

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Desenvolvimento Tecnológico

Curso de Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**Papel da proteína Nef de HIV-1 na modulação negativa da expressão de
MHC-I.**

Roberta Maraninchi Silveira

Pelotas, 2015

ROBERTA MARANICHI SILVEIRA

Papel da proteína Nef de HIV-1 na modulação negativa da expressão de MHC-I.

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador Acadêmico: Prof. Dr. Luciano Da Silva Pinto

Orientador de Estágio: Prof. Dr. Luis Lamberti P. da Silva

Pelotas, 2015

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

S587p

Silveira, Roberta Maraninchi

Papel da proteína Nef de HIV-1 na modulação negativa da expressão de MHC-I / Roberta Maraninchi Silveira. – 46f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2015. – Orientador Luciano da Silva Pinto ; coorientador Luis Lamberti Pinto da Silva.

1.Biotecnologia. 2.HIV. 3.Nef. 4.γ-adaptina. 5.HLA-A2.
6.Regulação negativa. I.Pinto, Luciano da Silva. II.Silva, Luis Lamberti Pinto da. III.Título.

CDD: 616.979201

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luciano Da Silva Pinto, Universidade Federal de Pelotas

Dr. Vinicius Farias Campus, Universidade Federal de Pelotas

Msc. Francine Alves Sinnott, Universidade Federal de Pelotas

Dedico esse trabalho aos meus pais, Ricardo Silveira e Stela Maraninchi e às minhas irmãs Luciana e Renata, pela dedicação e apoio que recebi durante toda a minha vida e o período de graduação, sem eles, jamais teria chegado até aqui.

Agradecimentos

Primeiramente, à minha família, meu pai Ricardo Silveira, minha mãe Stela Maraninchi, e minhas irmãs, Luciana e Renata, por sempre acreditarem em mim, no meu potencial, pela ajuda e apoio nas alegrias e nas horas mais difíceis, e por representarem a base de tudo o que sou hoje. Amo muito vocês.

À minha amiga, Ana Carpe, por me incentivar e sempre acreditar no meu potencial, por ser uma pessoa alegre e positiva e sempre me dar bons conselhos.

À Universidade Federal de Pelotas e aos professores do Núcleo de Biotecnologia do CDTec, pela dedicação em capacitar seus estudantes.

À Prof^a. Dr^a. Cláudia Pinho Hartleben, minha orientadora acadêmica durante dois anos do período de graduação, obrigada pela confiança para a realização dos trabalhos, pela oportunidade de poder fazer parte do Laboratório de Imunodiagnóstico como iniciação científica, por me ajudar a crescer profissionalmente e pessoalmente durante o tempo de estágio.

Ao Dr. Leonardo Garcia Monte, à Dr^a. Thaís Collares, à Msc. Francine Sinotti e à Bárbara Roloff por todos os ensinamentos, pelo incentivo e conhecimentos adquiridos, sempre acreditando no meu potencial. Obrigada por todos os conselhos e ensinamentos transmitidos.

Ao meu orientador acadêmico, professor Dr. Luciano Da Silva Pinto, por me acolher tão rapidamente e aceitar ser meu orientador no final da graduação, por todo o apoio e ajuda recebida.

Ao meu orientador de estágio, professor Dr. Luis Lamberti P. Silva, por me receber no laboratório, por todo o apoio, ensinamentos, confiança depositada em mim para a realização dos trabalhos. E a todos os amigos do Laboratório de Tráfego Intracelular de Proteínas, Lucas, Julianne, Estela, Érica, Andréia, Yunan, Mara, Leonardo, Luciana e Natália, pelo acolhimento, e por me proporcionarem muitos momentos de alegria, e por todo o aprendizado.

Agradeço também à banca examinadora por aceitarem o convite para a participação na avaliação, pelas críticas e sugestões que contribuirão para o engrandecimento do trabalho.

Aos amigos que a Biotecnologia me proporcionou, Carlos, Júlia, Mariana, Amanda, Maurício, Monize, Luiza, Bruno, Marina, Giovanni e Rodolfo,

que sempre estiveram comigo durante toda a graduação, dividindo alegrias, as preocupações com os trabalhos e provas, pela amizade e companheirismo;

E, por fim, agradeço às instituições que contribuíram para a minha formação, a UFPel, o CDTec, a Biotecnologia, ao CNPq e a FMRP-USP.

Muito obrigada!

Realize o seu sonho, você mesmo vai ter que fazer isso eu não posso acordar você. Você é quem pode se acordar. Por que nós estamos no mundo? Certamente não para viver com medo e dor. Nós todos brilhamos como a lua, as estrelas e o sol.

(John Lennon)

Resumo

SILVEIRA, Roberta Maraninchi. **Papel da proteína Nef de HIV-1 na modulação negativa da expressão de MHC-I.** 2015. 68f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, 2015.

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é o agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). A progressão da infecção pelo HIV-1 em humanos e em modelos animais está ligada à função de Nef (*negative factor*), que é uma proteína acessória do HIV-1 envolvida em processos de evasão do sistema imune. Dentre as diferentes ações desta proteína, está a modulação negativa da expressão de proteínas importantes na resposta imunológica, tais como CD4 e MHC-I. Nef altera o tráfego intracelular de moléculas de MHC-I, retendo esta molécula no Complexo de Golgi e redirecionando-a para degradação em lisossomos. O objetivo geral deste trabalho foi estudar o papel de Nef em alterar o tráfego de MHC-I (HLA-A2). Neste trabalho, foram realizados experimentos que visam elucidar a participação das isoformas γ adaptina de AP-1 ($\gamma 1$ e $\gamma 2$) neste processo. Análises por imunofluorescência indireta e citometria de fluxo revelaram que apenas AP-1 $\gamma 1$, mas não AP-1 $\gamma 2$, é essencial para Nef regular negativamente HLA-A2, sugerindo que essas duas isoformas de γ adaptina possam desempenhar funções distintas no tráfego intracelular. O melhor entendimento destes processos revelará aspectos relevantes, ainda desconhecidos sobre o papel de Nef na célula, gerando informações importantes para melhor compreensão dos mecanismos de patogênese do HIV.

Palavras-chave: HIV; Nef; γ -adaptina; HLA-A2; regulação negativa

Abstract

Silveira, Roberta Maraninchi. **Mechanisms involved in the downregulation of the main complex of histocompatibility molecules expression of type I (MHC-I) by Nef from HIV-1.** 2015. 68f. Work Completion of course – Bacharel Degree in Biotechnology. Federal University of Pelotas, 2015.

The Human Immunodeficiency Virus (HIV) is the etiologic agent of Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). The progression of HIV-1 in humans and animal models is connected to the function of Nef (negative factor), which is an accessory protein of HIV-1 involved in immune system evasion processes. Nef has different roles, like the downregulation of key proteins in the immune response, such as CD4 and MHC-I. Nef alters the intracellular traffic of MHC-I molecules, retaining this molecule in the Golgi apparatus and redirecting it for degradation by lysosomes. The aim of this work was to study the role of Nef in altering the MHC-I traffic (HLA-A2). In this work, experiments were made in order to elucidate the involvement of γ adaptin isoforms of AP-1 ($\gamma 1$ and $\gamma 2$) in this process. Indirect immunofluorescence and flow cytometry analysis revealed that only AP-1 γa , but not AP-1 $\gamma 2$, it is essential to downregulate HLA-A2 by Nef from HIV-, suggesting that these isoforms may play different roles in the intracellular trafficking. A better understanding of this process will reveal novel aspects, still unknown, about the role of Nef on the cell, generating important information for better understanding the mechanisms of HIV pathogenesis.

Keywords: HIV; Nef; γ adaptin; HLA-A2; downregulation.

Lista de Figuras

Figura 1 Prevalência em adultos entre 15 a 49 anos com HIV em 2013.....	04
Figura 2 Representação esquemática do vírus HIV-1 maduro.....	05
Figura 3 Modelo de entrada do HIV na célula hospedeira.....	06
Figura 4 Modelo estrutural de Nef HIV-1, localização dos motivos funcionais..	07
Figura 5 Avaliação da eficiência do silenciamento das proteínas AP-1 γ 1 e AP-1 γ 2	19
Figura 6 Modulação negativa de HLA-A2 da superfície celular pela proteína Nef do HIV-1 e a participação das subunidades γ 1 e γ 2 adaptinas neste processo.....	20
Figura 7 Nef induz a redistribuição de HLA-A2 da superfície celular.....	21
Figura 8 A ausência de AP-1 γ 1 impede a regulação negativa de HLA-A2 por Nef.....	22
Figura 9 A ausência de AP-1 γ 2 não impede a regulação negativa de HLA-A2 por Nef.....	23

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sequências de siRNA das proteínas γ 1 ou γ 2-adaptinas.....	14
Tabela 2. Anticorpos utilizados para <i>Western Blot</i>	17
Tabela 3. Anticorpos utilizados para Citometria de Fluxo.....	17
Tabela 4. Anticorpos utilizados para Imunofluorescência.....	17

Lista de Abreviaturas e Siglas

AIDS - *Acquired Immune Deficiency Syndrome*
AP - complexo de proteínas adaptadoras
APC - marcador fluorescente alofococianina
APS - persulfato de amônia
ARV - *AIDS Associated Retrovirus*
CTL - linfócito T citotóxico
ECL - *Enhanced luminol-based chemiluminescent*
Env - proteínas do envelope do HIV
HIV - *Human Immunodeficiency Virus*
HLA - antígeno leucocitário humano
IN - integrase
MHC - complexo principal de histocompatibilidade
miRNA - micro RNA
Nef - *negative factor*
NK - células *natural killer*
PBS - *Phosphate Buffered Saline*
PFA - paraformaldeído
RE - retículo endoplasmático
RNAi - RNA de interferência
RNAm - RNA mensageiro
RT - transcriptase reversa
siRNA - *small interfering RNA*
SIV - *Simian Immunodeficiency Virus*
TA – Temperatura Ambiente
TGN - rede trans-Golgi

SUMÁRIO

1. Introdução	01
2. Revisão Bibliográfica	03
2.1. HIV e AIDS – Histórico e epidemiologia	03
2.2. HIV-1 e a biologia do vírus	04
2.3. Nef, características e funções	07
2.4. Mecanismos de modulação de MHC-I induzidos por Nef.....	09
2.5. As proteínas adaptadoras, as suas subunidades e suas funções.....	11
3. Objetivo Geral	12
4. Objetivos específicos	12
5. Metodologia	12
5.1. Linhagem e cultivo celular.....	12
5.2. Propagação plasmideal.....	13
5.3. Silenciamento de AP-1 γ 1 e AP-1 γ 2 em células HeLa CCL2 e transfecção.....	13
5.5. <i>Western Blot</i> e detecção de proteínas.....	14
5.6. Citometria de Fluxo.....	15
5.7. Imunofluorescência Indireta.....	16
5.8. Anticorpos.....	17
5.9. Análise de dados.....	17
6. Resultados e Discussão.....	18
6.1. <i>Western Blot</i>	18
6.2. Citometria de fluxo.....	19
6.3. Imunofluorescência Indireta.....	20
7. Conclusão e perspectivas.....	25
Referências.....	56

1 INTRODUÇÃO

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), foi descrita pela primeira vez em 1981, pelo Center for Disease Control and Prevention (CDC) dos Estados Unidos da América, após relatos de imunodeficiência grave em homossexuais do sexo masculino (GOTTLIEB et al., 1981). Entre 1983 e 1984, o agente etiológico da AIDS foi identificado após o isolamento de um retrovírus proveniente do sangue de pacientes infectados (BARRÉ-SINOUSSE et al., 1983; LEVY et al., 1984).

O HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) já foi identificado em diversos órgãos, tecidos e fluidos humanos (sangue, tecido cerebral, fluido cérebro-espinhal, sêmen, leite, líquido amniótico e secreções vaginais). Esse vírus, comumente, é transmitido por contato sexual, material perfuro-cortante infectado, transfusões sanguíneas, compartilhamento de agulhas e seringas contaminadas, e aleitamento materno. A via sexual é a maneira mais comum de transmissão do HIV-1 e ocorre em 85% dos casos (UNAIDS 2007).

A infecção pelo HIV afeta o sistema imune e a maior parte das manifestações clínicas dessa doença é decorrente da perda gradual e progressiva de linfócitos T CD4+ e subsequente comprometimento da resposta imune do indivíduo, permitindo assim, o aparecimento de infecções oportunistas (SHEARER, 1998). A progressão da doença é lenta e a infecção pelo HIV é crônica (LEVY, 1998; PRUSINER, 2002).

A progressão da infecção pelo HIV-1 em humanos e em modelos animais está ligada à função de Nef, que é uma proteína acessória do vírus e está envolvida em vários procedimentos de evasão do sistema imune (ROETH & COLLINS 2006; FREED 2015). Dentre as ações desta proteína acessória, está a modulação negativa da expressão de diversas proteínas importantes na resposta imunológica, tais como CD4 e MHC-I. A diminuição de MHC-I faz com que não ocorra o reconhecimento e a lise de células infectadas pelos linfócitos T citotóxicos, pois Nef altera o tráfego normal da molécula de MHC-I permitindo a retenção desta no Complexo de Golgi e, logo em seguida, sendo redirecionada para a degradação em lisossomos (ROETH & COLLINS 2006; FREED 2015).

Por isso, o objetivo geral deste trabalho foi estudar e entender melhor os mecanismos da proteína Nef para alterar o tráfego intracelular de MHC-I (HLA-A2) regulando-o negativamente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HIV e AIDS – Histórico e epidemiologia

Por volta de 1981, a AIDS foi reconhecida em vários países, nessa época a doença foi reportada principalmente em homens homossexuais com múltiplos parceiros. No entanto, estudos posteriores mostraram que a transmissão se dá através do sangue, leite materno, sêmen e outros fluidos corporais, e também pelo compartilhamento de seringas contaminadas com o vírus (BARRE-SINOUSI et al., 1983).

Os pacientes com AIDS apresentam o sistema imune celular debilitado e estudos demonstraram que a célula T CD4⁺ é o alvo preferencial do agente infeccioso (BARRE-SINOUSI et al., 1983). O comprometimento imunitário celular pode resultar em sérias infecções oportunistas em pacientes com AIDS, como, por exemplo, o sarcoma de Kaposi. A princípio, os surtos foram nomeados GRID (do inglês, *gay-related immune deficiency*). Posteriormente, essa nova doença do sistema imune foi designada como Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Em 1983, o agente etiológico da AIDS foi isolado do sangue de pacientes infectados e nomeado Vírus Associado à Linfadenopatia (BARRE-SINOUSI et al., 1983). Em 1987, o vírus foi finalmente designado como Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1 (HIV-1) (COFFIN et al., 1986). O HIV é capaz de infectar e exterminar as células T CD4⁺, levando o paciente a um estado debilitado do sistema imune (KLATZMANN et al., 1984).

Estima-se que 0,8% dos adultos de 15-49 anos no mundo todo estão vivendo com HIV, embora o ônus da epidemia continue a variar consideravelmente entre os países e regiões. A África Subsaariana continua sendo o local mais severamente afetado, com quase 1 em cada 20 adultos vivendo com HIV e respondendo por quase 71% das pessoas que vivem com HIV em todo o mundo (WHO 2013), conforme Figura 1.

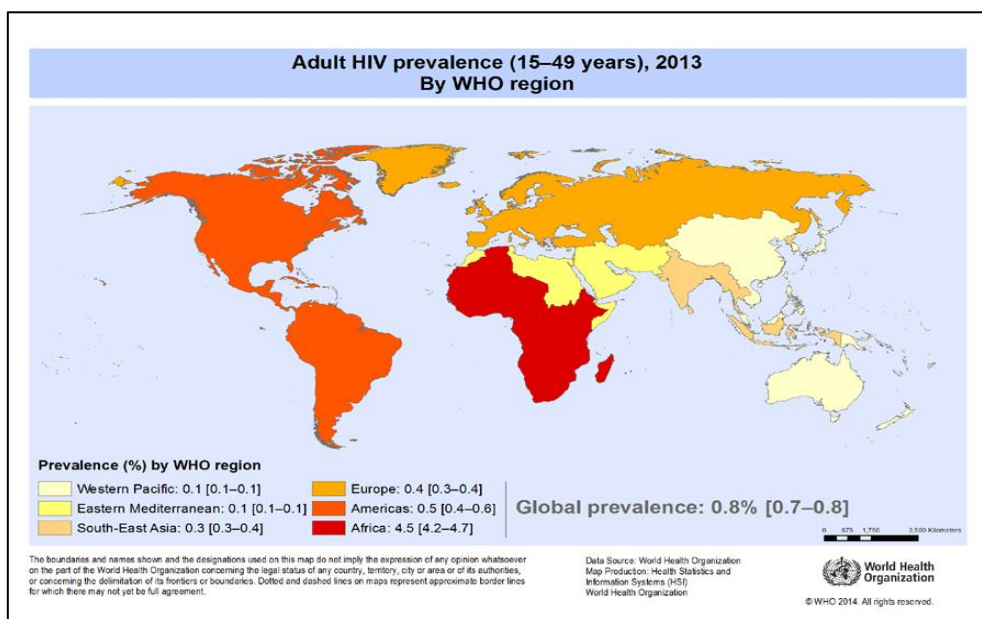


Figura 1: Prevalência em adultos entre 15 a 49 anos com HIV em 2013. (Modificado de WHO 2013).

O HIV-1, é a causa mais comum da AIDS, e tem infectado entre 31 a 59 milhões de indivíduos no mundo, sendo que a taxa de infecção é estimada em aproximadamente em 6 milhões de indivíduos por ano (UNAIDS, 2012). Mesmo sendo a África Subsaariana, o epicentro global para essa doença, ela também tem sido frequente em países da ex-União Soviética e em partes do sul e sudoeste da Ásia, incluindo Índia e China, onde existem centenas de milhões de indivíduos potencialmente em risco (UNAIDS, 2007).

2.2 HIV e a biologia do vírus

O HIV é pertencente ao gênero *Lentivirus* e da família *Retroviridae*. Existem dois tipos do vírus HIV, o HIV-1 e o HIV-2, sendo que o primeiro é o mais virulento, expõe maior taxa de mutação, maior variabilidade genética, e é o mais disseminado pelo mundo (FREED 2015). Em contrapartida, HIV-2 é menos virulento e a sua incidência é quase exclusiva no oeste da África,

entretanto, já foi capaz de difundir-se para outras regiões da África, Europa, Índia e Estados Unidos. Esses dois tipos de HIV se diferenciam pelos seus genomas. HIV-1 e HIV-2 foram introduzidos na população humana por transmissão zoonótica durante a primeira metade do século XX e são, portanto, patógenos humanos recentes (HAN et al., 2000).

Biológica e estruturalmente, a partícula viral apresenta-se em formato icosaédrico com o diâmetro que varia entre 80-110 nanômetros e um genoma de aproximadamente 9,8 kb. O HIV possui um envelope viral composto por uma bicamada lipídica contendo fosfolipídios, que é oriunda de uma célula hospedeira, além de conter proteínas na sua superfície, como por exemplo, gp120 e gp41, as quais são responsáveis por mediar a entrada do vírus na célula-alvo (BARRÉ-SINOUSI 1996; SIERRA et al., 2005). Além disso, no interior da bicamada, a proteína do nucleocapsídeo encapsula duas cópias do genoma viral de RNA fita simples, várias proteínas virais como: protease viral (PR), transcriptase reversa (RT), integrase (IN), e proteínas acessórias como Vpu, Vif, Vpr e Nef, entre outras da célula hospedeira (GELDERBLOM et al., 1989), conforme pode ser observado na Figura 2.

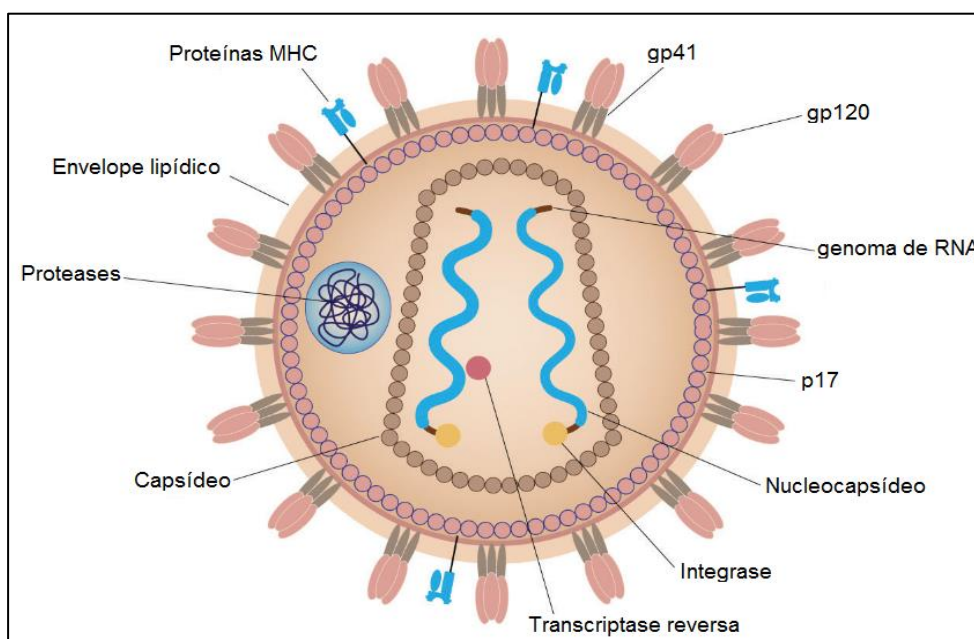


Figura 2: Representação esquemática do vírus HIV-1 maduro. A figura indica as proteínas virais nas suas devidas posições, a bicamada lipídica e o RNA genômico. (Modificado de http://images.flatworldknowledge.com/tye/tye-fig13_007.jpg. Acessado em 22/11/2015).

O ciclo da replicação do HIV-1 pode ser dividido em duas fases, uma inicial e a outra final. A fase inicial, engloba os eventos que ocorrem desde a

ligação do vírus na superfície da célula-alvo até a integração do cDNA viral dentro do genoma desta célula. Esses eventos iniciais compreendem a ligação do vírus às moléculas receptoras da superfície celular, a entrada do material genético na célula-alvo, a transcrição reversa do RNA viral para cDNA, o descapsulamento do capsídeo viral, a importação nuclear do cDNA do HIV e a integração do DNA viral no cromossomo da célula hospedeira. Já na fase final, são eventos que ocorrem a partir da expressão do gene para a liberação e maturação de novos vírus. Essa fase final inclui a transcrição dos genes virais, exportação dos RNAs virais do núcleo para o citoplasma, tradução de RNAs virais para produzir proteínas precursoras que participam da construção do envelope viral, permitindo o brotamento dos novos vírus da célula infectada, e posterior maturação do HIV (FREED, 2015).

