



Universidade Brasília (UnB)
Laboratório de Farmacologia Molecular.
Pós-graduação em Patologia Molecular – Faculdade de Medicina.

**Estudo da relevância fisiológica da tioesterase humana II (hTE)
na modulação de CD4 mediada pela proteína Nef do HIV – 1.**

Sócrates Souza Ornelas

Brasília, março de 2007.

Universidade de Brasília (UnB)

Pós-graduação em Patologia Molecular – Faculdade de Medicina

**Estudo da relevância fisiológica da tioesterase humana II (hTE)
na modulação de CD4 mediada pela proteína Nef do HIV – 1.**

Sócrates Souza Ornelas

Orientador: Enrique Roberto Argañaraz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Brasília, março 2007.

Universidade de Brasília (UnB)

Pós-graduação em Patologia Molecular – Faculdade de Medicina

**Estudo da relevância fisiológica da tioesterase humana II (hTE)
na modulação de CD4 mediada pela proteína Nef do HIV – 1.**

Banca examinadora:

Prof. Dr. Enrique Roberto Argañaraz – Universidade de Brasília.

Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves – Universidade Brasília

Prof. Dr. Luis Isamu Barros Kanzaki – Universidade Brasília

Brasília, março 2006.

“Não esmorecer para não desmerecer.”

Oswaldo Cruz

“Nos campos da observação, o acaso só favorece os espíritos preparados.”

Louis Pasteur

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha família, fonte de equilíbrio e inspiração na minha vida. Ao meu pai, Josias Ornelas, que sempre demonstrou que para ser um humano completo precisa-se de muitos outros valores que um diploma não pode nos oferecer. A minha mãe, Lourdes Ornelas, que todos os dias me encoraja com sua demonstração de vigor e determinação. Ao meu irmão, Cleuton, que faz com que eu nunca desista dos meus sonhos. A minha irmã, Carina, sincera e amiga para todos os momentos. Além daqueles irmãos que o destino se encarregou de me presentear, Rosineide e Wander.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço ao meu orientador Enrique Argañaraz, por durante estes quase três anos ter me possibilitado o desenvolvimento deste trabalho. Além de ter me demonstrado o caminho eufórico e encantador da ciência. Os meus mais sinceros agradecimentos.
- Aos meus amigos do laboratório de farmacologia molecular. Em especial a minha amiga Daniela Ornellas e meu amigo Gustavo pela amizade demonstrada em muitos momentos importantes deste trabalho.
- Aos meus alunos, pelo carinho e atenção que recebi durante estes últimos anos.
- Ao departamento de virologia da universidade de Ulm na Alemanha. Em especial ao professor Frank Kirchhoff, que possibilitou a realização de grande parte dos experimentos e me orientou durante o tempo que estive em seu laboratório.
- Aos meus eternos amigos: Leandro Discaciate, Lidiane e Thomas Grottenthaler pela lealdade demonstrada.
- Aos alunos de iniciação científica: Silas Dino, Fabrício Bittencourt, Kássia Daglaby, Iele, Pedro e Iago.
- Em especial ao meu primo, amigo e aluno de iniciação científica, Renan Ornelas, que sempre esteve nos momentos mais importantes deste trabalho.
- Aos meus amigos Joaquim Xavier e Carlos Maximiliano. Que possamos trabalhar juntos novamente e que a nossa amizade seja sempre conservada.
- Aos meus colegas do laboratório de biologia molecular. Em especial a minha grande amiga Vera, uma pessoa fantástica que sempre esteve presente com sua ajuda e amizade. Muito Obrigado.
- A minha amiga Luciana Pereira, por ser uma pessoa maravilhosa e ter se tornado uma pessoa muito especial para mim.
- Aos professores Dr. Francisco de Assis, Dr. Luis Kanzaki e Dr. Luiz Alberto Simeoni pelo exemplo de dedicação e amor pela ciência brasileira.
- A meu avô Antônio e a minha avô Eudete (in memoriam).
- Aos meus tios e tias. Em especial a Constância, Leda Maria, João Vieira e Josita.

