosage

BV-2 cells were assayed and supernatants collected after 48 h to assess inflammatory-related molecules using the CBA Mouse Inflammation kit (BD Pharmingen, USA) according to the supplier's protocol. For NO dosage, supernatants were processed as previously described (SILVEIRA *et al*, 2022). In brief, supernatants were mixed (1:1) with 0.1% naphthyl ethylenediamine and 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid solution (Sigma-Aldrich, USA) for 5 min at room temperature in the dark. Absorbance was then measured at 540 nm using a spectrophotometer (SpectraMax Paradigm Multi-mode Microplate Reader, Molecular Devices, LLC, USA).

5.3.5 Western blotting analysis

BV-2 cells were assayed and lysed after 48 h for western blot. Total protein concentrations were quantified by the Bradford assay (Bio-Rad, USA). Samples were loaded (50 µg) and separated in 15% SDS-PAGE gel, followed by transferring (3 h at 200 mA) onto a nitrocellulose filter membrane (Bio-Rad, USA). The membranes were incubated at room temperature with 5% nonfat milk for 1 h, followed by incubation with

primary anti-XBP-1 (Abcam, USA, #ab37152, 1:500), anti-eIF2 α (Santa Cruz Biotechnology, USA, #sc-133132, 1:500), anti-p-eIF2 α (Thermo Fischer, USA, #44-728G, 1:1000) or anti- β -actin (Abcam, USA, #ab8227, 1:5000). MThen, membranes were then incubated with goat anti-rabbit (Sigma-Aldrich, USA, #A0545, 1:5000) or goat anti-mouse (Sigma-Aldrich, USA, #A9309, 1:1000) secondary antibodies in skimmed milk for 1 h at room temperature. ECL Western blot substrates (Pierce, Thermo Fisher Scientific, USA) were used to identify immunoreactive bands and analyzed using ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

5.3.6 Quantitative real-time PCR

Total RNA was isolated from cells using a RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA) and qRT-PCR was performed on a StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies, USA) using a FastSYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, USA). Reactions were performed in triplicate and the relative expression ratios calculation as well as primer sequences were used as according to previously published (SILVEIRA *et al*, 2022).

5.3.7 Statistical analysis

Statistical significance was evaluated using the Student's t test when considering differences between two experimental groups, or by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test in the case of multiple groups. Statistical significance level was determined at $p < 0.05$.

5.4 RESULTS

Given that higher concentrations of 4 μ 8C are suggested to affect cell proliferation, apoptosis and UPR-related signaling independently of its IRE1 RNase activity (CROSS *et al*, 2012; STEWART *et al*, 2017), we first sought to investigate whether 4 μ 8C impacts the kinetics of cell viability/apoptosis in microglia-like BV-2 cells under different concentrations. As shown in Figure 5.1, incubation with 4 μ 8C substantially decreases MTT cleavage activity starting at 60 μ M after 48 h, although

lower concentrations did not induce changes over time (Fig. 5.1A). Also, the presence of IRE1 inhibitor at 10 μM did not affect MTT reduction and viability rates for BV-2 cells during ER stress evoked by recombinant Tat after 48 h (Fig. 5.1B and 5.1C), indicating absence of off-target effects on cellular survival. This intermediate time-point and 4 μ8C dosing have been previously characterized as optimal assaying conditions for Tat-mediated ER stress assessments in BV-2 cell models (SILVEIRA *et al*, 2022) and 4 μ8C inhibition of IRE1 RNase activity (STEWART *et al*, 2017). As such, these conditions were chosen for all subsequent experiments.

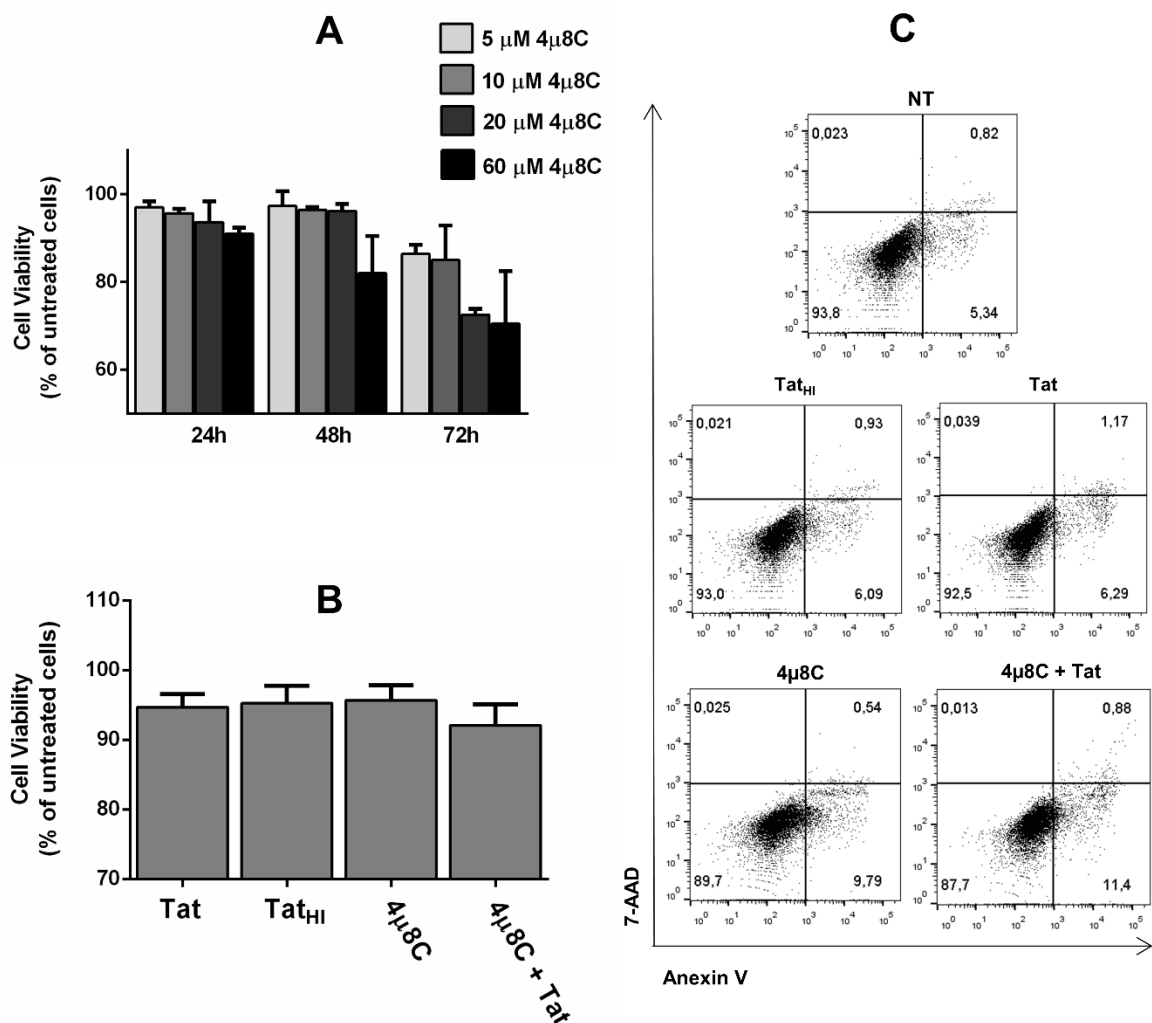


FIGURE 5.1: Effect of IRE1 inhibitor 4 μ8C on cell viability and apoptotic fate of Tat-induced M1-like BV-2 cells. (A) BV-2 cells were incubated with increasing concentrations of IRE1 inhibitor 4 μ8C at different time-points and cell viability was assessed by MTT assay. (B) BV-2 cells were cultured with 10 μM 4 μ8C in presence or absence of 400 nM recombinant Tat for 48h and cell viability was estimated as described above. Data expressed as percentage of untreated cells \pm SD. (C) Dot plot graphs showing apoptotic cell rates as percentage of BV-2 cells incubated with 10 μM 4 μ8C in presence or absence of recombinant 400 nM Tat for 48h. Data acquired by flow cytometry after 7-AAD/Annexin V staining. Experimental controls were performed with heat-inactivated Tat (Tat_{HI}, 400 nM) and untreated cells (NT). Data shown is representative of three independent experiments.

We next verified whether 4 μ 8C could modulate IRE1-mediated signaling and the expression of UPR in Tat-ER stressed BV-2 cells. The use of this inhibitor markedly downregulated IRE1 gene expression, both transcriptional forms of XBP-1, and the UPR-related early effector BIP (Binding Immunoglobulin Protein) in Tat-treated cell groups (Fig. 5.2A). At 10 μ M, 4 μ 8C was able to decrease Tat-induced XBP-1u (unspliced form) and XBP-1s (spliced form) protein levels (Fig. 5.2B), further confirming a blocking in IRE1 signaling driven by Tat. Importantly, there were no remarkable changes in gene expression for ATF4 (Activation Transcription Factor 4), CHOP (Homologous Protein C/EBP), and eIF2- α (Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha) or in levels of eIF2- α phosphorylation – all such mediators are triggered downstream of both ER stress sensors PERK (Protein kinase R-like ER kinase) and ATF6 (Activating transcription factor 6), thus supporting a selective disruption of IRE1 RNase.