O começo da infecção na célula hospedeira ocorre graças a interação entre a proteína gp120 do envelope viral e a molécula CD4 da superfície celular, fazendo com que ocorram modificações estruturais em gp120 (COHEN, *et al.*, 1998; TILTON & DOMS 2010), permitindo um aumento da afinidade da proteína gp120 com os co-receptores da membrana plasmática da célula-alvo, CCR5 ou CXCR4 (BERGER *et al.*, 1999). Os receptores de quimiocinas são cofatores importantes para a entrada do vírus na célula. Essas interações proteicas são fundamentais para que o vírus consiga introduzir o seu material genético no interior da célula hospedeira (COHEN 1997; GAO *et al.*, 1994; MELIKYAN 2014), conforme pode ser observado na Figura 3.

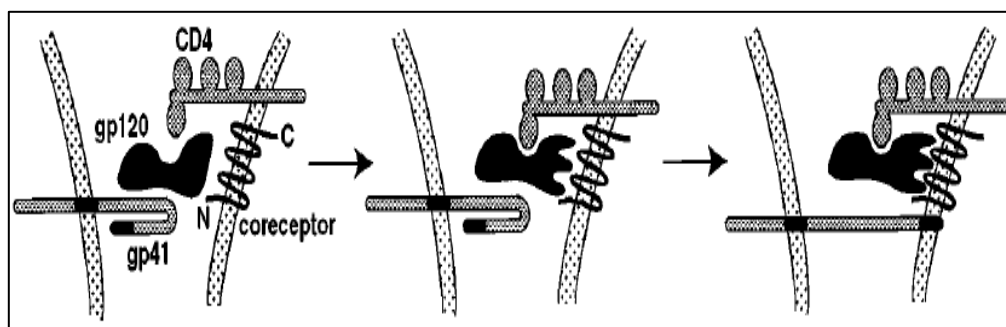


Figura 3: Modelo de entrada do HIV na célula hospedeira. Representação esquemática demonstrando que após a ligação à molécula de CD4, a proteína gp120 sofre alteração conformacional que expõe o sítio de ligação ao co-receptor. Ainda pode-se observar que a interação de gp120 com o co-receptor, desencadeia uma mudança conformacional em Env (moléculas do envelope viral), levando a exposição de gp41, acarretando na fusão do HIV com a membrana da célula-alvo (Modificado de BERGER 1999).

Logo após o ingresso do HIV na célula-alvo, o RNA genômico do vírus é transcrito reversamente em cDNA pela enzima transcriptase reversa viral e, em seguida, se integra no genoma da célula hospedeira com o auxílio da integrase. Dessa forma, o vírus pode conservar-se em estado latente quando integrado ao genoma por uma grande quantidade de tempo, antes de ser transcrito, replicado, formado e liberado pela célula hospedeira, sendo que logo após a sua saída e maturação, estará pronto para atingir novas células-alvo (FREED, 2015).

2.3 Nef, características e funções

A proteína acessória Nef (*negative factor*) originalmente recebeu esta designação devido a um efeito desta proteína, o qual seria responsável por inibir a replicação viral (CHENG-MAYER et al., 1989). No entanto, foi demonstrado que Nef é capaz de promover a persistência viral agindo como um fator positivo para a infecção (MILLER et al., 1994a; MILLER et al., 1994b). Estruturalmente, Nef é composto por seis α -hélices (α -1 a α -6) e por cinco folhas β pregueadas antiparalelas (β -1 a β -5) (GRZESIEK et al., 1996), conforme pode ser observado na Figura 4.

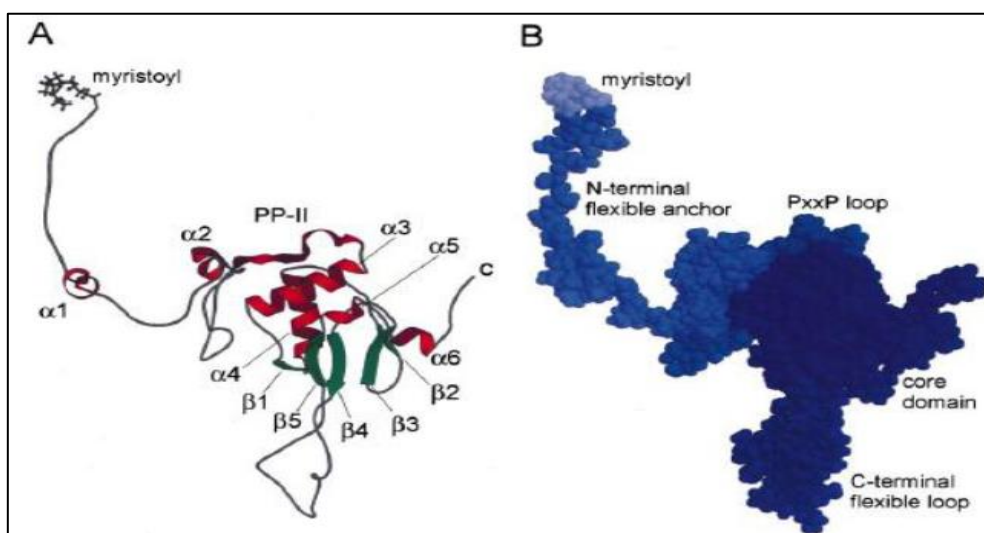


Figura 4: Modelo estrutural de Nef HIV-1, localização dos motivos funcionais. Representação esquemática, onde há uma parte miristoilada na região N-terminal, uma região âncora flexível na porção N-terminal (do aminoácido 2 ao 55), uma região contendo um loop PXXP (do aminoácido 57 ao 80), o domínio central (do aminoácido 81 ao 206) e o loop flexível da região C-terminal (do aminoácido 148 ao 180). (A) Representação em fitas. (B) Representação em conformação espacial (Adaptado de GEYER 2001).

A proteína acessória Nef tem sido extensivamente estudada e é um fator determinante para a patogênese viral. (BLAGOVESHCHENSKAYA et al. 2002).

A infecção por HIV pode ser dividida em três principais estágios: o primeiro é a de progressão rápida, em que a AIDS se desenvolve dentro de três anos após a infecção. O segundo é a progressão intermediária, onde o vírus se desenvolve lentamente em um período que varia de três a dez anos após a soroconversão. E o terceiro tipo, o qual é o longo prazo da não progressão (termo do inglês *long term non-progressor*, LTNP), onde os pacientes infectados pelo HIV mantêm uma alta concentração de CD4 e CD8 em células T por longo período de tempo, 10 anos ou mais, na ausência de tratamento (ZELLER et al., 1996; KUMAR 2013). O grupo de pacientes LNTP compreende menos de 5% do total da população com HIV. Em alguns casos reportados, o vírus, nestes pacientes, apresenta deleção em uma região específica do gene *nef*, e isso acarreta no comprometimento da função da proteína Nef, e, conseqüentemente, no não desenvolvimento da doença, demonstrando, assim, que Nef possui papel determinante na patogênese viral (CARL et al., 2000).

Nenhuma atividade enzimática foi atribuída diretamente à proteína Nef. No entanto, distintos estudos apontaram vários motivos conservados de Nef que medeiam a associação física com fatores celulares (ROETH & COLLINS 2006). Conseqüentemente, tem sido levantada a hipótese de que Nef funciona como um adaptador molecular, alterando vias celulares através de inúmeras interações proteína-proteína. Como decorrência, Nef é capaz de modular diversas funções celulares, tais como eventos de tráfego intracelular de proteínas, cascatas de transdução de sinal, e vias apoptóticas (ROETH & COLLINS 2006).

Nef é o transcrito mais abundante na infecção por HIV em células T CD4⁺, antes mesmo de a integração viral ocorrer (WU & MARSH 2001). Durante as fases de infecção em células linfoides, foi demonstrado que Nef é produzido abundantemente nas primeiras 6-9 horas pós-infecção, assim como Rev e Tat (RANKI, et al., 1994). A proteína Nef contribui em vários mecanismos para patogênese do HIV, pois promove infecção viral pela ativação de linfócitos

T CD4⁺, o que os torna mais suscetíveis à infecção. Para isso, Nef é capaz de modificar o sinal de tradução final dos receptores de células T (BAUR, *et al*, 1994; SKOWRONSKI, *et al*, 1993).

Uma das funções mais estudadas de Nef é a sua capacidade de modular a expressão de diversas proteínas da superfície celular, sendo que algumas apresentam sua expressão diminuída, e outras que mostram a sua expressão aumentada. Dentre as moléculas que apresentam regulação positiva, pode-se citar: ICAM-1, CD95 e FasL (KIRCHHOFF *et al.*, 2009). Entretanto, Nef reduz a expressão de várias moléculas, tais como CD4, CD28, MHC-I, MHC-II e CD8, as quais são importantes no reconhecimento de patógenos (MÜNCH *et al.*, 2001, 2007; SCHINDLER *et al.*, 2003), prejudicando a comunicação do sistema imune como um todo, já que dessa forma o vírus consegue evadir mais facilmente as células do sistema imunológico (FAUCI 1988; GOLDSMITH *et al.* 1995).

2.4 Mecanismos de modulação de MHC-I induzidos por Nef

O Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe I (MHC-I) é formado por moléculas mediadoras fundamentais para a apresentação de antígenos (PIGUET *et al.*, 1999). Essas moléculas de MHC-I são expressas na superfície celular da maioria dos tipos celulares e são responsáveis pela apresentação de antígenos pelo sistema imune. Em condições normais, esses peptídeos antigênicos são derivados de proteínas celulares (BERKE 1995; NEEFJES *et al.*, 2011). Todavia, quando as células estão infectadas por um patógeno, as proteínas deste são processadas em peptídeos. Estes peptídeos são então exibidos na superfície celular pelo complexo MHC-I/peptídeo e são detectados pelos linfócitos T citotóxicos (CTLs) que reconhecem as células apresentadoras infectadas e desencadeiam sua lise (BERKE 1995; NEEFJES *et al.*, 2011).

O MHC-I é uma molécula altamente polimórfica que consiste em uma cadeia pesada ancorada à membrana plasmática, e é associada a beta2-microglobina (beta-2M). A montagem da cadeia pesada com beta-2M acontece no retículo endoplasmático (RE) ou na cisterna *cis* do aparelho de Golgi, onde os peptídeos antigênicos são carregados. Logo após, o complexo formado é

então direcionado à superfície celular (BIJLMAKERS et al., 1993; NEEFJES et al., 1990).

Os linfócitos T citotóxicos podem reconhecer o complexo peptídeo/MHC-I através da interação direta com o receptor de células T (TCR) e o co-receptor CD8. Após o reconhecimento das moléculas patogênicas, ocorrem múltiplas respostas nos linfócitos (incluindo liberação de perforinas, granzimas, e fatores pró-apoptóticos), que levam a lise das células infectadas (BERKE 1995; ELEMANS et al., 2012).

As células infectadas pelo vírus normalmente seriam reconhecidas e eliminadas pelos CTLs. Entretanto, tal como muitos outros vírus patogênicos, o HIV-1 possui a característica de evadir o sistema imune e, uma das maneiras de realizar isso, é a sua capacidade de regular negativamente a expressão de MHC-I da superfície celular (SCHEPPLER et al., 1989; KERKAU et al., 1989). Esse processo é realizado pela proteína Nef que reduz a expressão de MHC-I, evitando, assim, a apresentação antigênica (COLLINS, et al.; 1998; SWIGUT et al., 2004; WONDERLICH et al., 2011).