- Aos meus primos. Em especial: Márcio, Marlúcio, Antônio Marcus, Elton, Paulo Enrique, Ramon, Fábio Paiva, Rômulo, Kleriston, Igor, Clarissa, Érica e Rose.
- A Isabela Gennari pelo companheirismo neste último ano, compartilhando da agústia e da ansiedade que tive em certos momentos deste trabalho. Muito obrigado.
- Aos meus amigos que estiveram comigo na Alemanha: Aline Silva, Fábio, Dennis, Nádia, Alessandro, Telmo, Luênia e Lucênia. Que aquele tempo possa ficar eternizado em nossas vidas.
- Aos professores da minha graduação e pós-graduação.
- A minha querida amiga Ana Bárbara, pelo carinho e consideração que tem por mim. Que esta nossa amizade possa ser maior que o tempo e que possamos ter muitas outras alegrias juntos. Te adoro.
- A minha grande amiga Nebraska, pela confiança que sempre depositou em mim.
- Aos meus padrinhos, pela força e incentivo que sempre me deram.
- Aos meus colegas do Laboratório Multidisciplinar de doença de Chagas.
- Aos meus colegas do Curso de Ciências Biológicas.
- Ao professor e Diretor do curso de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Prof. Dr. Jaime Santana. Meu sincero agradecimento.

Resumo

A diminuição da expressão do receptor CD4 da superfície celular é um dos eventos mais importantes durante a infecção pelo vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV-1). Dentre as três proteínas virais que participam neste processo, Nef, Vpu e Env, a primeira se apresenta como a mais relevante. Estudos realizados por outros grupos e o nosso, evidenciaram claramente a relação entre a capacidade em diminuir a expressão da molécula CD4, a capacidade replicativa e a infectividade viral, sugerindo a participação deste evento na patogênese e progressão à doença. Resultados encorajadores obtidos por nosso grupo demonstraram que o bloqueio da modulação de CD4 mediada por Nef em células infectadas pode ser uma boa abordagem terapêutica. Baseados nestes resultados e com o intuito de identificar novos alvos e abordagens terapêuticas, traçamos como principal objetivo neste estudo determinar o real papel fisiológico da tioesterase humana II (hTE) na modulação do receptor CD4 mediada por Nef. Esta proteína foi descrita como um dos principais parceiros celulares de Nef neste processo fisiopatológico. Utilizando a ferramenta molecular do RNA de interferência (RNAi) para bloquear a expressão de proteínas celulares e virais envolvidas neste fenômeno, foi possível observar que hTE não desempenharia um papel relevante na modulação de CD4, contrariamente ao assinalado em trabalhos prévios. Porém, esta proteína mostrou participar na regulação dos níveis de CD4, possivelmente através da despalmitoilação do receptor viral na superfície celular, levando a internalização da molécula independentemente da presença de Nef. Outros resultados obtidos neste estudo também indicam que ao menos em variantes de Nef que se ligam a esta proteína, como a presente na cepa NL43, a ação da enzima celular poderia ser potencializada pela proteína viral. No entanto a confirmação desta como outras hipóteses relacionadas às possíveis conseqüências biológicas da interação entre hTE e Nef requerem estudos adicionais.

Palavras Chaves: HIV-1, AIDS, Nef, Diminuição da expressão de CD4, hTE e RNAi.

Summary

The down-modulation of CD4 receptor expression is one of the most important events during the HIV-1 infection. Among the three viral proteins involved in this process Nef, Env and Vpu, the first one is the most relevant. Results obtained by our group and others showed a clear relationship between the virus mediated receptor down-modulation, the increasing of infectivity and viral replication of HIV-1, suggesting a pathogenic role in this phenomenon and disease progression. More recently, we provided proof-of-concept that specific inhibition of Nef mediated CD4 down-modulation could be a good therapeutical strategy. Based on these results and aiming to identify new targets and therapeutical strategies, we investigated the physiological role of the human thioesterase II (hTE) in the down-modulation of CD4 receptor mediated by Nef. The hTE was described as one of the main cellular partners of Nef in this process. Using the interference RNA (RNAi) mechanism, as a molecular tool to block cellular and viral proteins expression involved in this phenomenon, we observed that hTE does not play a relevant role on Nef-CD4 modulation, as assigned by previous works. We showed here that the participation in the regulation of cellular surface CD4 levels possibly by a depalmitolation process, making the internalization independent of Nef. The hTE enzymatic action on Nef-NL43 transfected cells showed a probably synergism between Nef and hTE. The confirmation of these preliminary findings as well as, a more thoroughly understanding of the general biological consequences arising from the interaction between hTE and Nef, requires additional studies.

Key words: HIV-1, AIDS, CD4 down-modulation, hTE e RNAi.