Finally, we sought to explore whether IRE1 RNase activity is involved in Tat-induced microglial inflammatory states by using 4 μ 8C IRE1 inhibitor. BV-2 cells were exposed to recombinant Tat in presence or absence of 10 μ M 4 μ 8C, and M1 phenotype markers were assessed. Levels of secreted NO, TNF- α and IL-6 (Fig. 5.3A) were significantly decreased by 4 μ 8C, hindering IRE1-dependent pathways. Such pharmacological inhibition of IRE1 RNase was also able to reduce the expression of surface CD16/32 triggered by recombinant Tat (Fig. 5.3B). We also analyzed gene expression of inducible NO synthase (iNOs) and compared it with expression levels for Arginase 1 (Arg-1), against which iNOs competes – these are common markers for M1 and non-inflammatory M2 phenotypes. Figure 5.3C shows, as expected, a significant decrease of iNOs levels concurrently with the lowering of Arg-1 gene expression elicited by recombinant Tat, reinforcing the role of IRE1 RNase in Tat-driven M1 microglial NO synthesis. Taken together, these results indicate a potential cross-talk between ER stress-related IRE1-XBP-1 signaling and M1 activation evoked by Tat in microglial cells.

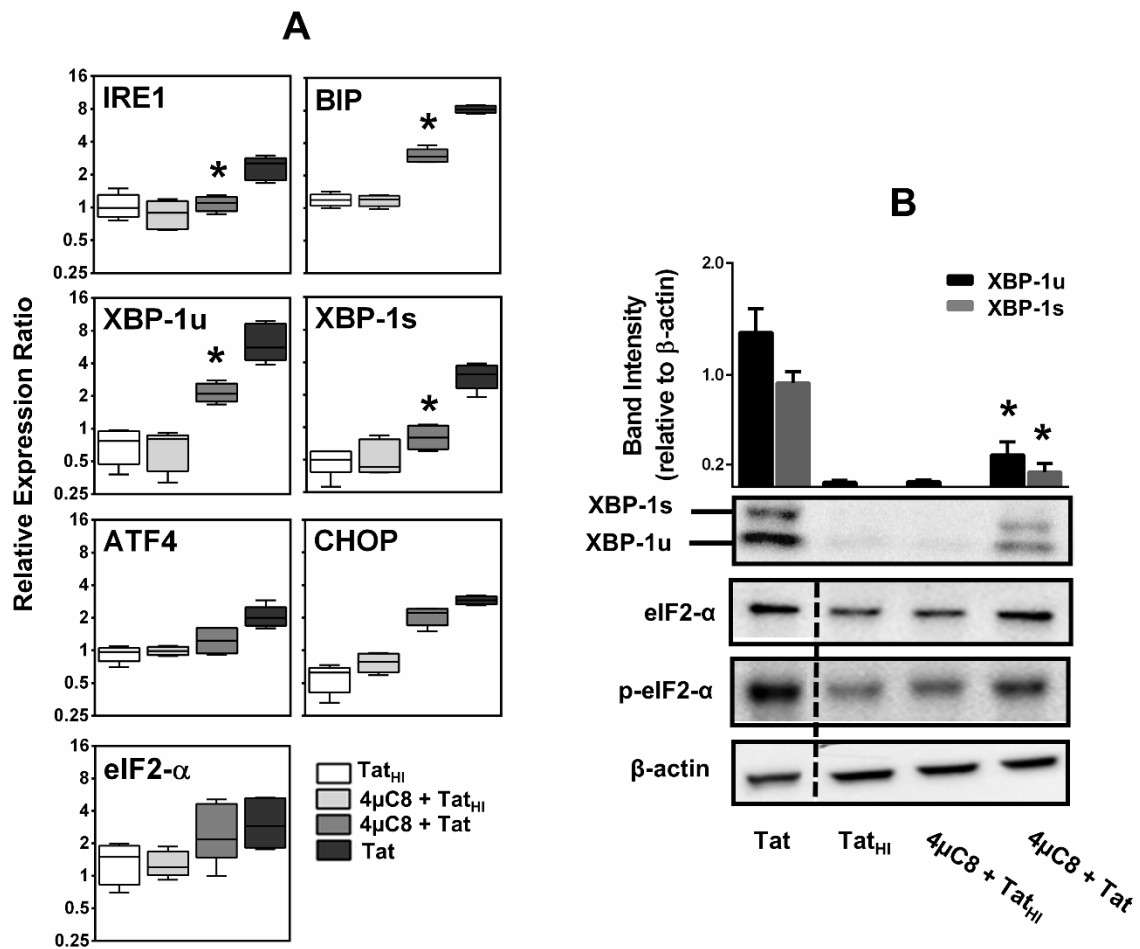


FIGURE 5.2. 4μ8C downregulates HIV Tat-induced ER stress in BV-2 cells by interfering with the IRE1 pathway. (A) BV-2 cells were incubated for 48 h with 400 nM recombinant Tat with or without 10 μM 4μ8C, expression profile of IRE1 pathway-related genes was assessed by RT-qPCR and displayed as whisker-box plots of normalized expression ratio. (B) Expression of XBP-1u (unspliced form) and XBP-1s (spliced form) of Tat-treated BV-2 cells with or without 10 μM 4μ8C for 48 h evaluated by Western blotting. Bar graph shows the normalized band intensity values of Western blottings as mean ± SE. The figure was prepared from different fields of the same western blot images and this editing is indicated by the dotted line. Experimental controls were performed with heat-inactivated Tat (Tat_{HI}, 400 nM). Data are representative of two or three independent experiments. Statistical significance is indicated in relation to Tat-treated cells ($p < 0.05^*$).

5.5 DISCUSSION

HAND refers to a spectrum of neurologic impairments which may emerge despite the currently available combined antiretroviral therapy (SUNDERMANN *et al*, 2021). Several reports have implied the progressive accumulation of misfolded proteins and their insufficient clearance rate in HIV-infected brains as a component of HAND pathogenesis (DONG *et al*, 2019; MARINO *et al*, 2020a). Previous work has described

there is an interplay between ER burden/UPR pathways and inflammogenic signaling, and this may be a central mechanism of M1-like activation of microglia and the infiltration of macrophages into CNS which is enabled by HIV or its soluble factors (ZHANG *et al*, 2008; CIRONE, 2021). Moreover, we recently highlighted that circulant Tat stimuli leads to a coupled phenotype in microglial cells: PERK-dependent ER stress and inflammation responses (SILVEIRA *et al*, 2022). In the present study, we interrogated the role of IRE1 RNase activity in mediating Tat-driven M1 microglial state by using a small-molecule inhibitor, 4 μ 8C.

IRE1 signaling has been extensively associated with cell death and inflammation in CNS. Compelling evidence of IRE1-triggered cascades in CNS-resident immune cells has been described in post-mortem samples of clinically confirmed cases of Alzheimer's disease, Huntington's disease, and glioma, as well in several in vivo and in vitro neurodegenerative diseases models (SIMS *et al*, 2022). The IRE1-XBP1s pathway also promotes astrocyte-intrinsic pro-inflammatory responses during experimental autoimmune encephalomyelitis, which is coordinated by trans-membrane chaperones placed in ER (WHEELER *et al*, 2019). In addition, IRE1 RNase appears to be pivotal in microglia-mediated neuroinflammation, licensing a sustained release of pro-inflammatory cytokines and iNOS, and enabling NLRP3 inflammasome assembly (CHEN *et al*, 2018; MO *et al*, 2020). IRE1 RNase also regulates IFN-I response in microglia, whose overactivation could induce a state of chronic neuroinflammation (STUDENCKA-TURSKI *et al*, 2019). In line with such reports, we observed in our study a consistent activation of IRE1 branch in Tat-activated M1-like BV-2 cells, marked by growing expression of IRE1-linked genes and XBP-1 splicing and providing a formal connection between IRE1 activation and the underlying inflammatory effects of Tat on microglia. This potential coupling was further explored by pharmacological hindering of IRE1 RNase as discussed below.