Normalmente, o complexo MHC-I/peptídeo é transportado em vesículas ao longo da via secretória para a superfície celular. Primeiro, o complexo MHC-I/peptídeo sai do RE e é transportado para o aparelho de Golgi onde ocorrem diversas modificações pós-traducionais. Em seguida, da rede trans-Golgi (TGN) brotam vesículas contendo moléculas de MHC-I as quais são direcionadas para a membrana plasmática. No entanto, a proteína Nef do vírus HIV-1 é capaz de alterar o tráfego normal desse complexo. Para isso, essa proteína interage com diversas outras proteínas da célula que estão envolvidas no tráfego de MHC-I (NEEFJES et al., 2011).

Existem diversos transcritos do gene MHC-I humano e podem ser subdividido em dois grupos, os clássicos, antígeno leucocitário humano (HLA)-A, -B e -C, e os não-clássicos, que são HLA-E, -F, -G, -H e -J, estes não são polimórficos e tem papel especializado no sistema imune (COLONNA et al., 1993; YU et al., 2007).

Juntamente com os CTLs, o sistema imune também utiliza células *natural killer* (NK) para detectar as células anormais no organismo. As células

NK tem a capacidade de induzir a lise celular depois de reconhecerem classes específicas de moléculas de MHC-I e, também ao reconhecer células com baixa expressão desta molécula (KUSUNOKI et al., 2000).

Desta forma, a retirada total de MHC-I da superfície celular é prejudicial para o vírus HIV, devido ao fato de que as células infectadas se tornam suscetíveis à destruição pelas células NK. Para evitar que isso ocorra, Nef é capaz de afetar somente alguns alótipos de MHC-I, diminuindo, assim, preferencialmente, a expressão de HLA-A e HLA-B (PIZZATO et al., 2004).

2.5 As proteínas adaptadoras, as suas subunidades e suas funções

Os complexos APs (proteínas adaptadoras) são complexos de proteínas heterotetraméticas que medeiam o tráfego intracelular ao longo das vias endocítica e secretória. Existem 5 tipos distintos de APs e estes complexos se localizam em diferentes compartimentos intracelulares e medeiam diferentes rotas no tráfego intracelular (PARK & GUO 2014). Eles reconhecem e concentram proteínas a serem transportadoras (cargas) em vesículas que medeiam o transporte destas para um compartimento alvo específico. Desta forma, os complexos APs desempenham papéis importantes na manutenção da fisiologia das células eucarióticas. Disfunções nos complexos APs têm sido implicados em uma variedade de desordens incluindo retardo mental, enteropatia, surdez, neuropatia periferal dentre outras doenças (PARK & GUO 2014).

Os complexos AP-1 e AP-4 são recrutados à membrana do TGN (rede trans-golgi), AP-2 à membrana plasmática, AP-3 e AP-5 à membrana de endossomos primários e tardios, respectivamente, e participam do reconhecimento de cargas a partir destes locais (DORAY et al., 2002; PARK e GUO 2014; PEDEN et al., 2004; TRAUB 2003; WAGURI et al., 2003).

Nef interage com subunidades de pelo menos três dos cinco membros de uma família de proteínas adaptadoras (APs) de capa vesicular: AP-1, AP-2 e AP-3 (JANVIER et al., 2003; CHAUDHURI et al., 2007). Nef parece não interagir com AP-4 (MATTERA et al., 2011) e a interação com AP-5 ainda não foi relatada.

Cada complexo contém duas subunidades grandes (γ e $\beta 1$ para AP-1, α e $\beta 2$ para AP-2, δ e $\beta 3$ para AP-3, ϵ e $\beta 4$ para AP-4, ζ e $\beta 5$ para AP-5), uma média ($\mu 1$ - $\mu 5$) e uma pequena ($\sigma 1$ - $\sigma 5$) (HIRST et al., 2011; ROBINSON et al., 2004). AP-1, AP-2 e AP-3 são potencialmente heterogêneos devido à existência de isoformas múltiplas das subunidades codificadas por diferentes genes, incluindo duas subunidades γ ($\gamma 1$ e $\gamma 2$), duas $\mu 1$ ($\mu 1A$ e $\mu 1B$) e três $\sigma 1$ ($\sigma 1A$, $\sigma 1B$ e $\sigma 1C$) para AP-1; duas α (αA e αC) para AP-2; e duas $\beta 3$ ($\beta 3A$ e $\beta 3B$), duas $\mu 3$ ($\mu 3A$ e $\mu 3B$) e duas $\sigma 3$ ($\sigma 3A$ e $\sigma 3B$) para AP-3 (BOEHM & BONIFACINO 2001).

A combinação de diferentes isoformas das subunidades pode, em teoria, gerar pelo menos doze complexos de AP-1, quatro de AP-2 e oito de AP-3. Entretanto, existem poucos estudos para demonstrar se estas diferentes combinações de isoformas dos APs são formadas *in vivo* e se estas possuem propriedades funcionais distintas.

3 OBJETIVO GERAL

Comparar a atividade das isoformas ($\gamma 1$ e $\gamma 2$ adaptinas) de AP-1 na modulação negativa de HLA-A2 por Nef.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Silenciar por RNA de interferência (RNAi) as duas isoformas da subunidade γ de AP-1 ($\gamma 1$ e $\gamma 2$) e analisar por *Western Blot*.

Verificar a redução dos níveis de HLA-A2 na superfície celular, promovida por Nef é alterada na ausência das subunidades $\gamma 1$ ou $\gamma 2$. E analisar por imunofluorescência a localização subcelular de MHC-I em células expressando Nef em condições controle ou na ausência das subunidades $\gamma 1$ ou $\gamma 2$.

5 METODOLOGIA

5.1 Linhagem e cultivo celular

Células HeLa CCL2 que expressam constitutivamente HA-HLA-A2 (HLA-A2 fusionado com Hemaglutinina, tag de HA, na porção N-terminal)

geradas anteriormente pelo laboratório sede, foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM - Carisbad, CA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (*Gibco, Invitrogen, Carisbad, CA, EUA*), 100 U/mL de penicilina e 100 g/mL⁻¹ de estreptomicina (*Gibco, Invitrogen, Carisbad, CA, EUA*).

Como esse tipo de célula é aderente, quando a mesmas atingiram cerca de 80% de confluência, elas foram lavadas com 2 mL de PBS (*Phosphate Buffered Saline*), e, depois, foram removidas das placas de cultivo a partir de solução de Tripsina-EDTA (*Invitrogen, Gibco, Grand Island, NY, EUA*) por 5 minutos a 37°C e 5% de CO². Após centrifugação a 100 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular ressuscitado em meio de cultura para posterior quantificação e padronização do número de células.

5.2 Propagação Plasmidial

Bactérias da cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α (gentilmente cedidas pela Prof^a. Dra. Maria Helena S. Goldman, FFCLRP - USP - Ribeirão Preto, SP) foram utilizadas para propagar os plasmídeos. Essas bactérias foram então transformadas através de choque térmico. Para tanto, o DNA plasmideal (pCI-Neo vazio, pCI-Neo Nef, pIRES-GFP e pIRES-GFP Nef) e a bactéria foram incubados juntos por 15 minutos no gelo, e depois 3 minutos a 37°C. Em seguida, as células bacterianas foram cultivadas em meio LB (*Luria Bertani*) (*Acumedia, Neogen Corporation, Lansing, MI, EUA*), suplementado com o antibiótico apropriado, a 37°C. As preparações de DNA plasmideal para transfecções foram realizadas utilizando o *PureYield Plasmid Maxipreps System* (*Promega, Madison, WI, EUA*) seguindo as instruções do fabricante.

5.3 Silenciamento de AP-1 γ 1 e AP-1 γ 2 em células HeLa CCL2 e transfecção

Para diminuir em células HeLa HA-HLA-A2 os níveis endógenos dos componentes dos complexos APs, um protocolo com duração de sete dias foi utilizado (LUBBEN et al., 2007; MOTLEY et al., 2003). As células foram transfectadas com siRNA (small interfering RNA) para γ 1 e γ 2 adaptinas

para por duas vezes, no segundo dia e no quarto dia do protocolo. Após a dupla transfecção dos siRNAs, no quinto dia foram transfectados os plasmídeos contendo Nef e GFP (green fluorescent protein). São eles: pCI-Neo vazio ($540 \mu\text{g/mL}^{-1}$) pCI-Neo Nef ($760 \mu\text{g/mL}^{-1}$), peGFP ($270 \mu\text{g/mL}^{-1}$) (para os experimentos de Western blot e imunofluorescência indireta) pIRES-GFP ($1100 \mu\text{g/mL}^{-1}$) e pIRES-GFP Nef ($1130 \mu\text{g/mL}^{-1}$) (para os experimentos de citometria de fluxo), utilizando o reagente Lipofectamina 2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA). No sexto dia, as placas foram incubadas à 26°C por mais 16 horas, e, no sétimo dia, as células foram coletadas para os experimentos de *Western blot*, imunofluorescência indireta e citometria de fluxo. Todos os siRNAs foram adquiridos da Dharmacon RNA Technologies (Lafayette, CO). A tabela abaixo apresenta as sequências alvo para siRNA utilizadas e que são específicas para $\gamma 1$ ou $\gamma 2$ -adaptinas.

Tabela 1 – Sequências de siRNA das proteínas $\gamma 1$ ou $\gamma 2$ -adaptinas:

Proteína Alvo	Sequência de siRNA	Referência
$\gamma 1$ -adaptina	S: GGAAGAGCCUAAUUCAGGUAdtdt AS:UACCGAAUAGGCUCUUCcdtd	Dharmacon*
$\gamma 2$ -adaptina	S: AAACCCUGCUUUGCUGUUAAdtdt AS:AUUAACAGCAAAGCAGGGUUUdtdt	Rost et al (2006)

*Dharmacon (Chicago, IL).

5.4 SDS-PAGE e eletrotransferência

Proteínas dos extratos celulares totais foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% a partir de uma voltagem de aproximadamente 90 volts. O gel contendo solução de acrilamida/bis-acrilamida 30%, SDS 10% (*sodium dodecyl sulfato*), TEMED (N,N,N',N' – *Tetramethylethylene-diamine*) aproximadamente 99% e APS 10% (*Ammonium persulfato*), foi equilibrado em tampão para transferência (25 mM Tris e 190 mM Glicina em Metanol 10%). O suporte para transferência foi colocado dentro de uma cuba, de modo que a membrana de nitrocelulose (*Millipore, Bedford,*

MA) permanecesse voltada para o polo positivo. A eletrotransferência foi realizada a 400 mA por 1 hora. A eficiência da transferência foi avaliada por coloração com solução de Ponceau (Ponceau S 0,1 % em ácido acético 5%).

5.5 Western Blot e detecção de proteínas

Logo após a eletrotransferência, as membranas de nitrocelulose foram lavadas com PBS contendo *Tween* 20% (PBS-T) e em seguida, incubadas em uma solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado e 1% de BSA em PBS-T) sob oscilação por 1 hora. Posteriormente a isso, as membranas voltaram a ser lavadas por 3 vezes com solução PBS-T, sendo que cada lavagem foi feita durante 5 minutos. Após esse processo, as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos primários e armazenadas em câmara fria a 4°C *overnight*. Depois de serem incubadas com os anticorpos primários, as membranas foram incubadas com solução diluída com anticorpos secundários adequados conjugados com HRP (*horsehadish peroxidase*) em solução de bloqueio, por 45 min sob agitação e então, lavadas novamente com PBS-T. Após essa incubação, as membranas foram lavadas 5 vezes com PBS-T, e, finalmente, após todos esses procedimentos, a detecção das proteínas pode ser feita, utilizando-se solução de ECL (*enhanced luminol-based chemiluminescent*) com subsequente exposição das membranas e captação do sinal por luminômetro (*Bio-Rad*) acoplado ao sistema digital e *software Image Lab* (*Bio-Rad*).