Índice

1. Introdução	1
1.1 A Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS)	2
1.1.1 Um breve histórico	2
1.1.2 Perspectivas no controle da AIDS.....	3
1.1.3 Tratamento	3
1.2 O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1)	4
1.2.1 A origem.....	4
1.2.2. Classificação filogenética	5
1.2.3 Estrutura.....	5
1.2.4 A proteína acesória Nef.....	7
1.3 Relevância da modulação do receptor CD4 na patogênese do HIV-1.....	9
1.3.1 A modulação de CD4 mediada por Nef.....	12
1.4 A importância do processamento lipídico na regulação do receptor CD4 na infecção pelo HIV-1	15
1.4.1 O envolvimento de membranas no funcionamento celular	15
1.4.2 O processo de palmitoilação	17
1.4.3 A família das proteínas Tioesterases.....	18
1.5 RNA de interferência	21
1.5.1. Um breve histórico	21
1.5.2 Mecanismo geral do RNAi.....	22
1.5.3 RNAi como uma nova ferramenta contra o HIV-1	23
2. Relevância da Pesquisa & Objetivos.....	26
2.1 Relevância da Pesquisa.....	27
2.1.1 A modulação do receptor viral CD4 como novo alvo terapêutico.	27
2.2 Objetivo Geral.	28
2.3 Objetivos Específicos.....	28
3. Materiais e Métodos	29
3.1 Linhas celulares	30
3.2 Vetores.....	30
3.2.1 Vetores utilizados.....	30
3.2.2 Construção de plasmídeos para expressão de RNAi.....	31

3.3 Sequenciamento dos vetores codificantes para RNAi.	32
3.4 Transfecção de células.	33
3.5 Preparação do extrato protéico	33
3.6 Anticorpos utilizados.....	34
3.7 Eletroforese e Immunoblotting.....	34
3.8 Citometria de Fluxo (FACS).....	34
4. Resultados.....	36
4.1 Desenvolvimento de vetores para RNAi.	37
4.2 Inibição da expressão da tioesterase humana (hTE) por RNAi.	38
4.3 Mudanças significativas nos níveis de CD4 obtidas por transfecção com RNAi.....	40
4.4 Incremento nos níveis de CD4 por inibição de hTE em células transfectadas com diferentes proteínas de lentivírus.	42
4.5 Reciclagem de CD4 mediada por hTE independentemente de Nef.....	43
4.6 hTE não interfere na modulação de CXCR4 mediada por Nef.....	45
5. Discussão.....	47
6. Conclusão.....	54
7. Perspectivas.....	56
8. Referências Bibliográficas:	58

Lista de Siglas e Abreviaturas

A - alanina	K - lisina
AIDS - Síndrome da Imunodeficiência	Kb - kilobases
C - cisteína	kDa - kilodalton
CA - capsídeo	L - Leucina
CCR5 - co-receptor	LTRs - " <i>Long Terminal Repeat Sequences</i> "
CD4 - Receptor	MHC-I - Complexo de Histocompatibilidade do tipo I.
CXCR4 - co-receptor	miRNA- Micro RNA
D - aspartato	N - asparagina
DNA - ácido desoxirribonucléico	OMS - Organização Mundial da Saúde
dsRNA – RNA de dupla fita	pb - pares de base
E - glutamato	PBMC - células mononucleares de sangue periférico
G - Glicina	PR - protease
gp120 - glicoproteína 120	R- Arginina
HAART - " <i>Highly Active Anti-Retroviral Therapy</i> "	RE - retículo endoplasmático
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana	RNA - ácido ribonucléico
HIV-1 - Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1	RNAi – RNA de interferência
HIV-2 - Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 2	RNAm – RNA mensageiro
hTE – Tioesterase humana II Humana	SDS - " <i>Sodium dodecylsulfate</i> "
ICTV - " <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> "	siRNA – Pequenos RNAs de interferência
IN - integrase	W - Triptofano
	Y - tirosina

1. Introdução

1.1. A Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

1.1.1 Uma breve abordagem

Os primeiros casos da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) foram detectados em 1981. Esta doença foi primeiramente diagnosticada em pacientes homossexuais do sexo masculino, nos Estados Unidos da América (Gotlieb *et al.*, 1981), sendo caracterizada por profunda imunossupressão provocada pela diminuição do número de linfócitos T auxiliares (LT-CD4⁺), o que leva a ocorrência de infecções oportunistas e/ou tumores como, por exemplo, um tipo de tumor de pele denominado sarcoma de Kaposi e linfoma de células B.