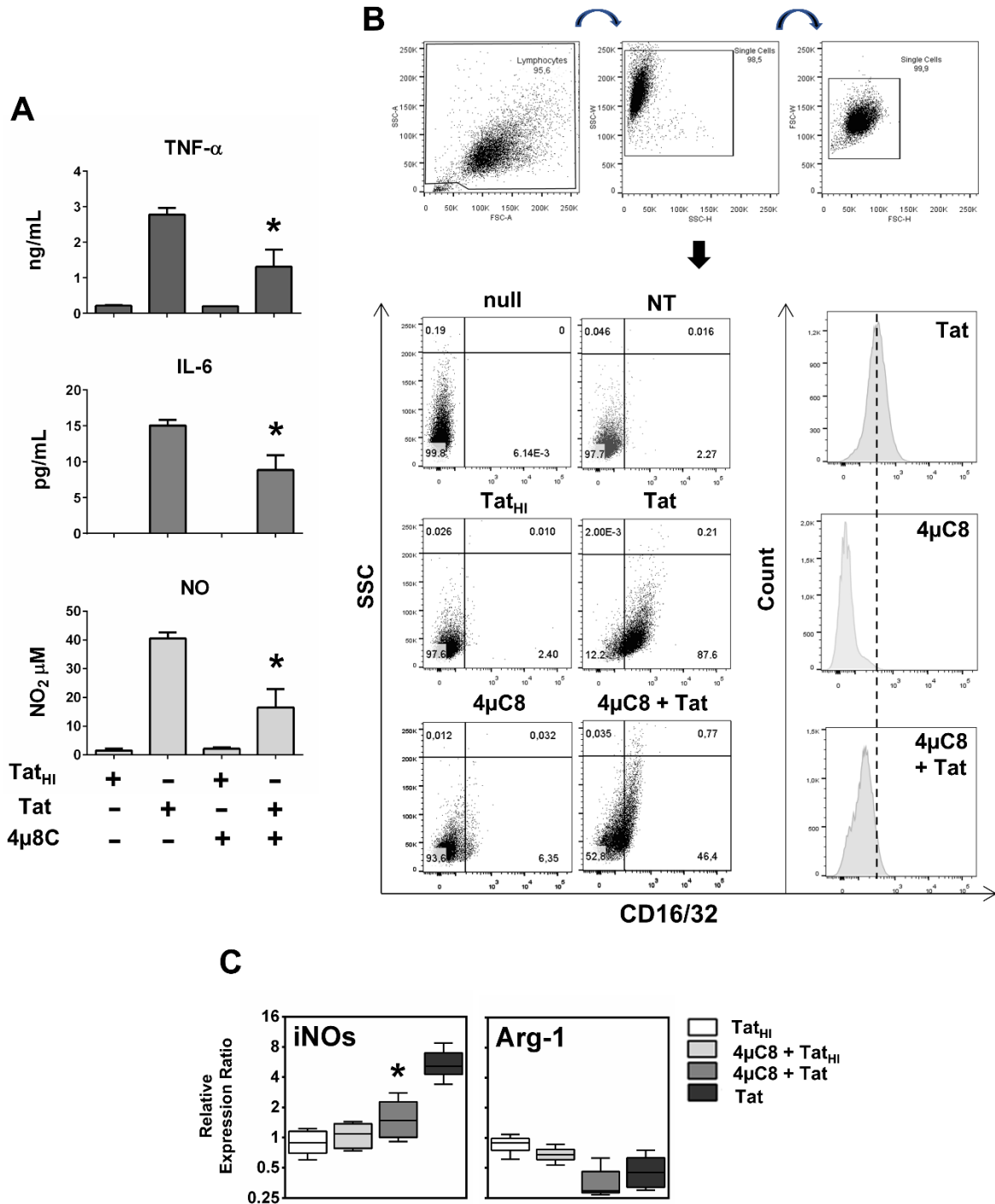


FIGURE 5.3. Inhibition of IRE1 RNase activity attenuates Tat-induced M1 phenotype in BV-2 cells. (A) Bar graphs show the levels of secreted TNF- α , IL-6 and NO of BV-2 cells incubated with 400 nM recombinant Tat with or without 10 μ M 4 μ 8C for 48 h. Data acquired by CBA or Griess assay and expressed as mean \pm SD. (B) Flow cytometry analysis of BV-2 cells incubated with 400 nM recombinant Tat with or without 10 μ M 4 μ 8C for 48 h and labeled with CD16/32. Expression rates (dot plots) and fluorescence measurements (histograms) are displayed. Null refers to unmarked cell control for flow cytometry assessments. Experimental controls were performed with heat-inactivated Tat (Tat_{HI}, 400 nM) and untreated cells (NT). (C) Tat-treated BV-2 cells (400 nM) were incubated with or without 10 μ M 4 μ 8C for 48 h, iNOS and Arg-1 genes expression was assessed by RT-qPCR and displayed as normalized expression ratio. Experimental controls were performed with heat-inactivated Tat (Tat_{HI}, 400 nM). Data are representative of three independent experiments. Statistical significance is indicated in relation to heat-inactivated Tat-treated cells ($p < 0.05^*$).

The 4 μ 8C compound has been well-characterized as a selective inhibitor of IRE1 endonuclease based on reduced downstream splicing of XBP-1 in embryonic fibroblast, hepatoma and human multiple myeloma cell lines (PAPANDREOU *et al*, 2011; CROSS *et al*, 2012; STEWART *et al*, 2018). Here, we extend these findings by demonstrating an impaired IRE1-dependent response in 4 μ 8C-treated BV-2 cells, in parallel with an attenuation of M1 state under Tat activation. Although the present study was not designed to examine the mechanism by which IRE1/XBP-1 inhibition directly relieves BV-2 cells M1 activity over Tat exposure, our findings add new evidence for the modulation of the inflammatory programme in microglia by blocking IRE1 RNase domain. This statement is still coherent with previous studies demonstrating that both XBP-1s production and RIDD are induced in macrophages after stimulation and might work in sync to prevent M2 toward M1 phenotype shaping (BUSIJIC e MARTINON, 2017; ZHAO *et al* 2020). It is worth noting also that the 10 μ M 4 μ 8C dosing to inhibit IRE1 RNase activity had no effect on non-RE1-related UPR components or cell viability, ruling out the involvement of off-target effects or cytotoxicity. The role of IRE1 RNase activity on M1 microglial skewing by soluble HIV-1 proteins should be further investigated in the future and might afford new insights into viral neuropathogenesis and therapeutics for neurologically affected HIV-1 individuals.

In conclusion, our work highlights IRE1/XBP-1 signaling as a regulator of microglial M1 polarization during Tat uptake and provides an important proof of concept to suggest the use of IRE1 RNase inhibitors as a platform for development of novel strategies to mitigate lasting neuroinflammation in HIV-1 infection. As well as useful tools for modulating IRE1 in vitro and in vivo, compounds like 4 μ 8C, or more pharmacologically suitable analogues, might be feasible for clinical applications in treatment of HAND or other neurodegenerative conditions.

5.6 ACKNOWLEDGMENTS

We would like to express our gratitude to Dr. Gislaine Fongaro, Dr. Maristela M. Camargo, Dr. Rafael D. da Rosa and Dr. Oscar B. Romero for providing reagents and equipments, Natália Porto Flores for technical support and LAMEB/UFSC (Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia/Universidade Federal de Santa Catarina) for cell

cytometry analysis. A.R.P. is a CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) scholar.

5.7 AUTHORS CONTRIBUTIONS

D.B.S. designed the study, performed experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. M.F.A. performed experiments. H.T assisted in experiments, protein data analysing and resources providing. A.R.P designed the study, supervised the work and revised the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

5.8 REFERENCES

BASHIR, Samirul; BANDAY, Marian; QADRI, Ozaira; et al. The molecular mechanism and functional diversity of UPR signaling sensor IRE1. *Life Science*, v. 265, n. 118740, 25 janeiro 2021. Disponível em: <<http://doi:10.1016/j.lfs.2020.118740>>.

BORRAJO, Ana; PENEDO, Maria Aranzázu; OLIVARES, Jose Manuel; AGÍS-BALBOA, Roberto Carlos. Important role of microglia in HIV-1 associated neurocognitive disorders and the molecular pathways implicated in its pathogenesis, *Annals of Medicine*, v. 53, n. 1, p. 43-69, 17 setembro 2020. Disponível em: <<http://doi:10.1080/07853890.2020.1814962>>.

BUJISIC, Bojan; MARTINON, Fabio. IRE1 gives weight to obesity-associated inflammation. *Nature Immunology*, v. 18, n. 5, p. 479-480, 18 abril 2017. Disponível em: <<http://doi:10.1038/ni.3725>>.

CAMPESTRINI, Jéssica; SILVEIRA, Douglas Bardini; PINTO, Aguinaldo Roberto. HIV-1 Tat-induced bystander apoptosis in Jurkat cells involves unfolded protein responses. *Cell Biochemistry and Function*, v. 36, n. 7, p. 377-386, 24 setembro 2018. Disponível em: <<http://doi:10.1002/cbf.3357>>.

CHEN, Di; DIXON, Brandon; DOYCHEVA, Desislava; et al. IRE1 α inhibition decreased TXNIP/NLRP3 inflammasome activation through miR-17-5p after neonatal hypoxic–ischemic brain injury in rats. *Journal of Neuroinflammation*, v. 15, n. 1, 2 fevereiro 2018. Disponível em: <<http://doi:10.1186/s12974-018-1077-9>>.

CHEN, Xue; ZHANG, Tong; ZHANG, Yulin. Endoplasmic reticulum stress and autophagy in HIV-1-associated neurocognitive disorders. *Journal of Neurovirology*, v. 26, n. 6, p. 824-833, dezembro 2020. Disponível em: <<http://doi:10.1007/s13365-020-00906-4>>.

CIRONE, Mara. ER Stress, UPR Activation and the Inflammatory Response to Viral Infection. *Viruses*, v. 13, n. 5, p. 798, 29 abril 2021. Disponível em: <<http://doi:10.3390/v13050798>>.

CROSS, Benedict; BOND, Peter; SADOWSKI, Pawel; et al. The molecular basis for selective inhibition of unconventional mRNA splicing by an IRE1-binding small molecule. *PNAS*, v. 109, n. 15, 10 abril 2012. Disponível em: <<http://doi:10.1073/pnas.1115623109>>.

DONG Huaqian; YE Xiang; ZHONG, Ling; et al. Role of FOXO3 Activated by HIV-1 Tat in HIV-Associated Neurocognitive Disorder Neuronal Apoptosis. *Frontiers in Neuroscience*, v. 13, 4 fevereiro de 2019. Disponível em: <<http://doi:10.3389/fnins.2019.00044>>.

HETZ, Cláudio; ZHANG, Kezhong; KAUFMAN, Randal. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 21, n. 8, p. 421-438, 26 maio 2020. Disponível em: <<http://doi:10.1038/s41580-020-0250-z>>.

MARINO, Jamie; MAUBERT, Monique; MELE, Anthony; SPECTOR, Cassandra; WIGDAHL, Brian; et al. Functional impact of HIV-1 Tat on cells of the CNS and its role in HAND. *Cellular and Molecular Life Science*, v. 77, n. 24, p. 5079-5099, 23 junho 2020a. Disponível em: <<http://doi:10.1007/s00018-020-03561-4>>.

MARINO, Jamie; WIGDAHL, Brian. Nonnemacher MR. Extracellular HIV-1 Tat Mediates Increased Glutamate in the CNS Leading to Onset of Senescence and Progression of HAND. *Frontiers in Aging Neuroscience*, v. 12, 9 junho 2020b. Disponível em: <<http://doi:10.3389/fnagi.2020.00168>>.