5.6 – Citometria de Fluxo

Para a realização deste experimento, inicialmente o meio de cultura foi retirado da placa e as células lavadas com PBS, e logo em seguida, foi adicionado 500 µL de PBS suplementado com EDTA 2mM (*USB Corportation, Cleveland, OH, EUA*), e, então, as células foram armazenadas em uma estufa por 5 minutos a 37°C e 5% de CO₂ para soltá-las da placa. Seguindo-se o protocolo, as células foram centrifugadas a 1500 rpm (rotações por minuto) por 5 minutos a 4°C, e depois o sobrenadante foi descartado, conservando-se o *pellet*. Posteriormente a esses procedimentos, foi adicionado o anticorpo primário conjugado ao APC (marcador fluorescente alofococianina) diluído em

PBA (PBS suplementado com 1% BSA) ao *pellet*. As amostras foram armazenadas no escuro a 4°C, durante 1 hora. Finalizada a incubação das amostras, as mesmas foram lavadas e fixadas com formaldeído 1% diluído em PBA. A aquisição das amostras foi realizada utilizando o aparelho disponível no laboratório Multiusuário coordenado pelo Prof Dr. João Santana da Silva (Departamento de Bioquímica Imunologia – FMRP), o FACS Canto (BD Biosciences, San Jose, CA).

5.7 Imunofluorescência Indireta

As células HeLa CCL2 HA-HLA-A2 foram cultivadas sobre lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro (Knittel Glase, Bielefeld, Alemanha) em placas de 12 e 24 poços e aderidas a essas lamínulas de vidro revestidas com Biobond (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) por 50 minutos.

As células foram lavadas três vezes com PBS e fixadas em 4% de paraformaldeído (PFA) (EM Sciences, Hatfield, PA) diluído em PBS por 15 minutos à temperatura ambiente (TA) ou em metanol (Chemis, Indaiatuba, SP, Brasil) por 3 minutos à TA, conforme indicado na legenda das figuras. Após a fixação, somente as células incubadas com PFA foram lavadas cinco vezes com PBS e permeabilizadas em 0,1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EUA) diluído em PBS durante 10 minutos à TA.

Todas as células foram lavadas com PBS e sítios inespecíficos foram bloqueados com gelatina porcina 0,2% (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EUA) em PBS suplementado com azida sódica 0,02%, durante 30 minutos à 37°C. A seguir, as células foram incubadas com os anticorpos primários diluídos na solução de bloqueio por 30 minutos à 37°C em câmara úmida. As lamínulas foram lavadas por cinco minutos em PBS e incubadas do mesmo modo com os anticorpos secundários e o corante DAPI 300nM (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR). Ao término da incubação com os anticorpos, as lamínulas foram lavadas por cinco 33 minutos em PBS e foram montadas sobre lâminas de vidro com Fluoromount G (EM Sciences, Hatfield, PA).

A aquisição das imagens foi realizada no microscópio confocal Zeiss LSM 780 (Zeiss, Jena, Germany) disponível no departamento de Biologia

Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP-USP. As imagens foram processadas pelo software *Image J*.

5.8 Anticorpos

Os anticorpos utilizados para as técnicas de *Western blot*, citometria de fluxo, e imunofluorescência estão descritos nas tabelas abaixo, assim como seus respectivos fabricantes.

Tabela 2 – Anticorpos utilizados para *Western Blot*

Anticorpos	Fabricantes
HLA-A2	Protein Tech (Chicago, IL)
γ 1-adaptina	BD Biosciences (San Jose, CA)
γ 2-adaptina	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
Nef	NIH AIDS Reagent Program
β -actina	Thermo Scientific (Rockford, IL)
HA	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)
anti-IgG de camundongo	HRP GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
anti-IgG de Coelho	HRP GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)

Tabela 3 - Anticorpos utilizados para Citometria de Fluxo

Anticorpos	Fabricantes
HLA-A2 (BB7.2) conjugado-APC	BD Biosciences (San Jose, CA)
Anti-IgG de coelho Alexa 647	Life Technologies

Tabela 4 – Anticorpos utilizados para Imunofluorescência

Anticorpos	Fabricantes
γ 1-adaptina	BD Biosciences (San Jose, CA)
γ 2-adaptina	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
HA	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)
HA	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
Anti-IgG de camundongo Alexa 647	Life Technologies
Anti-IgG de coelho Alexa 647	Life Technologies
Anti-IgG de camundongo Alexa 594	Life Technologies
Anti-igG de coelho Alexa 594	Life Technologies

5.9 Análise dos dados

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo método t-test Student não paramétrico utilizando o software GraphPad Prism 5. O valor p de significância está representado por: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.001$) e *** ($p < 0.0001$). NS: não significativo.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 *Western Blot*

A partir dos resultados da Figura 5, é possível observar que o silenciamento das subunidades $\gamma 1$ e $\gamma 2$ adaptinas de AP-1 foi eficiente na diminuição destas proteínas, uma vez que ocorreu uma redução da intensidade das bandas correspondentes a estas. Além disso, não foi possível observar alteração dos níveis totais de HA-HLA-A2 em células expressando Nef. Já foi relatado na literatura que além de reduzir a expressão de HLA-A2 na superfície, Nef também reduz os níveis totais de HLA-A2 devido ao redirecionamento para os lisossomos (DE CARVALHO *et al.*, 2014). Uma possível razão por não se observar alteração dos níveis de HLA-A2 nos lisados totais, pode ser a baixa eficiência da transfecção do plasmídeo codificando Nef, já que nesse caso, apenas uma fração das células estaria expressando a proteína viral.

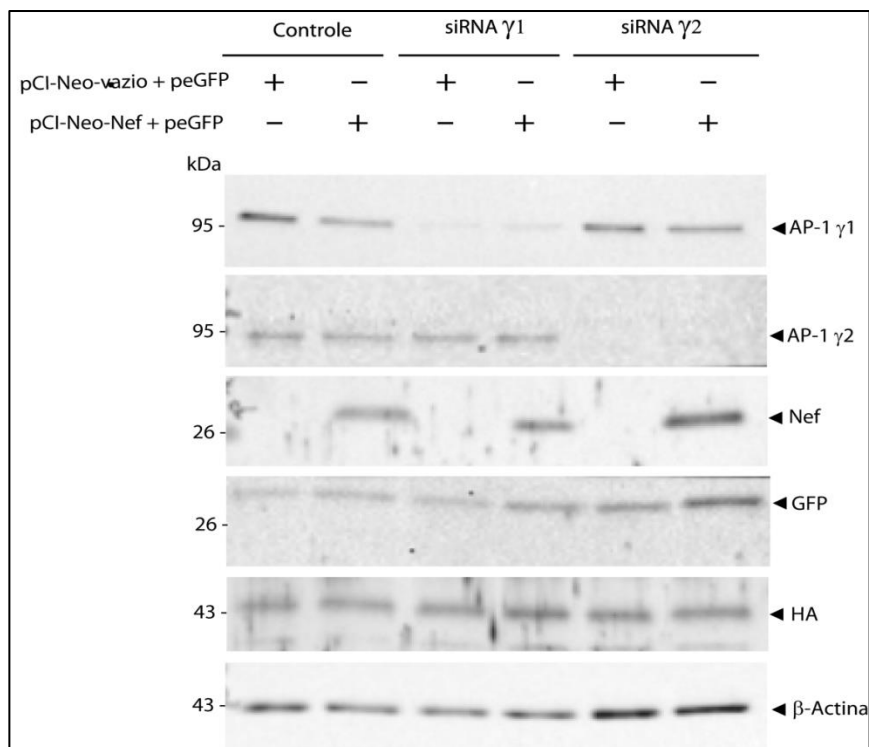


Figura 5: Avaliação da eficiência do silenciamento das proteínas AP-1 $\gamma 1$ e AP-1 $\gamma 2$. Células HeLa CCL2 HA-HLA-A2 foram transfectadas ou não com siRNA específico para AP-1 $\gamma 1$ ou AP-1 $\gamma 2$. Foram utilizados os plasmídeos pCI-Neo-vazio e peGFP ou pCI-Neo-Nef e peGFP (na proporção 5:1, respectivamente). As proteínas dos extratos totais foram separadas por eletroforese em SDS-PAGE (gel 10%) e analisadas por *Western blot* utilizando anticorpos contra: AP-1 $\gamma 1$, AP-1 $\gamma 2$, HA e β -actina, conforme indicado. Massa Molecular (em kDa) está indicado à esquerda da figura.

6.2 Citometria de Fluxo

Para que fosse possível verificar a atividade de Nef em células HeLa, inicialmente foi analisada a expressão da molécula de HLA-A2 na superfície celular através do ensaio de citometria de fluxo com células não permeabilizadas.

A partir da Figura 6A, observando-se os histogramas pode-se avaliar que nas células expressando Nef, há uma grande diminuição da molécula de MHC-I (HLA-A2) na superfície em comparação com as células controle. Nas células expressando Nef, porém, com a proteína AP-1 $\gamma 1$ silenciada, pode-se observar que a regulação negativa de MHC-I (HLA-A2) por Nef é impedida. No terceiro histograma, é possível notar que mesmo quando as células expressando a proteína Nef e silenciadas da proteína AP-1 $\gamma 2$, a modulação negativa de MHC-I continua ocorrendo. Corroborando os dados descritos acima, as repetições deste experimento representado pela Figura 6B, é

possível observar que a redução de MHC-I (HLA-A2) no controle, foi cerca de 60%, e, de 40%, nas células silenciadas para AP-1 γ 2, conforme representado no gráfico de barras.

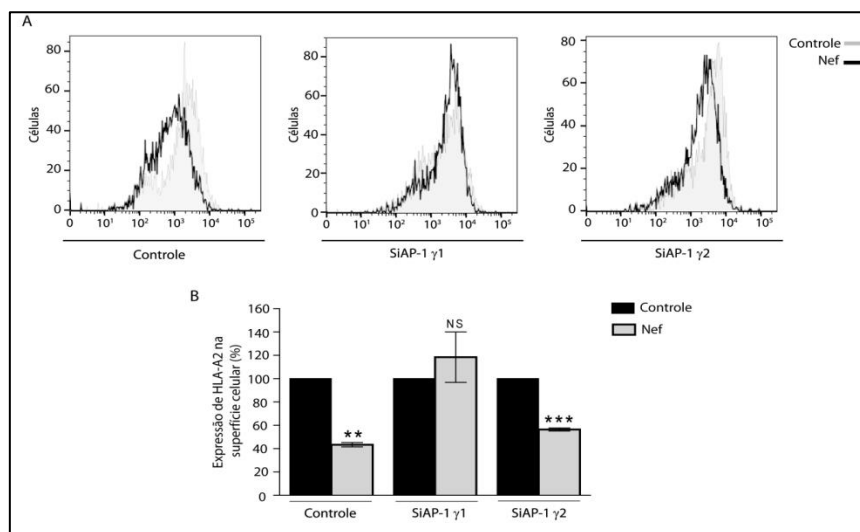


Figura 6 – Modulação negativa de HLA-A2 da superfície celular pela proteína Nef do HIV-1 e a participação das subunidades γ 1 e γ 2 adaptinas neste processo. (A) As células transfectadas ou não com siRNA específico para γ 1 ou γ 2-adaptina e, logo em seguida, passaram pelo processo de transfecção com os plasmídeos pIRES-GFP ou pIRES-GFP-Nef. Essas células foram marcadas com anticorpo anti-HLA-A2 conjugado com o fluorocromo APC, fixadas e logo após, analisadas em citômetro de fluxo FACSCanto II. (B) Os gráficos de barras representam os níveis de HLA-A2 na superfície de células expressando Nef em relação aos níveis em células controle, cujo valor é 100% (valores das medianas do histograma de FACS). Os dados foram analisados usando os softwares FlowJo e GraphPad e são representativos de três experimentos independentes. *Comparação entre as células controle e expressando Nef (Teste t de Student, $p < 0,05$). NS: não significativo.