Apesar de os primeiros casos de AIDS serem datados de 1981, somente em 1983 se teve os primeiros indícios de que a doença tinha como agente infeccioso um retrovírus (Wigg *et al.*, 2002) e finalmente em 1986 o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV*), determinou que o vírus recebesse a designação de Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1). Nesse mesmo ano, outro vírus com características semelhantes foi denominado de HIV-2.

Os mecanismos patogênicos envolvidos na gênese da AIDS não estão completamente elucidados, entretanto, vários estudos demonstram forte correlação entre a mudança de tropismo pelo co-receptor, de CCR5 para CXCR4, e a evolução da doença (Simmons *et al.*, 1996; Reeves *et al.*, 1999). Além disso, recentes evidências apontam ao tipo de resposta imunológica como principal fator envolvido na origem da doença. (Altfeld & Rosenberg, 2000; Emu *et al.*, 2005).

Quase 25 anos após a descoberta do vírus, a pandemia da AIDS ainda continua excedendo todas as expectativas em severidade e impacto sócio-global. Assim, previsões feitas em 1991 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) estimavam que para o ano 2000 o número total de casos acumulados em todo o mundo, poderia atingir os 40 milhões (Healthy, 2002). Porém, estas previsões foram amplamente superadas quando no ano 2000 estudos epidemiológicos mostraram que o número total de casos atingiu os 56 milhões de pessoas, quase a população do Reino Unido, sendo que 20 milhões de pessoas já tinham falecido em consequência da infecção (Unaid, 2000).

Resultados de estudos epidemiológicos realizados no ano de 2005 (Saúde, 2005) mostraram que o número de pessoas infectadas em todo o mundo já atingia 45 milhões, continuando a superar todas as expectativas, e que somados ao número de

óbitos o número total de casos acumulados poderia estar próximo aos 60 milhões de pessoas, sendo que a África sub-Sahariana acumula três quartos dos casos.

A AIDS tem causado um alto custo quando se trata de perda e/ou diminuição na qualidade de vida no mundo. Especialmente na África, aproximadamente 70% das mortes ocorridas são decorrentes da infecção pelo HIV (Healthy, 2002), estimando - se que mais 55 milhões de vidas africanas serão perdidas até 2020 em consequência da AIDS. Esta epidemia já ultrapassou a malária como a principal causa de morte na África sub - Sahariana. Além disso, a AIDS leva mais pessoas a óbito que conflitos armados na África (Unaid 2000).

1.1.2. Perspectivas no controle da AIDS.

A AIDS certamente é uma das patologias humanas que mais despertam medo, preocupação e ansiedade de respostas por parte da sociedade. O desenvolvimento de novas drogas e de novas estratégias para controle e redução do número de pessoas infectadas se faz necessário e urgente. Em 2006, na XVI conferência internacional de AIDS, ficou claro que é necessário o empenho de toda população mundial para que possa se lograr o controle e até a cura desta síndrome.

Um dos grandes problemas no controle da AIDS está no surgimento de variantes resistentes aos inibidores presentes no coquetel antiretroviral, a permanência de reservatórios virais latentes, a presença de efeitos tóxicos colaterais causados pelo tratamento e o alto custo das drogas disponíveis no mercado. Dessa forma, a pesquisa de mecanismos básicos de patogênese volta a desempenhar um papel crucial na identificação de novos alvos farmacológicos e consequentemente no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e de vacinas eficientes e seguras.

1.1.3. Tratamento.

O surgimento da terapia antiretroviral altamente ativa (HAART) proporcionou ao paciente drástica supressão da replicação viral, aumentando-lhe o tempo e qualidade de vida. Atualmente, os diversos antiretrovirais licenciados têm como alvo molecular, principalmente, as enzimas transcriptase reversa (RT), protease (PR) e integrase (IN).

Após o uso do coquetel antiretroviral por mais de uma década, o tratamento mostrou ter sérias limitações: ineficácia na erradicação da infecção, dada à persistência de reservatórios virais, o surgimento de variantes resistentes, devido a mutações e

finalmente, por apresentar sérios efeitos colaterais, como alterações no metabolismo de lipídeos que redundam, em alguns casos, em acidentes cardiovasculares, lipodistrofia muscular e ainda alterações neurológicas (Furtado *et al.* 1999; Yerly *et al.*, 1999). Dentro dessa nova realidade e graças aos novos conhecimentos trazidos pela pesquisa básica, novas drogas e abordagens terapêuticas estão sendo desenvolvidas.