MAUREL, Michael; CHEVET, Ernest; TAVERNIER, Javier; et al. Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends in Biochemical Science*, v. 39, n. 5, p. 245-254, 1 maio 2014. Disponível em: <<http://doi:10.1016/j.tibs.2014.02.008>>.

MO, Zhen-Tao; LIAI, Yiu-Ling; ZHENG, Jie, LI, Wen-Na. Icaritin protects neurons from endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis after OGD/R injury via suppressing IRE1 α -XBP1 signaling pathway. *Life Science*, v. 255, n. 117847, agosto 2020. Disponível em: <<http://doi:10.1016/j.lfs.2020.117847>>.

PAPANDREOU, Ioanna; DENKO, Nicholas; OLSON, Michael; et al. Identification of an Ire1 α endonuclease specific inhibitor with cytotoxic activity against human multiple myeloma. *Blood*, v. 117, n. 4, p.1311-1314, 27 janeiro 2011. Disponível em: <<http://doi:10.1182/blood-2010-08-303099>>.

SAIYED, Zainulabedin; GANDHI, Nimisha; AGUDELO, Marisela, et al. HIV-1 Tat upregulates expression of histone deacetylase-2 (HDAC2) in human neurons: Implication for HIV-associated neurocognitive disorder (HAND). *Neurochemistry International*, v. 58, n. 6, p. 656-664, 17 fevereiro 2011. Disponível em: <<http://doi:10.1016/j.neuint.2011.02.004>>.

SILVEIRA, Douglas Bardini; AMÉRICO, Monique Ferrary; FLORES, Natália; TERENCE, Hernán; PINTO, Aguinaldo Roberto. Pharmacological inhibition of UPR sensor PERK attenuates HIV Tat-induced inflammatory M1 phenotype in microglial cells. *Cell Biochemistry Function*. 18 janeiro 2022. Disponível em: <<http://doi:10.1002/cbf.3685>>.

SIMS, Savannah; CISNEY, Rylee; LIPSCOMB, Marissa; GORDON, Meares. The role of endoplasmic reticulum stress in astrocytes. *Glia*, v. 70, n. 1, p. 5-19, janeiro 2022. Disponível em: <<http://doi:10.1002/glia.24082>>.

SPREngle, Neil; SIMS, Savannah; SÁNCHEZ, Cristina; MEARES, Gordon. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in the central nervous system. *Molecular Neurodegeneration*, v. 12, n. 1, 25 maio 2017. Disponível em: <<http://doi:10.1186/s13024-017-0183-y>>.

STEWART, Claire; ESTRADA, Andrea, KIM, Paul; et al. Regulation of IRE1 α by the small molecule inhibitor 4 μ 8c in hepatoma cells. *Cell Pathology*, v. 4, n. 1, p.1-10, 27 abril 2017. Disponível em: <<http://doi:10.1515/ersc-2017-0001>>.

SUNDERMANN, Erin; BONDI, Mark; CAMPBELL, Laura; et al. Distinguishing amnesic mild cognitive impairment from HIV-associated neurocognitive disorders. *Journal of Infectious Diseases*, v. 224, n. 3, p. 435-442, agosto 2021. Disponível em: <<http://doi:10.1093/infdis/jiaa760>>.

STUDENKA-TURSKI, Maja; ÇETIN, Gonca; JUNKER, Heike; EBSTEIN, Frédéric; et al. Molecular insight into the IRE1 α -mediated type I interferon response induced by proteasome impairment in myeloid cells of the brain. *Frontiers in Immunology*, v. 10, p. 2900, 18 dezembro 2019. Disponível em: <<http://doi:10.3389/fimmu.2019.02900>>.

WU, Xiaoyan; DONG, Huaqian; YE, Xiang; et al. HIV-1 Tat increases BAG3 via NF- κ B signaling to induce autophagy during HIV-associated neurocognitive disorder. *Cell Cycle*, v. 17, n. 13, p. 1614-1623, 21 agosto 2018. Disponível em: <<http://doi:10.1080/15384101.2018.1480219>>.

TANG, Yu; LE, Weidong. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*, v. 53, n. 2, p. 1181–1194, 20 jan. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5>>.

TORKZABAN, Bahareh; MOHSENI AHOYI, Taha; DUGGAN, Michael; AMINI, Shohreh; et al. Cross-talk between lipid homeostasis and endoplasmic reticulum stress in neurodegeneration: Insights for HIV-1 associated neurocognitive disorders (HAND). *Neurochemistry International*, v.141, n. 104880, dezembro 2020. Disponível em: <<http://doi:10.1016/j.neuint.2020>>.

WHEELER, Michael; JARONEN, Merja.; COVACU, Ruxandra; et al. Environmental control of astrocyte pathogenic activities in CNS inflammation. *Cell*, v. 176, n. 3, p. 581-596, 24 janeiro 2019. Disponível em: <<http://doi:10.1016/j.cell.2018.12.012>>.

ZHANG, Kezhong; KAUFMAN, Randal. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*, v. 454, n. 7203, p. 455-462, 1 julho 2008. Disponível em: <<http://doi:10.1038/nature07203>>.

ZHAO, Yanfen; JIANG, Yan; CHEN, Linsong; et al. Inhibition of the endoplasmic reticulum (ER) stress-associated IRE-1/XBP-1 pathway alleviates acute lung injury via modulation of macrophage activation. *Journal of Thoracic Disease*, v.12, n. 3, p. 284-295, março 2020. Disponível em: <<http://doi:10.21037/jtd.2020.01.45>>.

6. CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

A ativação microglial mediada pela ação do HIV-1 é descrita como um dos principais componentes neuropatogênicos das HAND. Tal evento demanda um conjunto de mecanismos celulares que pode desencadear o acúmulo de produtos proteicos sem a correta conformação no lúmen reticular que, em resultado, deflagra uma série de vias de sinalização finamente coordenadas a fim de restaurar a homeostase do RE, referidas em sua totalidade como vias UPR. Dessa forma, a hipótese central do presente trabalho postula que a ação indutora de Tat, em sua forma extracelular, é capaz de modular os diferentes efetores moleculares das vias UPR em células microgliais. A fim de confirmar esta conjectura, este estudo propôs inicialmente uma abordagem *in vitro*, com vistas a emular as respostas celulares da micróglia após o estímulo de Tat circulante, seguidos de análises do perfil de ativação induzido e da expressão de efetores das vias UPR, incluindo seus sensores e moléculas relacionados às cascatas de sinalização por eles deflagradas.

Conforme apresentado previamente, a liberação de mediadores inflamogênicos e consequente atividade pró-inflamatória de células microgliais é tipificada como seu estado de ativação clássico e designada como fenótipo de ativação M1 cujo espectro de reatividade é amplo e pode variar conforme o estímulo indutor e o contexto neuroquímico (BAGASHEV e SAWAYA, 2013; BORRAJO *et al*, 2021). Em contraste ao fenótipo M1, subpopulações microgliais podem apresentar um estado de ativação alternativo, referido como fenótipo M2 e caracterizado pela expressão de fatores de remodelação tecidual e resolução do processo inflamatório. Embora de natureza antagônica, os perfis M1 e M2 podem manifestar-se de forma simultânea e dinâmica, sendo este balanço de polarização fenotípica um processo multifatorial, relacionado à extensão do dano tecidual e aos componentes imunoquímicos disponíveis (BAGASHEV e SAWAYA, 2013; ORIHUELA *et al*, 2015; TANG e LE *et al*, 2016; BORRAJO *et al*, 2021). A capacidade do HIV-1 em modular a dinâmica fenotípica de células microgliais tem sido descrita em diferentes modelos experimentais e, não obstante sua relevância ainda ser apenas parcialmente compreendida, é associada aos processos de evasão tecidual, latência e suporte à replicação viral no tecido nervoso (GRAZIANO *et al*, 2016). A partir da abordagem *in vitro* aqui descrita,

demonstrou-se o claro efeito modulador de Tat sobre a ativação da micróglia, denotado pelo aumento da expressão de marcadores canônicos do fenótipo inflamatório M1 (ver seção 4.4.2). Este achado reforça o consenso de que Tat pode direcionar a reatividade microglial para um estado de ativação predominantemente inflamatório, de caráter crônico, em detrimento às respostas de resolução e reparo apropriadas, contribuindo assim para a instauração de um ambiente neurotóxico. Congruente à sua ação inflamogênica, Tat foi capaz de induzir sobrecarga traducional e consequente respostas de estresse do RE em células BV-2, evidenciando a potencial sobreposição entre as vias de sinalização de ambos os mecanismos (ver seções 3.3.2, 4.4.3 e 5.4). Tais resultados são precedidos por trabalhos que reportam o envolvimento das vias de resolução do estresse traducional na sinalização inflamatória, o que pode levar a um processo de potenciação recíproca da resposta inflamatória e sobrecarga do RE em uma série de distúrbios crônicos e/ou autoimunes (RYAN *et al*, 2020; CIRONE, 2021). Os dados relatados neste estudo concordam ainda com a literatura que sugere a participação das vias UPR nos processos de apoptose, disfunção mitocondrial e ativação celular mediados por Tat em astrócitos, células neuronais e células do endotélio microvascular cerebral (ZAULI *et al*, 1995; MIDDE *et al*, 2012; CHE *et al*, 2014). Tomados em conjunto, os resultados alcançados sustentam que o efeito *bystander* de Tat pode interpor a polarização ao fenótipo M1 e a ativação das vias UPR na micróglia, convergindo para o contexto neuroinflamatório das HAND. Contudo não é claro, a princípio, se ambos os processos são coordenados de forma paralela ou se a regulação positiva da ativação celular e atividade pró-inflamatória e as respostas de estresse do RE são eventos sequencias e/ou interdependentes.