6.3 Imunofluorescência Indireta

Na Figura 7A-B, onde aparecem as células controle, é possível observar que quando as células expressam Nef, há uma diminuição dos níveis de MHC-I (HLA-A2) da superfície celular, em comparação com as células que não expressam Nef. Além disso, é possível verificar que essas moléculas passam a se localizar majoritariamente em estruturas intracelulares na região perinuclear, demonstrando a ação de Nef, descrita anteriormente, modificando a via normal de MHC-I (HLA-A2).

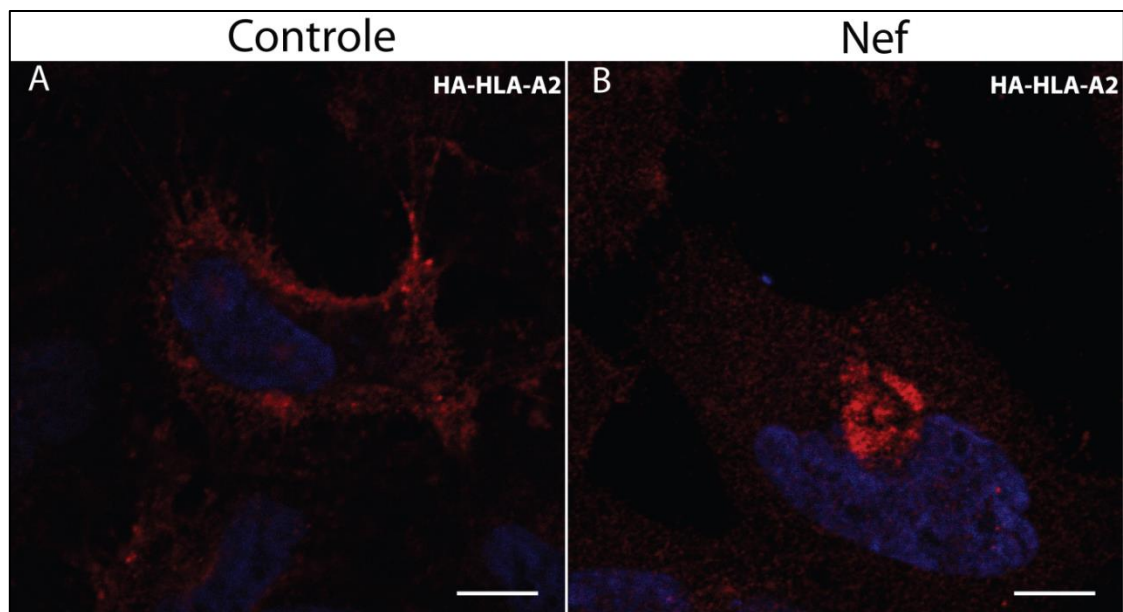


Figura 7: Nef induz redistribuição de HLA-A2 da superfície celular para região perinuclear. Células HeLa CCL2 HA-HLA-A2, previamente cultivadas e aderidas em lamínulas de vidro, foram transfectadas com pCI-Neo-vazio (A) ou pCI-Neo-Nef (B). A aquisição das imagens foi realizada no microscópio confocal Zeiss LSM 780 e as imagens foram processadas pelo software *Image J*. Barra, 10 μ m.

Nas células onde AP-1 γ 1 está silenciado, é possível averiguar que na ausência desta proteína, Nef não é capaz de modular negativamente as moléculas de MHC-I (HLA-A2), não havendo o acúmulo da marcação de HLA-A2 na região perinuclear (Fig. 8).

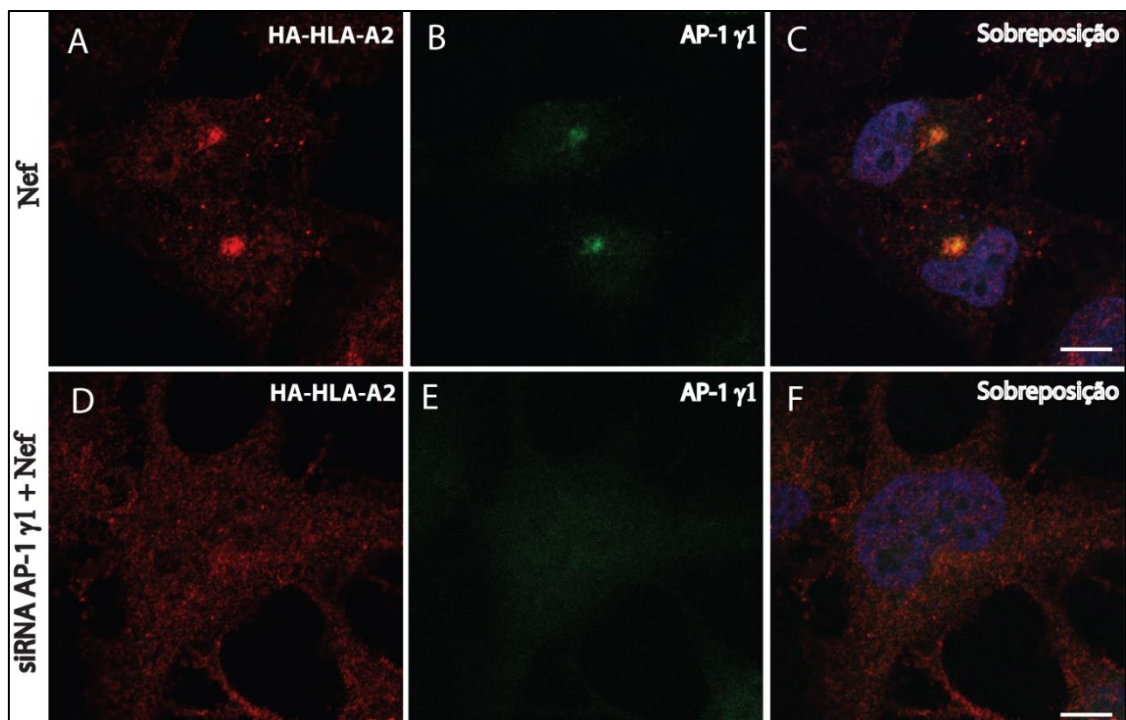


Figura 8: A ausência de AP-1 γ 1 impede Nef de regular negativamente HLA-A2 e redistribuí-lo para a região perinuclear. (A-F) As células foram transfectadas (D-F) ou não (A-C) com siRNA específico para AP-1 γ 1. Em seguida, as células foram transfectadas com os plasmídeos pCI-Neo-Nef e peGFP na proporção 5:1. A-C representam o controle (sem o silenciamento) e D-F representam as células silenciadas de AP-1 γ 1. Imagens C e F representam a sobreposição. A aquisição das imagens foi realizada no microscópio confocal Zeiss LSM 780 e as imagens foram processadas pelo *software Image J*. Barra, 10 μ m.

Na Figura 9 a marcação feita para AP-1 γ 2 não funcionou, devido ao fato de que o anticorpo não foi eficaz para o experimento de imunofluorescência. Contudo, no ensaio de *Western blot* (Fig. 5), pode-se comprovar a depleção da proteína AP-1 γ 2. Ainda assim, é possível verificar a regulação negativa mediada por Nef, onde as moléculas de MHC-I se encontram internalizadas, conforme pode ser observado na Figura 9.

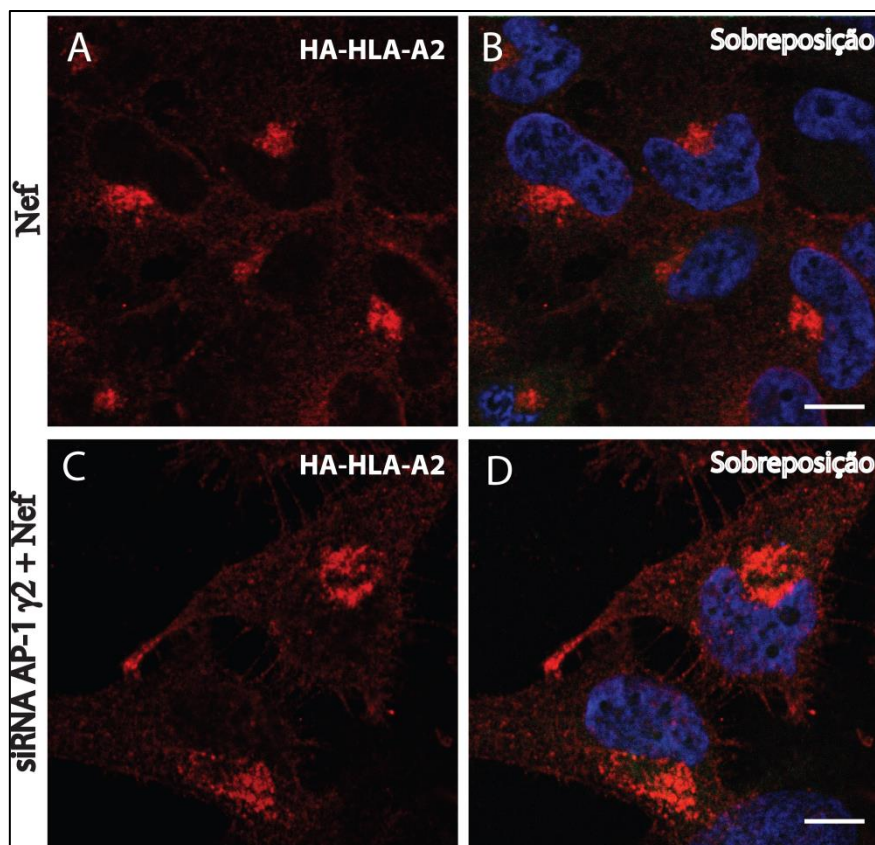


Figura 9: A ausência de AP-1 γ 2 não impede a regulação negativa de HLA-A2 por Nef. As células foram transfectadas (C-D) ou não (A-B) com siRNA específico para AP-1 γ 2 e logo em seguida essas células foram transfectadas com os plasmídeos pCI-Neo-Nef e peGFP na proporção 5:1. A-B representam o controle (sem o silenciamento) e C-D representam as células silenciadas de AP-1 γ 2. A aquisição das imagens foi realizada no microscópio confocal Zeiss LSM 780 e as imagens foram processadas pelo *software Image J*. Barra, 10 μ m.

O entendimento da patogênese da AIDS é uma demanda natural que existe desde a descoberta do vírus. Neste contexto, a proteína Nef do HIV-1 tem sido alvo de grande interesse devido a seu papel na evasão da resposta imune e progressão da AIDS. Uma das funções mais estudadas de Nef é a sua capacidade de reduzir os níveis de expressão de várias moléculas, sendo uma delas o MHC-I, fazendo com que as células infectadas não sejam reconhecidas pelas CTLs do sistema imune (KASPER & COLLINS, 2002). Todavia, o mecanismo da modulação negativa de MHC-I mediado por Nef, ainda não está totalmente elucidado. Diversos estudos demonstraram que Nef é capaz de fazer com que as células infectadas sobrevivam ao reconhecimento pelo sistema imune (GLUSHAKOVA, *et al.*, 2001; MÜNCH, *et al.*, 2001).