Uma nova tendência no tratamento antiretroviral é a indução de resposta imunológica capaz de complementar o tratamento. Dessa forma, mediante o fenômeno chamado de “auto-imunização”, conseguido pela interrupção temporária da terapia, busca-se estimular a resposta imune específica, em pacientes submetidos à terapia antiretroviral.

Grande parte das mais promissoras drogas que estão sendo testadas em ensaios clínicos visa inibir a interação entre as proteínas virais e celulares. Estas drogas agem, basicamente, nos três diferentes estágios da entrada do vírus na célula hospedeira.

As drogas mais promissoras são as que agem no último estágio, onde ocorre a fusão das membranas virais e celulares. A mais promissora, dentre elas, é o inibidor T-20 (De Clercq, 2004), a qual foi aprovado pela “US Food and Drug Administration”.

Porém, o uso destas novas drogas ainda é demorado e requer grandes investimentos por parte das companhias farmacêuticas e por parte dos consumidores destes produtos. Além de ressaltar que muitas já não são eficazes para muitas pessoas infectadas pelo vírus. Frente a isso, o desenvolvimento de novas formas de terapia se faz necessário.

1.2. O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).

1.2.1. A origem.

A ancestralidade do HIV, tem sido investigada a partir de um vírus símio muito semelhante ao HIV, o SIV do chimpanzé (SIVcpz), encontrado no oeste da África central (Gao *et al.*, 1999). No entanto, a exata origem do SIVcpz permanece desconhecida devido a existência de mais de 20 espécies de primatas africanos, não humanos (Hahn *et al.*, 2000). A análise filogenética de SIVcpz, tem sugerido que este pode ter se originado como resultado da recombinação entre o SIV presente no “red capped mangabeys” (SIVrcm) e o SIV presente no “great spotted nose” (SIVgsn) (Santiago *et al.*, 2002). Outra hipótese é que chimpanzés por possuírem o hábito de predação primatas menores, poderiam ter adquirido vírus por meio da alimentação (Hout

et al., 2004).

1.2.2. Classificação filogenética.

O HIV pertence à família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus* (Latim *lentus* = lento). Através de estudos sorológicos, foram evidenciados dois tipos antigênicos: HIV-1 e HIV-2 (Grant e Cock, 2001), sendo que o HIV-1 é mais virulento e mais disseminado pelo mundo todo, enquanto o HIV-2 é menos virulento e se encontra quase exclusivamente no oeste da África. Tanto o HIV-1 como o HIV-2, compreende diferentes subtipos e organizações genômicas (Hahn *et al.*, 2000).

O HIV-1, amplamente distribuído pelo mundo, é caracterizado por variabilidade rara genética, resultado de sua alta taxa de mutação, que levou a originar inúmeros subtipos, e dentro de cada subtipo, há regiões de polimorfismos e de hiper-variabilidade (Domingo *et al.*, 1998). As diferentes variantes são definidas, por meio da análise da seqüência de nucleotídeos dos genes *gag*, *env* e *pol*. Assim, através deste tipo de análise foi possível subdividir o HIV-1 em três grandes grupos: M (major), O (outlier) e N (nem M, nem O). O grupo M pode ser subdividido em subtipos filogeneticamente associados, "A" a "J" (Yang *et al.*, 1999) e suas formas recombinantes (CRFs) (Robertson *et al.*, 2000).

1.2.3. Estrutura.

O HIV-1 é um patógeno bastante simples com nove genes e 15 proteínas. Apresenta um envoltório lipoprotéico denominado envelope, que recobre o nucleocapsídeo. O envelope na sua parte externa apresenta projeções ou "spikes" contendo trímeros formados pelas glicoproteínas gp120 (SU) e gp41 (TM). A gp120 localiza-se externamente ao vírion, estendendo-se por meio da gp41 na região hidrofóbica do envelope viral (Turner & Summers, 1999). Internamente, o envelope está constituído pela proteína matriz (MA) p17 ligada ao ácido mirístico, sendo responsável pela integridade viral e pela incorporação das proteínas no vírion maduro.