Uma vez constatada a associação entre a perturbação da proteostase/respostas de estresse do RE e a atividade inflamatória mediada por Tat no modelo celular utilizado, buscou-se explorar o papel de cascatas de sinalização distintas no cenário de ativação das vias UPR através do bloqueio farmacológico de dois de seus sensores, PERK e IRE1. Tanto PERK quanto IRE1 são descritos como moléculas-chave na patogênese de vários distúrbios de origem inflamatória e podem atuar em conjunto na montagem e/ou exacerbação das respostas celulares observadas nessas condições (CIRONE, 2021; CHIPURUPALLI *et al*, 2021). Após a ativação da UPR, o complexo IRE1/TRAF2/ASK pode fosforilar JNK-1 e/ou IκK, promovendo a

translocação de NF- κ B ao núcleo e a expressão de genes de resposta inflamatória. A ativação de NF- κ B também é induzida pelo eixo PERK-eIF2 α , através da depleção de inibidores como I κ B α ; ainda, a expressão de ATF4 e outras moléculas à jusante da cascata mediada por PERK é capaz de desencadear estresse oxidativo e a liberação de mediadores pró-inflamatórios *per se* (GUTHRIE *et al*, 2016; LEE *et al*, 2018; BORRAJO *et al*, 2021). Como mostrado no Capítulo 3, o inibidor GSK2606414 – cujo efeito neuroprotetor foi demonstrado em estudos pré-clínicos de Doenças de Parkinson e Alzheimer, Síndrome de Down e neuropatia diabética (YANG *et al*, 2016; MERCADO *et al*, 2018; LANZILLOTTA *et al*, 2020; GUNDU *et al*, 2022) – atenuou de forma significativa o estado de ativação inflamatória promovido por Tat em células BV-2; estes dados evidenciam a participação da sinalização de PERK, concomitante à tentativa de retorno à proteostase na dinâmica de ativação microglial nas HAND (ver seção 4.4.5). Ademais, embora o exato mecanismo pelo qual a inibição de PERK regule a expressão do fenótipo microglial M1 permaneça elusivo, os achados relatados aqui permitem especular que a ação neuroprotetora de GSK2606414 em modelos *in vivo* está associada, ao menos em parte, à desfosforilação de eIF2 α e decorrente diminuição dos níveis de ATF4 e efetores transcricionais relacionados e desbloqueio traducional de fatores de supressão de vias inflamatórias.

Embora a fosforilação de efetores envolvidos na transdução de sinal seja relatada como o principal meio pelo qual IRE1 atua na mediação do processo inflamatório, estudos recentes têm sugerido que o domínio endoribonuclease deste sensor exerce papel essencial na sinalização inflamogênica. A atividade RNase de IRE1 e o principal produto de seu processamento transcricional, XBP-1s, parecem suprarregular a expressão de genes da resposta de interferon tipo I (IFN-1 – IFN- α/β) e citocinas pró-inflamatórias em células do epitélio pulmonar, células esplênicas, células dentríticas e macrófagos (SMITH *et al*, 2018; BIESEL *et al*, 2017). Especificamente, a participação do eixo IRE1-XBP-1s na ativação inflamatória de astrócitos e micróglia já foi anteriormente demonstrada (CHEN *et al*, 2018; MO *et al*, 2020; WHEELER *et al*, 2021). Em adição ao processamento e expressão de XBP-1s, a geração de pequenos transcritos através de RIDD pode induzir a um programa de reconhecimento e combate ao “não-próprio” através da expressão de RIG-I (*Retinoic Inducible Gene-1*), culminando na ativação de respostas de IFN-1, inflamosoma NLRP3 e NF- κ B de modo redundante à atividade quinase de IRE1 (LENCER *et al*,

2015; CHEN *et al*, 2016). Nos ensaios reportados no Capítulo 4, a utilização do inibidor farmacológico 4 μ 8C regulou significativa e negativamente a expressão de todos os marcadores de atividade inflamatória analisados em nosso modelo (ver seção 5.4), substanciando a importância da função RNase de IRE1 na modulação do fenótipo microglial M1 induzido por Tat. Ressalta-se que, conforme discutido, a ausência de alterações no padrão de expressão e fosforilação de mediadores dependentes de PERK permite concluir a seletividade do composto 4 μ 8C ao domínio IRE1 endoribonuclease (ver seção 5.5).

Em conclusão, os achados *in vitro* apresentados no presente estudo atestam a relação entre as vias de estresse do RE e os mecanismos de ativação inflamatória desencadeados por Tat em células microgliais. Os resultados indicam ainda o papel dos eixos PERK-eIF2 α e IRE1-XPB-1/RIDD da UPR na modulação do fenótipo microglial M1, validando a possibilidade do bloqueio farmacológico destas vias – partindo da utilização dos respectivos inibidores GSK2606414 e 4 μ 8C ou seus análogos químicos – como estratégia na terapêutica do processo neuroinflamatório associado ao HIV-1. A participação das sinalizações moduladas por IRE1 e PERK no estado inflamatório e o potencial modo de ação inibitório discutidos acima encontram-se brevemente sumarizados na Figura 6.1. Até o presente momento, pouco tem sido reportado na literatura acerca do significado fisiológico do estresse do RE em células do SNC durante a progressão das HAND. Os futuros desdobramentos deste trabalho poderão preencher tais lacunas e auxiliar na compreensão da modulação dos processos de sinalização intracelular inerentes à infecção pelo HIV-1.

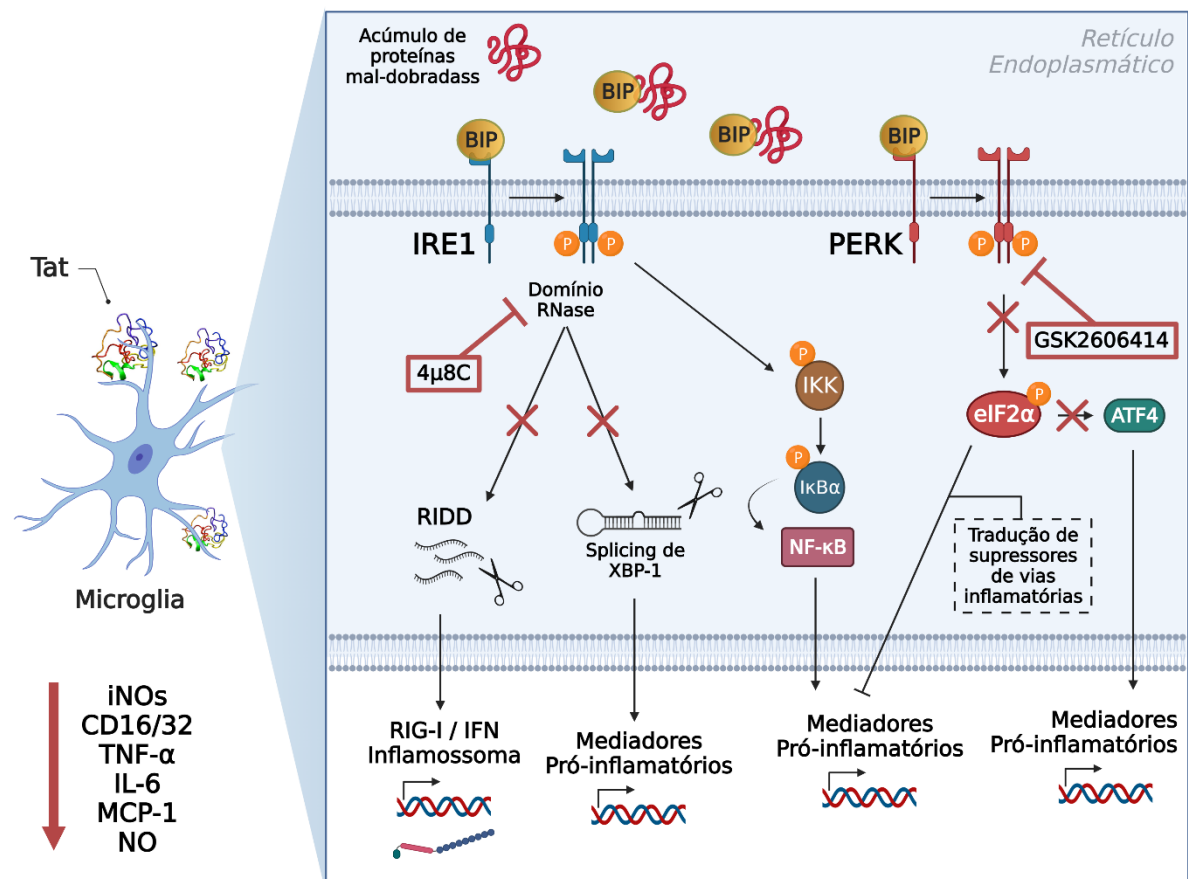


FIGURA 6.1. O papel da sinalização de IRE1 e PERK no estado de ativação inflamatória em células microgliais induzido por Tat. IRE1 regula a atividade inflamatória induzida por Tat através da fosforilação de IκK e translocação de NF-κB; em paralelo, o fator de transcrição XBP-1s, expresso após processamento transcricional pelo domínio RNase de IRE1 pode induzir a expressão de citocinas e outros mediadores inflamatórios. A atividade RNase de IRE1 (RIDD) pode levar diretamente a uma resposta inflamatória através da expressão de RIG-I, IFN-1 e ativação de Inflamossoma NPLR3. PERK modula respostas inflamatórias através da atenuação transcricional ocasionada pela fosforilação de eIF2α e depleção de supressores da sinalização inflamatória, como o inibidor de NF-κB, IκB. A atenuação transcricional leva à expressão do fator de transcrição de ATF4, induzindo a expressão de mediadores pró-inflamatórios. O bloqueio farmacológico do domínio RNase de IRE1 e PERK por 4μ8C e GSK2606414, respectivamente, reduziu a expressão de marcadores fenotípicos M1 (iNOs, NO, TNF-α, IL-6, MCP-1, CD16/32), indicando o envolvimento das vias de sinalização deflagradas pelos sensores IRE1 e PERK no balanço fenotípico de células BV-2 durante o estímulo de Tat circulante.