A fim de verificar a participação de AP-1 γ 1 e AP-1 γ 2 neste processo, foram realizados ensaios de silenciamento destas proteínas e transfecção de Nef em células HeLa CCL2 expressando HA-HLA-A2. Desta forma, pela

técnica de *Western blot*, foi verificada inicialmente a eficácia do silenciamento e por citometria de fluxo e de imunofluorescência indireta, os níveis totais de HLA-A2 e sua distribuição na superfície celular e intracelular.

Diversas pesquisas observaram que o silenciamento de AP-1 γ 1 é capaz de inibir fortemente a capacidade de Nef para regular negativamente HLA-A2 da superfície celular. Os resultados mostrados nesse trabalho, como pode ser observado nas figuras 6 e 8, são similares com outros estudos (ROETH & COLLINS, 2006). A constatação de que o silenciamento AP-1 γ 1 inibe a capacidade de Nef regular negativamente MHC-I em ambas as células HeLa e células T indica que, provavelmente, o mecanismo molecular é o mesmo (CHOMA, *et al.*, 2015).

Os ensaios de citometria de fluxo e de imunofluorescência indireta revelaram que AP-1 γ 1 é importante na modulação negativa de HLA-A2 por Nef de HIV-1, e não o AP-1 γ 2. Diversos estudos postularam que o AP-1 γ 1 é essencial para Nef regular negativamente HLA-A2, na medida em que o silenciamento desta subunidade, inibe o processo de regulação negativa (CHOMA, *et al.*, 2015; LUBBEN, *et al.*, 2007; KASPER & COLLINS, 2002). Já se tem conhecimento que quando uma das subunidades do complexo AP é silenciada, o complexo se torna instável, e desmonta-se. Dessa forma, corroborando com os dados afirmados anteriormente.

Além disso, AP-1 γ 1 e AP-1 γ 2 parecem compor funções distintas na célula. Segundo Lewin (1998, p. 207), entre as proteínas AP-1 γ 1 e AP-1 γ 2 há um elevado grau de similaridade de sequência, maior que cerca de 60%. Entretanto, existem mais estudos afirmando que estas duas subunidades se diferem em algumas regiões, não só na sequência de aminoácidos, mas também na organização de domínios (TAKATSU, *et al.*, 1998). Ainda, AP-1 γ 2 possui uma região truncada (a região da orelha, “ear domain”) quando é comparada com AP-1 γ 1, embora a similaridade de aminoácidos entre essas duas subunidades permaneça elevada em regiões onde os domínios “orelha” das suas subunidades se alinham. Por conseguinte, as diferenças estruturais entre os domínios de AP-1 γ 1 e AP-1 γ 2, pode refletir em diferenças funcionais entre estas moléculas. (LEWIN, *et al.*, 1998).

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- Nef redistribui HLA-A2 para a região perinuclear
- A subunidade $\gamma 1$ adaptina, mas não $\gamma 2$ adaptina, é requerida para a regulação negativa de HLA-A2 por Nef
- Esses resultados sugerem que $\gamma 1$ e $\gamma 2$ adaptinas possuem funções distintas
- Essas informações são relevantes para a melhor compreensão das interações do HIV com a célula hospedeira

REFERÊNCIAS

- AIDS Epidemic Update. December 1999 (UNAIDS, Geneva, 1999), www.unaids.org.
- BARRÉ-SINOUSSE, F. HIV as the cause of AIDS. **Lancet**, v. 348, p. 31-5, 1996.
- BARRE-SINOUSSE, F.; CHERMANN, J. C.; REY, F.; NUGEYRE, M. T.; CHAMARET, S.; GRUEST, J.; DAUGET, C.; XLER-BLIN, C.; VEZINET-BRUN, F.; ROUZIOUX, C.; ROZENBAUM, W.; MONTAGNIER, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, n. 4599, p. 868-871, 1983.
- BAUR, A. S.; E. T. SAWAI.; P. DAZIN.; W. J. FANTL.; C. CHENG-MAYER.; B. M. PETERLIN.; HIV-1 Nef leads to inhibition or activation of T cells depending on its intracellular localization. **Immunity**, v. 1, p. 373–384, 1994.
- BERGER, E. A.; MURPHY, P. M.; FARBER, J. M. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. **Annu Rev Immunol**, v. 17, p. 657-700, 1999.
- BERKE, G. The CTL's kiss of death: **Cell**, v. 81, p. 9-12, 1995.
- BIJLMAKERS, M. J.; PLOEGH, H. L. Putting together an MHC class I molecule. **Curr Opin Immunol**, v. 5, p. 21-26, 1993.
- BLAGOVESHCHENSKAYA, A. D.; THOMAS, L.; FELICIANGLI, S. F.; HUNG, C. H.; THOMAS, G. HIV-1 Nef downregulates MHC-I by a PACS-1- and PI3K-regulated ARF6 endocytic pathway. **Cell**, v. 111, p. 853-66, 2002.
- BOEHM, M.; BONIFACINO J. S. Adaptins: the final recount. **Mol Biol Cell**, v. 12, p.2907-20, 2001.
- CARL, S.; DANIELS, R.; IAFRATE. A. J.; EASTERBROOK, P.; GREENOUG, T. C.; SKOWRONSKI, J.; KIRCHHOFF, F. Partial “repair” of defective NEF genes in a long-term nonprogressor with human immunodeficiency virus type 1 infection. **J Infect Dis**, v.181, n. 1, p.132-140, 2000.
- CHAUDHURI, R.; LINDWASSER, O. W.; SMITH, W. J.; BONIFACINO, J. S. Downregulation of CD4 by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef Is Dependent on Clatrin and Involves Direct Interaction of Nef with the AP2 Clathrin Adaptor. **J Virol**, v. 81, n. 8, p. 3877-3890, 2007.
- CHENG-MAYER, C.; IANNELLO, P.; SHAW, K.; LUCIW, P. A.; LEVY, J. A. Differential effects of nef on HIV replication: implications for viral pathogenesis in the host. **Science**, v. 246, p. 1629-32, 1989.
- COHEN, M. Natural history of HIV infection in women. **Obstet Gynecol Clin North Am**, v. 24, p. 743-58, 1997.
- COHEN, O. J.; PAOLUCCI, S.; BENDE, S. M.; DAUCHER, M.; MORIUCHI, H.; MORIUCHI, M.; CICALA, C.; DAVEY, R.T.; BAIRD, B.; FAUCI, A. S. CXCR4

and CCR5 genetic polymorphisms in long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection: lack of association with mutations other than CCR5-Delta32. **J Virol**, v. 72, p. 6215-7, 1998.

COFFIN, J.; HAASE, A.; LEVY, J. A.; MONTAGNIER, L.; OROSZLAN, S.; TEICH, N.; TEMIN, H.; TOYOSHIMA, K.; VARMUS, H.; VOGT, P. What to call the AIDS virus? **Nature**, v. 321, p. 10, 1986.

COLLINS, K. L.; CHEN, B. K.; KALAMS, S. A.; WALKER, B. D.; BALTIMORE, D. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. **Nature**, v. 391, p. 397-401, 1998.

COLONNA, M.; BORSELLINO, G.; FALCO, M.; FERRARA, G. B.; STROMINGER, J. L. HLA-C is the inhibitory that determines dominant resistance to lysis by NK1 – and NK2 – specific natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 90, p. 1200-1204, 1993.

CHOMA, M. K.; LUMB, J.; KOZIK, P.; ROBINSON, S. M. A genome-wide screen for Machinery Involved in Downregulation of MHC Class I by HIV-1 Nef. **Plos One**, v. 10, n. 10, p. 1-19, 2015.

CRAIG, H. M.; REDDY, T. R.; RIGGS, N. L.; DAO P. P.; GUATELLI, J. C.; 2000, Interactions of HIV-1 nef with the mu subunits of adaptor protein complexes 1, 2, and 3: role of the dileucine-based sorting motif. **Virology**, v. 271, p. 9-17, 2000.

DE CARVALHO, J. V.; DE CASTRO, R. O.; DA SILVA, E. Z.; SILVEIRA, P. P.; DA SILVA-JANUÁRIO, M. E.; ARRUDA, E.; JAMUR, M. C.; OLIVER, C.; AGUIAR, R. S.; DA SILVA, L. L. Nef neutralizes the ability of exosomes from CD4⁺ T cells to act as decoys during HIV-1 infection. **Plos One**, v. 9, n. 11, p. 1-21, 2014.

DORAY, B.; GHOSH, B.; GRIFFITH, J.; GEUZE, H. J.; Kornfeld, S. Cooperation of GGAs and AP-1 in packaging MPRs at the trans-Golgi network. **Science**, v. 297, p. 1700-1703, 2002.

ELEMANS, M.; SEICH AL BASATENA, N. K.; ASQUITH, B. The efficiency of the human CD8⁺ T cell response: how should we quantify it, what determines it, and does it matter? **PLoS Comput Biol**, v. 8, p.1-7, 2012.

FAUCI, A. S. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. **Science**, v. 239, p. 617–622, 1988.

FREED, E. O. HIV-1 assembly, release and maturation. **Nature**, n. 8, v. 13, p. 484-496, 2015.

GAO, F.; YUE, L.; CRAIG, S.; THORNTON, C. L.; ROBERTSON, D. L.; MCCUTCHAN, F. E.; BRADAC, J. A.; SHARP, P. M.; HAHN, B. H. Genetic variation of HIV type 1 in four World Health Organization-sponsored vaccine evaluation sites: generation of functional envelope (glycoprotein 160) clones representative of sequence subtypes A, B, C, and E. WHO Network for HIV

Isolation and Characterization. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 10, p. 1359-68, 1994.

GELDERBLOM, H. R.; ÖZEL, M.; PAULI, G. Morphogenesis and morphology of HIV Structure-function relations. **Archives of Virology**, v. 106, n. 1-2, p. 1-13, 1989.

GLUSHAKOVA, S.; MÜNCH, J.; CARL, S.; GREENOUGH, T. C.; SULLIVAN, J. L.; MARGOLIS, L.; KIRCHHOFF, F. CD4 down-modulation by human immunodeficiency virus type 1 Nef correlates with the efficiency of viral replication and with CD4 T-cell depletion in human lymphoid tissue ex vivo. **Journal of Virology**, v. 74, n. 21, p. 10113–10117, 2001.

GOLDSMITH, M. A.; WARMERDAM, M. T.; ATCHISON, R. E.; MILLER, M. D.; GREENE, W. C. Dissociation of the CD4 downregulation and viral infectivity enhancement functions of human immunodeficiency virus type 1 Nef. **J. Virol**, v. 69, p. 4112–4121, 1995.

GOTTLIEB, M. S.; SCHROFF, R.; SCHANKER, H. M.; WEISMAN, J. D.; FAN, P. T.; WOLF, R. A.; SAXON, A. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. **N Engl J Med**, v. 305, p. 1425-31, 1981.

GREENBERG, M. E.; IAFRATE, A. J.; SKOWRONSKI, J. The SH3 domain-binding surface and an acidic motif in HIV-1 Nef regulate trafficking of class I MHC complexes. **EMBO J**, v. 17, p. 2777-89, 1998.