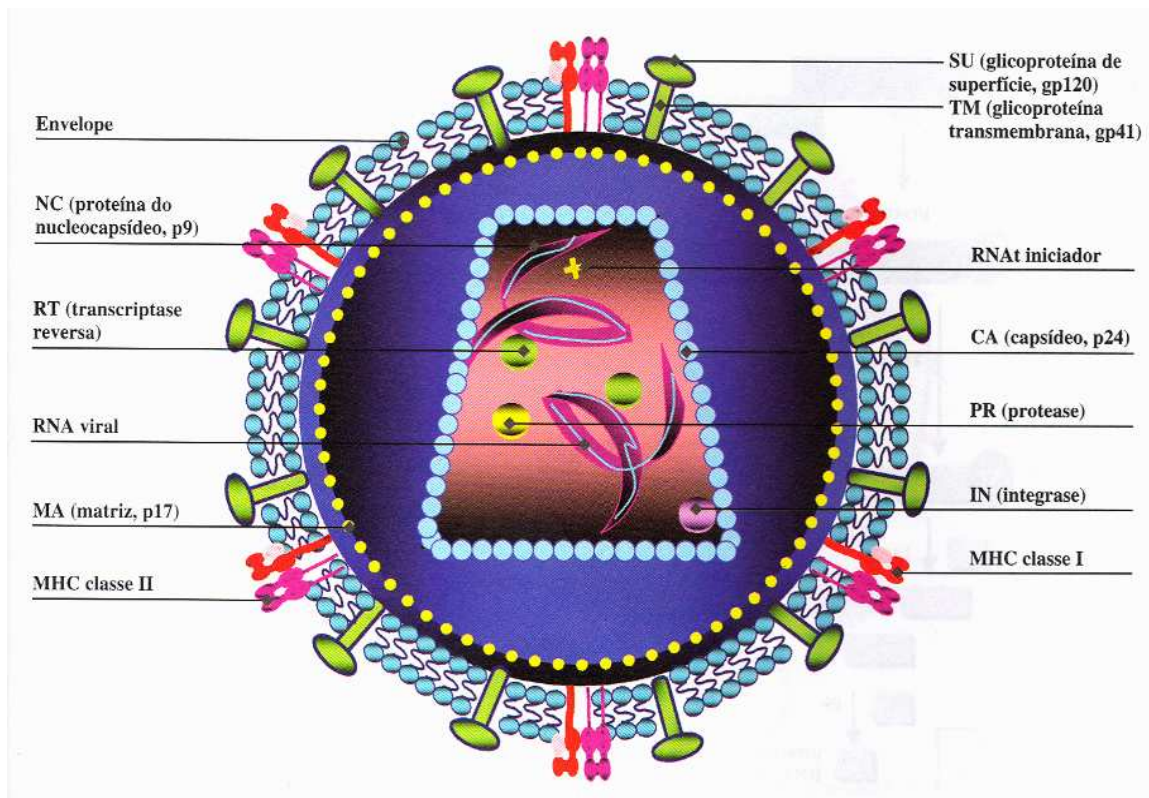


Figura 1. Representação esquemática do vírus da Imunodeficiência Humana, HIV-1. O HIV-1 é envolto por um envelope de natureza lipoprotéica. Em sua face interna, localiza-se a matriz, e na porção central da partícula viral, encontra-se o capsídeo com formato cônico. O genoma viral é constituído por duas fitas de RNA estabilizadas pelas proteínas do nucleocapsídeo (p7). No interior do capsídeo, encontram-se as enzimas Protease (PR), Transcriptase Reversa (RT), Integrase (IN) e as proteínas (Nef, Vif e Vpr) (Wigg *et al.*, 2002).

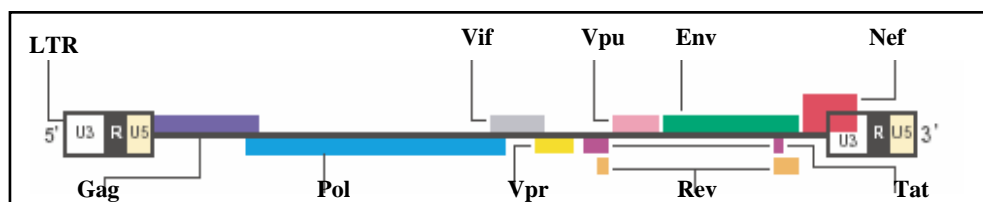


Figura 2. Estrutura genômica do HIV-1. HIV-1 (Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1). Os genes *gag*, *pol* e *env* (barras lilás, azul e verde respectivamente), codificam proteínas estruturais. Os genes *tat* e *rev* (barras roxas e laranjas respectivamente) codificam proteínas regulatórias. Os genes *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu* (barras vermelhas, cinzas, amarelas, rosas e azul claras, respectivamente) codificam proteínas acessórias. Nas terminações 3' e 5', encontram-se as seqüências repetitivas longas, chamadas de LTRs (Greene e Peterlin, 2002).