6.1 REFERÊNCIAS

BAGASHEV, Asen; SAWAYA, Bassel E. Roles and Functions of HIV-1 Tat Protein in the CNS: An Overview. *Virology Journal*, v. 10, n. 1, dez. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-10-358>>.

BEISEL, Cláudia; ZIEGLER, Susanne; ZAPATER, GLÓRIA; et al. TLR7-mediated activation of XBP1 correlates with the IFN-alpha production in humans. *Cytokine*, v. 94, p. 55–58, junho 2017. Disponível em: <[doi:10.1016/j.cyto.2017.04.006](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.04.006)>.

BORRAJO, Ana; PENEDO, Maria Aranzázu; OLIVARES, Jose Manuel; AGÍS-BALBOA, Roberto Carlos. Important role of microglia in HIV-1 associated neurocognitive disorders and the molecular pathways implicated in its pathogenesis, *Annals of Medicine*, v. 53, n. 1, p. 43-69, 17 setembro 2020. Disponível em: <<http://doi:10.1080/07853890.2020.1814962>>.

CHE, Xim, et al. HIV-1 tat-mediated apoptosis in human blood-retinal barrier-associated cells. *PLoS One*, v. 9, n. 4, p. 1-9, 16 abril 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095420>>.

CHEN, Di; DIXON, Brandon; DOYCHEVA, Desislava; et al. IRE1 α inhibition decreased TXNIP/NLRP3 inflammasome activation through miR-17-5p after neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *Journal of Neuroinflammation*, v. 15, n. 1, 2 fevereiro 2018. Disponível em: <<http://doi:10.1186/s12974-018-1077-9>>.

CHEN, Li; Li, Qian; SHE, Tiantian; et al. IRE1 α -XBP1 signaling pathway, a potential therapeutic target in multiple myeloma. *Leukemia Research*, v. 49, p. 7-12, outubro 2016. Disponível em: <doi:10.1016/j.leukres.2016.07.006>.

CHIPURUPALLI, Sandhya; SAMAVEDAM, Unni; ROBINSON, Nirmal. Crosstalk Between ER Stress, Autophagy and Inflammation. *Frontiers in Medicine*, v. 8, n. 758311, 5 novembro 2021. Disponível em: <[doi: 10.3389/fmed.2021.758311](http://doi:10.3389/fmed.2021.758311)>.

CIRONE, Mara. ER Stress, UPR Activation and the Inflammatory Response to Viral Infection. *Viruses*, v. 13, n. 5, p. 798, 29 abril 2021. Disponível em: <<http://doi:10.3390/v13050798>>.

GRAZIANO, Francesca; VICENZI, Elisa; POLI, Guido. Plastic Restriction of HIV-1 Replication in Human Macrophages Derived from M1/M2 Polarized Monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 100, n. 5, p. 1147-1153, 30 jun. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1189/jlb.4AB0316-158R>>.

GUNDU, Chayanika; ARRURI, Vijay; SHERKANE, Bhoomika; et al. GSK2606414 attenuates PERK/p-eIF2 α /ATF4/CHOP axis and augments mitochondrial function to mitigate high glucose induced neurotoxicity in N2A cells. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*, v. 3, p. 2590-2571, 22 janeiro 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.crphar.2022.100087>>.

GUTHRIE, Lauren; ABIRAMAN, Kavitha; PLYER, Emily; et al. Attenuation of PKR-like ER Kinase (PERK) Signaling Selectively Controls Endoplasmic Reticulum Stress-induced Inflammation Without Compromising Immunological Responses. *Journal of Biological Chemistry*, v. 291, n. 30, p. 15830-15840, 22 julho 2016. Disponível em: <<http://doi:10.1074/jbc.m116.738021>>.

LENCER, Wayne; DELUCA, Heidi; GREY, Michael; et al. Innate immunity at mucosal surfaces: the IRE1-RIDD-RIG-I pathway. *Trends in Immunology*, v. 36, n.7, p. 401-9, 1 julho 2015. Disponível em: <doi:10.1016/j.it.2015.05.006>.

MIDDE, Narasimha M.; GOMEZ, Adrian M.; ZHU, Jun. HIV-1 Tat Protein Decreases Dopamine Transporter Cell Surface Expression and Vesicular Monoamine Transporter-2 Function in Rat Striatal Synaptosomes. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, v. 7, n. 3, p. 629–639, 5 maio 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11481-012-9369-9>>.

MO, Zhen-Tao; LIAI, Yiu-Ling; ZHENG, Jie, LI, Wen-Na. Icaritin protects neurons from endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis after OGD/R injury via suppressing IRE1 α -XBP1 signaling pathway. *Life Science*, v. 255, n. 117847, agosto 2020. Disponível em: <<http://doi:10.1016/j.lfs.2020.117847>>.

ORIHUELA, Ruben; MCPHERSON, Christopher A; HARRY, Gaylia Jean. Microglial M1/M2 Polarization and Metabolic States. *British Journal of Pharmacology*, v. 173, n. 4, p. 649–665, 11 maio 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/bph.13139>>.

RYAN, Sean K; GONZALEZ, Michael V; GARIFALLOU, James P. Garifallou; BENNETT, Frederick C., *et al.* Neuroinflammation and EIF2 Signaling Persist despite Antiretroviral Treatment in an hiPSC Tri-culture Model of HIV Infection. *Stem Cell Reports*, v. 14, n. 5, p. 991-1010, 12 maio 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.02.010>>.

SMITH, Judith; TURNER, Matthew; DELAY, Mônica; *et al.* Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response are linked to synergistic IFN-beta induction via X-box binding protein 1. *European Journal of Immunology*, v. 38, n. 5, p.1194–203, 18 abril 2008. Disponível em: <<doi:10.1002/eji.200737882>>.

TANG, Yu; LE, Weidong. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*, v. 53, n. 2, p. 1181–1194, 20 jan. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5>>.

WHEELER, Michael; JARONEN, Merja; COVACU, Ruxandra; *et al.* Environmental control of astrocyte pathogenic activities in CNS inflammation. *Cell*, v. 76, n.3, p. 581-596, 24 janeiro 2021. Disponível em: <<doi:10.1016/j.cell.2018.12.012>>.

ZAULI, Giorgio, *et al.* The human immunodeficiency virus type-I Tat protein upregulates Bcl-2 gene expression in Jurkat T-cell lines and primary peripheral blood mononuclear cells. *Blood*, v. 86, n. 10 p. 3823-3834, 1995.

APÊNDICE A – Outros Trabalhos e Publicações Acadêmicas

CAMPESTRINI, Jéssica; SILVEIRA, Douglas Bardini; PINTO, Aguinaldo Roberto. HIV-1 Tat-induced bystander apoptosis in Jurkat cells involves Unfolded Protein Responses. *Cell Biochemistry and Function*, v. 36, n. 7, p. 377–386, 24 set. 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/cbf.3357>>.

SILVEIRA, Douglas Bardini; AMÉRICO, Monique Ferrary; FRITSCH, Hegger; TERENZI, Hernan; PINTO, Aguinaldo R. HIV-1 TAT modulates M1-M2 activation phenotype of BV-2 microglial cells. XXX Congresso Brasileiro de Virologia, Cuiabá-MT, 16 a 19 de outubro de 2019.

AMÉRICO, Monique Ferrary. Avaliação da potencial modulação da ativação microglial pelo eixo PERK da via UPR pela proteína TAT do HIV. Florianópolis, 2019. 52 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina. Coorientação.

APÊNDICE B – Método e Resultados da Produção de Tat Recombinante em Sistema de Expressão Eucarioto

Com a finalidade de selecionar somente células capazes de expressar a proteína de interesse, uma curva de seleção foi realizada para determinar a concentração limite do antibiótico Higromicina B 50 mg/mL (Sigma-Aldrich), que será o marcador de resistência das células pós-transfecção.

Uma garrafa de cultura celular contendo HEK293A (ATCC #CRL-157) em uma monocamada confluenta foi submetida a digestão de 1 mL de solução Tripsina/EDTA 0,25% (Cultilab) após ser lavada com *Phosphate Buffered Saline* 1X (PBS). Após inativar a ação da tripsina utilizando meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Thermo-Fischer) 10% Soro Fetal Bovino (SFB), 1% L-glutamina, 1% PSA (Anfotericina B Estreptomicina Penicilina, Sigma-Aldrich), as células foram submetidas a contagem em Câmara de Neubauer. O volume celular foi ajustado para a concentração de 1×10^5 células por mL para cada poço. Em seguida, preparou-se as concentrações de Higromicina B a partir de uma solução 50 mg/mL diluídas em meio DMEM 10% SFB, 1% L-glutamina, sem adição de PSA. As concentrações utilizadas foram 2,5, 5, 25, 50, 100, 200, 300, 500, 600 e 700 μ g. Por fim, as concentrações foram inoculadas em poços contendo as células, em duplicata. Como controle celular, utilizou-se somente meio de cultura nos poços.