GRZESIEK, S.; STAHL, S. J.; WINGFIELD, P. T.; BAX, A. The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR. **Biochemistry**, v. 35, p. 10256-61, 1996.

HAHN, B. H.; SHAW, G. M, DE COCK, K. M.; SHARP, P. M.; AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications: **Science**, v. 287, p. 607-614. 2000.

HIRST, J.; BARLOW, L. D.; FRANCISCO, G. C.; SAHLENDER, D. A.; SEAMAN, M. N.; DACKS, J. B.; ROBINSON, M. S. The fifth adaptor protein complex. **PLoS Biol**, v. 9, p. e1001170, 2011.

JANVIER, K.; CRAIG, H.; MADRID, R.; SOL-FOULON, N.; RENAUT, L.; CASSEL, D.; BENICHO, S.; GUATELLI, J. HIV-1 Nef stabilizes the association of a adaptor protein complexes with membranes. **J Biol Chem**, v. 278, n. 10, p. 8725-8732, 2003.

KASPER, M. R.; COLLINS, K. L. Nef-Mediated Disruption of HLA-A2 Transport to the Cell Surface in T Cells. **Journal of Virology**, v. 77, n. 5, p. 3041-3049, 2002.

KERKAU, T.; SCHMITT-LANDGRAF, R.; SCHIMPL, A.; WECKER, E. Downregulation of HLA class I antigens in HIV-1 infected cell. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 5, n. 6, p. 613-620, 1989.

KIRCHHOFF, F. Is the high virulence of HIV-1 an unfortunate coincidence of primate lentiviral evolution? **Nat Rev Microbiol**, v. 7, n. 6, p. 467-476, 2009.

KLATZMANN, D.; CHAMPAGNE, E.; CHAMARET, S.; GRUEST, J.; GUETARD, D.; HERCEND, T.; GLUCKMAN, J. C.; MONTAGNIER, L. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. **Nature**, v. 312, n. 5996, p. 767-768, 1984.

KUMAR, P. Long term non-progressor (LTNP) HIV infection. **Indian Journal of Medical Research**, v. 138, p. 291-293, 2013.

KUSUNOKI, Y.; KYOIZUMI, S.; HONMA, M.; KUBO, Y.; OHNISHI, H.; HAYASHI, T.; SEYAMA, T. NK-mediated elimination of mutant lymphocytes that have lost expression of MHC class I molecules. **J Immunol**, v. 165, p. 3555-63, 2000.

LE GALL, S.; ERDTMANN, L.; BENICHO, S.; BERLIOZ-TORRENT, C.; LIU, L.; BENAROUS, R.; HEARD, J. M.; SCHWARTZ, O. Nef interacts with the mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules. **Immunity**, v. 8, p. 483-95, 1998.

LEVY, J. A.; HOFFMAN, A. D.; KRAMER, S. M.; LANDIS, J. A.; SHIMABUKURO, J. M.; OSHIRO, L. S. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. **Science**, v. 225, p. 840-2, 1984.

LEVY, J. A. Caution: should we be treating HIV infection early? **Lancet**, v. 352, p. 982-3, 1998.

LEWIN, D. A.; SHEFF, D.; OOI, C. E.; WHITNEY, J. A.; YAMAMOTO, E.; CHICIONE, L. M.; WEBSTER, P.; BONIFACINO, J. S.; MELLMAN, I. Cloning, expression, and localization of a novel gamma-adaptin-like molecule. **FEBS Lett**, v. 435, p. 263-8, 1998.

LUBBEN, N. B.; SAHLENDER, D. A.; MOTLEY, A. M.; LEHNER, P. J.; BENAROCH, P.; ROBINSON, M. S. HIV-1 Nef-induced Down-Regulation of

MHC Class I Requires AP-1 and Clathrin but Not PACS-1 and Is Impeded by AP-2^D. **Molecular Biology of the Cell**, v. 18, p. 3351-3365, 2007.

MATTERA, R.; BOEHM, M.; CHAUDHURI, R.; PRABHU, Y.; BONIFACINO, S. J. Conservation and diversification of dileucine signal recognition by adaptor protein (AP) complex variants. **J Biol Chem**, v. 286, p. 2022-30, 2011.

MOTLEY, A.; BRIGHT, N. A.; SEAMAN, M. N.; ROBINSON, M. S. Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. **J Cell Biol**, v. 162, p. 909-18, 2003.

MELIKYAN, G. B. HIV entry: a game of hide-and-fuse? **Curr Opin Virol**, v. 4, p. 1-7, 2014.

MILLER, M. D.; FEINBERG, M. B.; GREENE, W. C. The HIV-1 nef gene acts as a positive viral infectivity factor. **Trends Microbiol**, v. 2, p. 294-8, 1994a.

MILLER, M. D.; WARMERDAM, M. T.; GASTON, I.; GREENE, W. C.; FEINBERG, M. B. The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. **J Exp Med**, v. 179, p. 101-13, 1994b.

MÜNCH, J.; STOLTE, N.; FUCHS, D.; STAHL-HENNIG, C.; KIRCHHOFF, F. Immunodeficiency virus Nef is associated with a strong selective advantage in infected rhesus macaques. **Journal of Virology**, v. 75, n.21, p. 10532–10536, 2001.

NEEFJES J. J.; STOLLORZ, V.; PETERS P. J.; GEUZE, H. J. The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route. **Cell**, v. 61, p. 171-183, 1990.

NEEFJES, J.; JONGSMA M. L.; PAUL, P.; BAKKE, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. **Nat Rev Immunol**, v. 11, p. 823-836, 2011.

PARK, S. Y.; GUO, X. Adaptor protein complexes and intracellular transport. **Bioscience Reports**, v. 24, p. 381-390, 2014.

PEDEN, A. A.; OORSCHOT V.; HESSER, B. A.; AUSTIN, C. D.; SCHELLER, R. H.; KLUMPERMAN, J. Localization of the AP-3 adaptor complex defines a novel endosomal exit site for lysosomal membrane proteins. **J Cell Biol**, v. 164, p. 1065-76, 2004.

PIGUET, V.; CHEN, Y.-L.; MANGASARIAN, A.; FOTI, M.; CARPENTIER, J.; TRONO, D. Mechanism of Nef induced CD4 endocytosis: Nef connects CD4 with the μ chain of adaptor complexes. **EMBO J**, v. 17, p. 2472–2481, 1998.

PIGUET, V.; GU, F., FOTI, M., DEMAUREX, N., GRUENBERG, J., CARPENTIER, J. L.; TRONO, D. Nef-induced CD4 degradation: a diacidic-based motif in Nef functions as a lysosomal targeting signal through the binding of β -COP in endosomes. **Cell**, v. 97, p. 63–73, 1999.

PIZZATO, N.; DERRIEN, M.; LENFANT, F. The short cytoplasmic tail of HLA-G determines its resistance to HIV-1 Nef-mediated cell surface downregulation. **Hum Immunol**, v. 65, p. 1389-96, 2004.

PRUSINER, S. B. Historical essay. Discovering the cause of AIDS. **Science**, v. 298, p.1726, 2002.

RANKI, A.; LAGERSTEDT, A.; OVOD, V.; AAVIK, E.; KROHN, K. J. Expression kinetics and subcellular localization of HIV-1 regulatory proteins Nef, Tat and Rev in acutely and chronically infected lymphoid cell lines. **Arch Virol**, v. 139, n. 3-4, p. 365-378, 1994.

ROBINSON, M. S. 2004. Adaptable adaptors for coated vesicles. **Trends Cell Biol**, v. 4, n. 14, p. 167–174, 2004.

ROETH, J. F.; COLLINS, K. L. Human immunodeficiency virus type 1 Nef: adapting to intracellular trafficking pathways: *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 70, p. 548-63, 2006.

SCHEPPLER, J. A.; NICHOLSON, J. K.; SWAN, D. C.; AHMED-ANSARI, A.; MCDUGAL, J. S. Down-modulation of MHC-I in a CD4+ T cell line, CEM-E5, after HIV-1 infection. **The Journal of Immunology**, v. 143, n. 9, p. 2858-2866, 1989.

SHEARER, G. M. HIV-induced immunopathogenesis. **Immunity**, v. 9, p. 587-93, 1998.

SCHINDLER, M.; WÜRFL, S.; BENAROCH, P.; GREENOUGH, T. C.; DANIELS, R.; EASTERBROOK, P.; BRENNER, M.; MÜNCH, J.; KIRCHHOFF, F. Down-modulation of mature major histocompatibility complex class II and up-regulation of invariant chain cell surface expression are well conserved functions of human and simian immunodeficiency virus nef alleles. **J Virol**, v. 77, n. 19, p. 10548-10556, 2003.

SIERRA, S.; KUPFER, B.; KAISER, R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. **J Clin Virol**, v. 34, p. 233-44, 2005.

SKOWRONSKI, J., PARKS, D.; MARIANI, R. Altered T cell activation and development in transgenic mice expressing the HIV-1 nef gene. **EMBO**, v. 12 p. 703-713, 1993.

SWIGUT, T.; ALEXANDER, L.; MORGAN, J.; LIFSON, J.; MANSFIELD, K. G.; LANG, S.; JOHNSON, R. P.; SKOWRONSKI, J.; DESROSIERS, R. Impact of Nef-Mediated Downregulation of Major Histocompatibility Complex Class on Immune Response to Simian Immunodeficiency Virus. **Journal of Virology**, v. 78, n. 23, p. 13335-13344, 2004.

TAKATSU, H.; SAKURAI, M.; SHIN, H. W.; MURAKAMI, K.; NAKAYAMA, K. Identification and characterization of novel clathrin adaptor-related proteins. **J Biol Chem**, v. 273, p. 24693-700, 1998.

TILTON, J. C.; DOMS, R.W. Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection. **Antiviral Res**, v. 85, p. 91-100, 2010.

TRAUB, L. M. Sorting it out: AP-2 and alternate clathrin adaptors in endocytic cargo selection. **J Cell Biol**, v. 163, p. 203-208, 2003.

UNAIDS. AIDS the epidemic update. Regional Support Team for Eastern and Southern Africa. 2007.

UNAIDS. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic, 2012.

ZELLER, J. M.; MCCAIN, N. L.; SWANSON, B. Immunological and 1. virological markers of HIV-disease progression. *J Assoc Nurses AIDS Care*, vol. 7, p. 15-27, 1996.

WAGURI, S.; DEWITTE, F.; LE BORGNE, R.; ROUILLÉ, Y.; UCHIYAMA, Y.; DUBREMETZ, J. F.; HOFLACK, B. Visualization of TGN to endosome trafficking through fluorescently labeled MPR and AP-1 in living cells. **Mol Biol Cell**, v. 14, p. 142-155, 2003.

WONDERLICH, E. R.; LEONARD, J. A.; COLLINS, K. L.; HIV immune evasion disruption of antigen presentation by the HIV Nef protein: **Adv Virus Res**, v. 80, p. 103-27, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), Global Health Observatory (GHO) data, 2013. Disponível em <<http://www.who.int/gho/hiv/en/>>. Acesso em 25/09/2015.

WU, Y.; MARSH, W. Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA. **Science**, v. 293, n. 5534, p. 1503-1506, 2001.

YU, J.; HELLER, G.; CHEWNING, J.; KIM, S.; YOKOYAMA, W. M.; HSU, K. C.; Hierarchy of the human natural killer cell response is determined by class and quantity of inhibitory receptors for self-HLA-B and HLA-C ligands. **J Immunol**, v. 179, p. 5977-5989, 2007.