O nucleocapsídeo possui formato cônico, típico de lentivírus, constituído pela proteína do capsídeo (CA) p24, e como todo retrovírus, o material genético é composto por duas fitas idênticas repetidas de RNA. Três importantes enzimas encontram-se associadas às duas moléculas de RNA, a transcriptase reversa (TR), a integrase (IN) e a

protease (PR), além das proteínas p6 e p9 e as proteínas acessórias Nef, Vif e Vpr (Figura 1).

O genoma do HIV-1 tem aproximadamente 9,8 kb constituindo nove genes, sendo três estruturais, *gag*, *pol* e *env*, dois regulatórios, *tat* e *rev*, e quatro acessórios, *nef*, *vpu*, *vpr* e *vif*, possuindo nas extremidades 5' e 3' longas seqüências repetidas invertidas ou LTRs (Long terminal repeats sequences) (Figura 2).

1.2.4. A proteína acessória Nef.

Nef é uma proteína não enzimática miristoilada que possui entre 27 e 34 kDa, expressa exclusivamente no vírus da imunodeficiência humana (HIV - 1 e 2) e no vírus da imunodeficiência simiana (SIV). Apesar de ser bastante estudada e muito importante para a patogênese dos lentivírus acima citados, as funções desta proteína ainda são pouco compreendidas. A importância biológica de Nef para a replicação viral e desenvolvimento da doença foi demonstrada, “in vivo”, em macacos infectados com SIV (Kestler *et al.*, 1991) e confirmada através da observação da falta de progressão à doença em pacientes infectados por vírus apresentando mutação ou deleção total de Nef (Kirchhoff *et al.*, 1995; Deacon *et al.*, 1995). “In vitro”, a falta desta proteína leva a diminuição da replicação e infectividade viral (Miller *et al.*, 1994 e Schwartz *et al.*, 1995).

A região N-terminal desta proteína, de aproximadamente 60 resíduos, apresenta grande diversidade genética e flexibilidade estrutural, sendo responsável por seu ancoramento à membrana. Esta região é seguida de um domínio C-terminal (domínio central), de aproximadamente 130 aminoácidos, bastante conservado e caracterizado pela presença de estrutura terciária estável. Entre estes dois domínios existe um sítio de clivagem para protease viral e uma região enrolada de aproximadamente 30 resíduos projetada para fora do domínio central. Precisamente, o sítio de clivagem pela protease do HIV 1 se encontra entre os resíduos dos aminoácidos W57 e L58. Estes aminoácidos são altamente conservados, principalmente o triptofano 57. Nef ainda possui um domínio SH3 que está envolvido na interação com proteínas de sinalização intracelular como, por exemplo, Hck, Vav e Lck, sendo que estas interações são fundamentais para a ativação celular mediada por Nef (Saksela *et al.*, 1995; Fackler *et al.*, 1999) e consequentemente para a replicação viral. Nef é modificada após a tradução por fosforilação, além da miristoilação, na porção N-terminal (Arold e Baur, 2001; Geyer e

Peterlin, 2001 e Geyer *et al.*, 1999). Também apresenta em sua estrutura região onde se liga a cinase p21 ativada (PAK) 1 e 2, tioesterase, CD4, uma ATPase vacuolar VIH (NBP1), proteínas adaptadoras de clatrina (AP) e uma região possivelmente de interação com β -Cop (Geyer *et al.*, 2001) (Figura 3).