Para a transfecção e expressão da proteína, células HEK293A (ATCC #CRL-157) foram transfectadas com o vetor de expressão pCMV-Tat-N-FLAG (grupo M, subgrupo B, cepa HXB2, 86 aa., #VG40246-NF, SinoBiological Inc) utilizando o reagente Lipofectamine2000® (Lifetechnologies) e o reagente Fosfato de Cálcio (Lifetechnologies). Uma garrafa contendo uma monocamada de células HEK293A foi submetida a uma digestão de 1 mL de solução Tripsina/EDTA 0,25% (Cultilab) e em seguida inativada com 4 mL de Soro Fetal Bovino (SFB, Cultilab). Em seguida, as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos e ressuspendidas do pellet formado para serem submetidas a contagem em câmara de Neubauer. O volume total de células foi ajustado com meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma-Aldrich) 10% SFB, 1% L-glutamina, 1% PSA para a concentração de 2×10^5 células/mL para cada poço em uma placa de 6 poços. Três dias após, 150 μ L de plasmídeo foi adicionado a 150 μ L de reagente Lipofectamine2000® (LifeTechnologies) diluídos em meio Opti-MEM e incubados por 5 minutos a

temperatura ambiente. Logo após, adicionou-se o complexo às células nos poços e incubou-se em estufa 37°C, atmosfera de 5% CO₂. A proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*) foi utilizada como controle positivo da transfecção, sendo visualizada em microscópio de fluorescência, e células não transfectadas com o plasmídeo foram utilizadas como controle negativo. A cada 3 dias a troca do meio de cultura era realizada e uma semana após a transfecção, subculturas foram semeadas em garrafas de cultura celular com repique a cada 3 dias.

Para a transfecção utilizando fosfato de cálcio, o mesmo protocolo de plaqueamento de células e concentração celular foram utilizados. Para cada poço contendo células em uma placa, adicionou-se 18µl de CaCl₂ 2M a 10 µg de plasmídeo pCMV-Tat-N-FLAG (grupo M, subgrupo B, cepa HXB2, 86 aa., #VG40246-NF, *SinoBiological Inc*) em 150 µl de água estéril. Em seguida, adicionou-se essa solução a 150 µl de *Hepes Buffered Saline* (HBS) 2X lentamente com uma pipeta ao mesmo tempo em que com outra pipeta borbulhou-se ar. Como resultado, houve formação de um precipitado, que é incubado a 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se o precipitado lentamente ao poço contendo células e incubou-se em estufa estufa 37°C, atmosfera de 5% CO₂ *overnight*. No dia seguinte, removeu-se o meio de cultura do poço e realizou-se uma lavagem utilizando *Phosphate Buffered Saline* 1X (PBS). Uma solução Glicerol 15% foi preparada em HBS 1X previamente, que foi adicionada 2mL para cada poço contendo células, incubando em temperatura ambiente a placa por 2 minutos logo em seguida. Então foi removida a solução Glicerol 15%, utilizando pipeta, realizou-se uma lavagem com PBS 1X e adicionou-se 2mL de meio de cultura DMEM 10% SFB, 1% L-glutamina, 1% PSA em cada poço, incubando-se em estufa em seguida. Como controle positivo foi utilizada a proteína GFP sendo observada em microscopia de fluorescência e como controle negativo, células não transfectadas com o plasmídeo. A cada 3 dias realizou-se a troca do meio de cultura da placa. Subculturas foram semeadas em garrafas de cultura celular com repique a cada 3 dias.

A purificação da proteína recombinante foi realizada por meio do kit comercial FLAG® M Purification Kit (Sigma-Aldrich) conforme instruções do fabricante e a quantificação da proteína da fração purificada realizada pelo método de absorbância em 280nm através do equipamento Nanodrop™ (Thermo-Fisher Scientific).

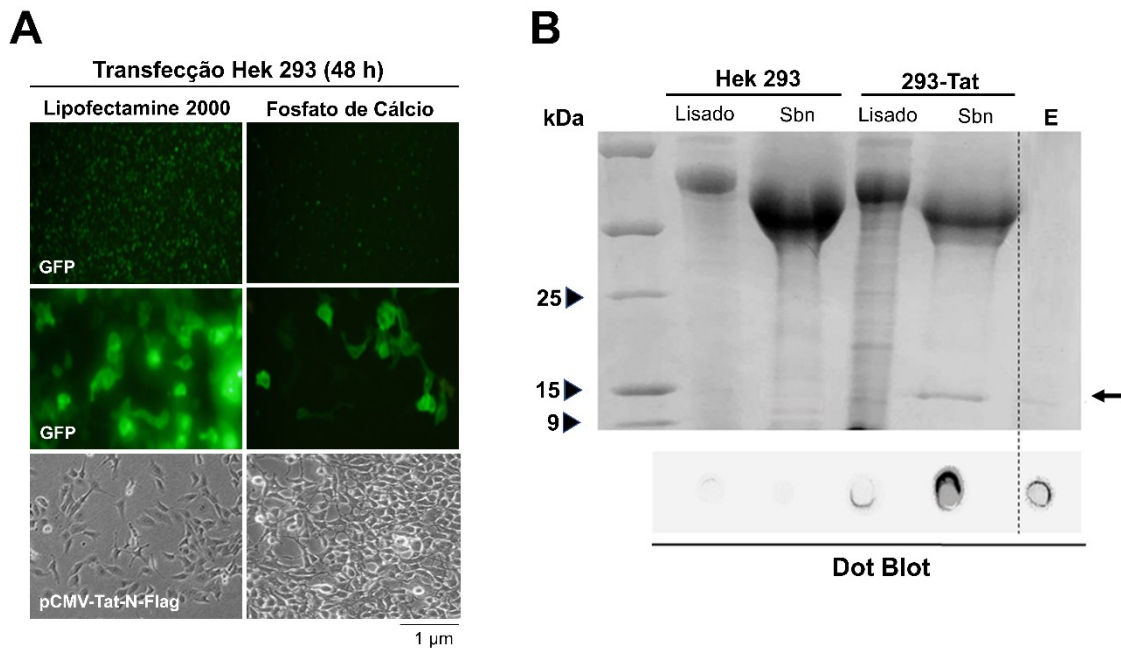


FIGURA 1 APÊNDICE B. Transfecção e expressão de Tat recombinante em células Hek 293. A. Células Hek 293 foram transfectadas conforme os protocolos para Lipofectamine 2000 e Fosfato de Cálcio descritos; imagens representam ensaios de transfecção com plasmídeos controle com gene repórter para GFP (painéis superiores) e com o plasmídeo pCMV-Tat-N-Flag (painéis inferiores). B. Perfil de expressão proteica em gel de poliacrilamida e identificação imunocromatográfica do epítipo *Flag* por *Dot Blot* de lisados e sobrenadantes (Sbn) de células Hek 293 e transientemente transfectadas com pCMV-Tat-N-Flag (293-Tat) e fração obtida por cromatografia de afinidade (E).

TABELA 1 APÊNDICE B. Avaliação de rendimento da proteína Tat recombinante expressa em um modelo eucarioto.

Etapa	Volume	Proteína	Tat	Rendimento
Lisado células 293-Tat	10 mL	6 mg	-----	6 mg/L
Sobrenadante células 293-Tat	120 mL	18 mg	-----	150 mg/L
Eluído Cromatografia de Afinidade	6 mL	-----	1,2 μ g	10 μ g/L

APÊNDICE C – Curvas de dissociação e parâmetros utilizados para análise e validação dos iniciadores utilizados nos experimentos de RT-qPCR

TABELA 1 APÊNDICE C. Valores dos parâmetros considerados na validação dos pares de iniciadores utilizados.

Gene	R ²	Inclinação da Reta (<i>Slope</i>)	Eficiência
PERK	0,979	- 3,41	96,4%
ATF6	0,996	- 3,54	91,5%
EIF2 α	0,984	- 3,35	98,8%
XBP1-s	0,997	- 3,29	101,3%
XBP1-u	0,977	- 3,47	94,1%
BIP	0,980	- 3,41	96,4%
ATF4	0,943	- 3,58	90,2%
CHOP	0,982	- 3,51	92,7%
GADD34	0,981	-3,51	92,7%
Arg-1	0,993	- 3,56	90,9%
iNOs	0,971	- 3,453	94,8%
GAPDH	0,971	- 3,487	96,8%
HPRT	0,949	- 3, 573	90,5%
18S	0,999	- 3, 312	100,4%

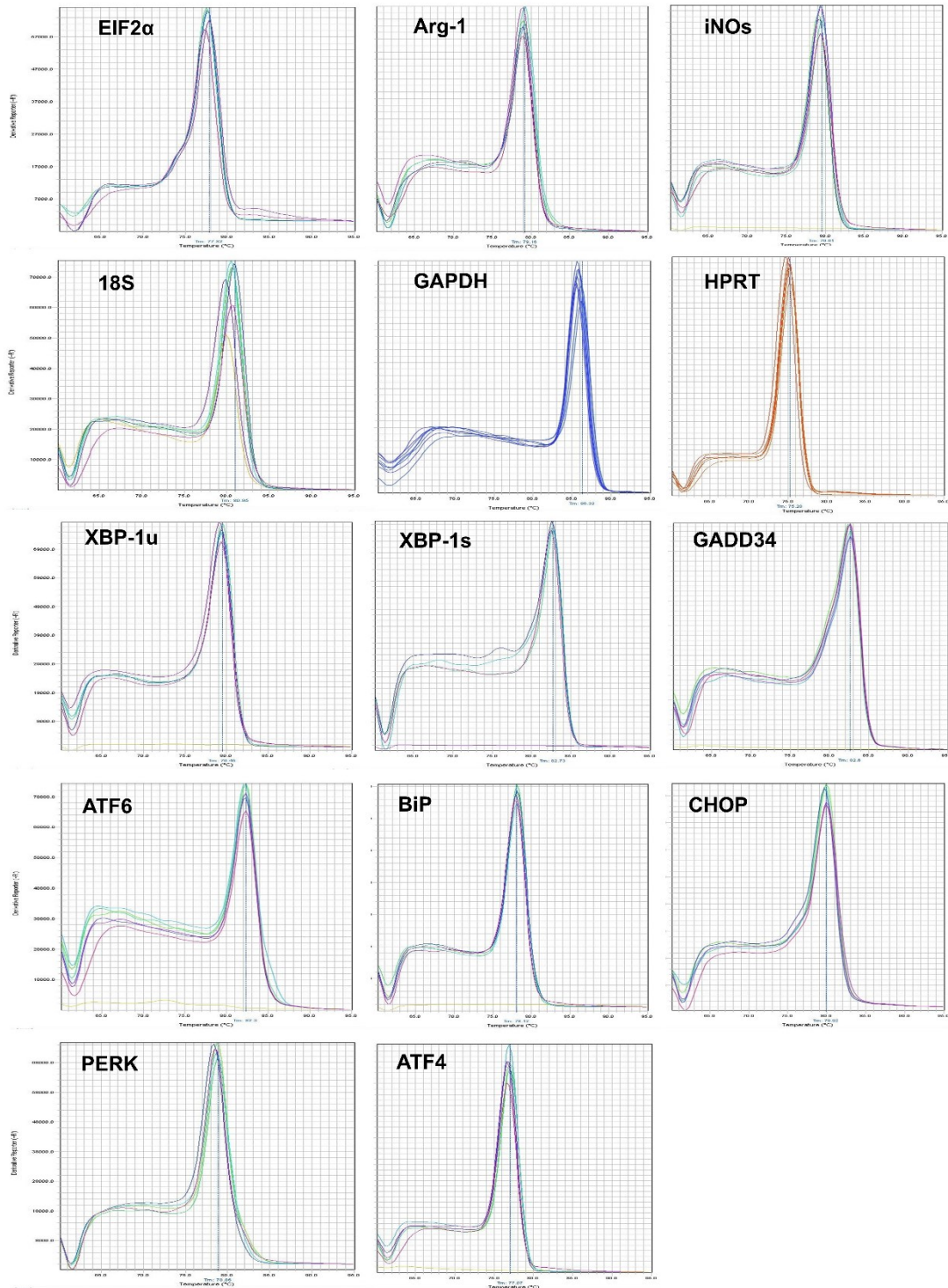


FIGURA 1 APÊNDICE C. Curvas de dissociação observadas nos experimentos de RT-qPCR para os iniciadores utilizados. Perfis de dissociação empregados na análise de especificidade dos iniciadores de cada gene. Gráficos gerados a partir do programa *StepOnePlus™ Software v.2.3*.

APÊNDICE D – Imagens não editadas dos *Western Blots* utilizados para a montagem das Figuras apresentadas nos Capítulos 3 e 4

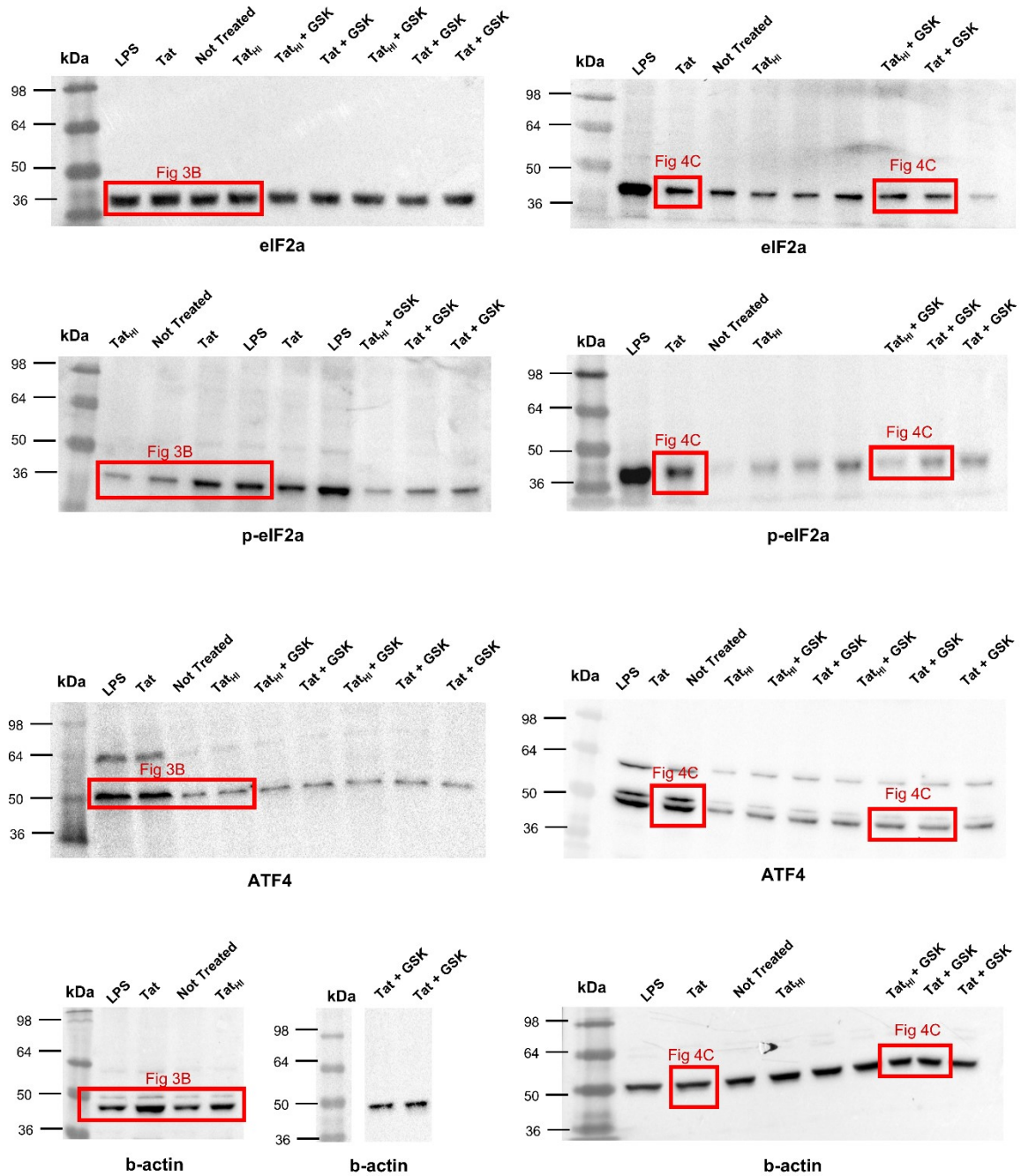


FIGURA 1 APÊNDICE C. Imagens não editadas dos *Western Blots* apresentados no Capítulo 3. Imagens geradas a partir do programa *Image Lab 6.0.1* (Bio-Rad) após captura no aparelho *ChemIDoc MP Imaging System*, apresentando as marcações de peso molecular e indicações dos campos utilizados na montagem das Figuras.

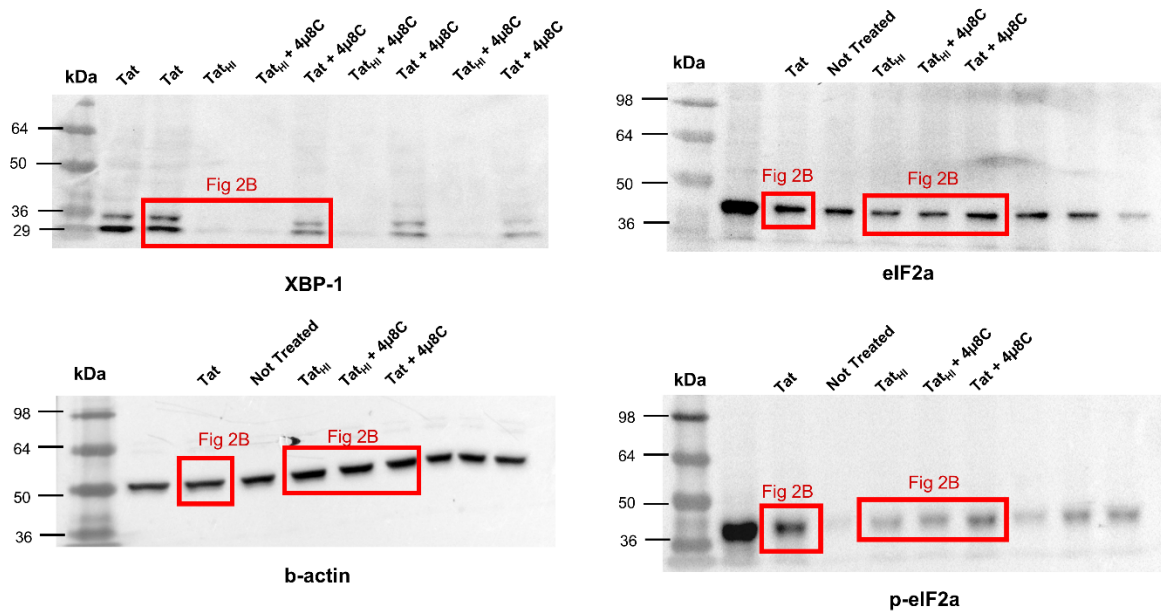


FIGURA 2 APÊNDICE D. Imagens não editadas dos *Western Blots* apresentados no Capítulo 3. Imagens geradas a partir do programa *Image Lab 6.0.1* (Bio-Rad) após captura no aparelho *ChemiDoc MP Imaging System*, apresentando as marcações de peso molecular e indicações dos campos utilizados na montagem das Figuras.