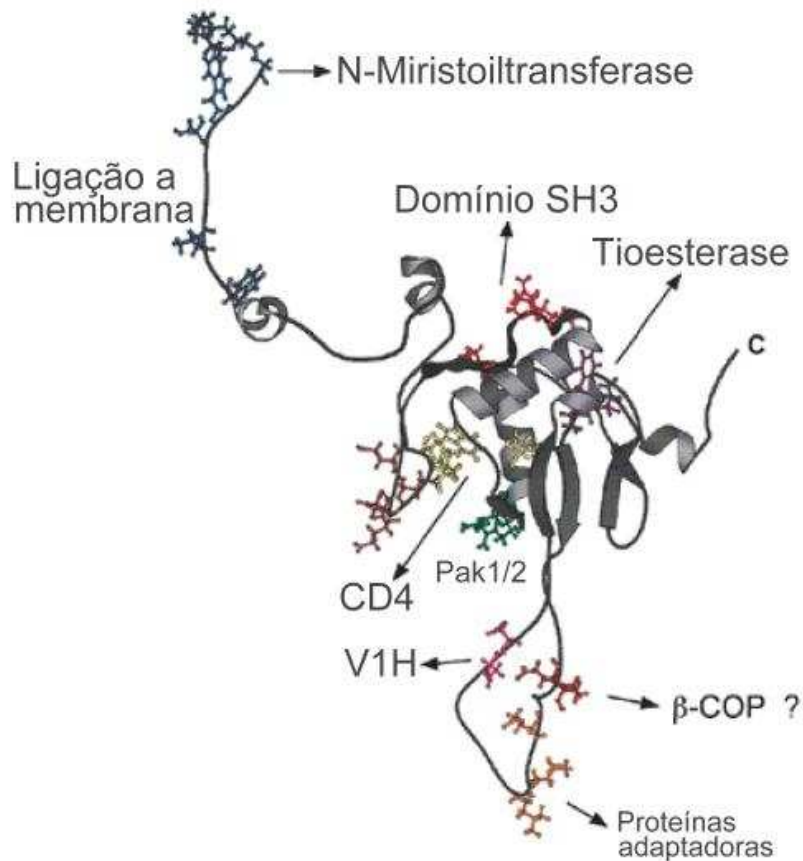


Figura 3. Localização de motivos funcionais na estrutura da proteína Nef do HIV-1. Representação dos motivos funcionais de Nef para interação com fatores celulares como: Tioesterase, CD4, V1H, proteínas adaptadoras de clatrina, PAK 1, PAK 2, Vav (SH3), Lck (SH3), Hck (SH3) e possivelmente β -Cop. A região N-terminal da proteína é a região de ancoramento à membrana, devido principalmente a ação da N-miristoiltransferase (Geyer *et al.*, 2001).

A N-miristoilação de Nef é necessária para sua associação com a membrana celular, característica esta crítica para todas as funções biológicas da proteína, tais como: modulação de CD4, modulação de MHC I, infectividade e ativação de PAK (Geyer *et al.*, 2001).

A fosforilação possivelmente está envolvida na interação entre o grupo mirístico e os seis primeiros resíduos do N-terminal de Nef. A introdução de carga negativa dentro da região de ancoramento pode bloquear a estável associação com a membrana

devido a repulsão desencadeada pela carga negativa da região polar dos fosfolípidos presentes na membrana (Arold & Baur, 2001).

Apesar de serem pouco conhecidos os efeitos de Nef “in vivo”, sabe-se que “in vitro” Nef está envolvida no aumento da replicação e da infectividade viral em células primárias, na alteração do estado de ativação de células T, na interferência das vias de transdução de sinais de macrófagos e na indução da modulação de moléculas de superfície celular tais como: CD4, MHC I, MHC-II, CXCR4 e CD28 (Aiken *et al.*, 1994; Swigut *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 1996; Stumptner-Cuvelette *et al.*, 2001; Hrecka, *et al.*, 2005).

1.3. Relevância da modulação do receptor CD4 na patogênese do HIV-1.

O HIV-1 se liga ao receptor CD4 presente na superfície de linfócitos e macrófagos através da glicoproteína gp120 presente no envelope do HIV-1. Após a interação com CD4 a gp120 sofre mudanças conformacionais que culminam na fusão das membranas virais e celulares (Lapham *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 1997). Momentos após o evento de entrada viral, vários processos são iniciados com o objetivo de assegurar a diminuição da expressão do receptor viral (Figura 4).

Desta forma, a modulação da expressão do receptor CD4 é um dos mais importantes eventos durante a infecção pelo HIV-1, sendo conservada tanto no HIV-1, HIV-2, como no SIV (Marini & Showronski, 1993; Guy *et al.*, 1987; Foster *et al.*, 1994).

Dentre os nove genes virais, *nef*, *env* e *vpu* participam deste processo, demonstrando que a modulação do receptor viral da superfície celular possui papel crítico no ciclo de replicação destes retrovírus. De fato, níveis de CD4 levemente superiores aos observados nos linfócitos primários podem vir a saturar a maquinaria viral (Cortes *et al.*, 2002). Destas três proteínas, Nef é a única empacotada no vírion e expressa logo após a infecção, sendo seus transcritos os mais abundantes nesta fase, desempenhando o papel mais relevante na modulação de CD4 (Coleman *et al.*, 2001; Aiken & Trono, 1995; Chen *et al.*, 1996). Assim, seu efeito pode ser detectado entre 12 a 16 horas após a infecção (Cortes *et al.*, 2002), porém a contribuição de Env e Vpu na modulação de CD4 é detectada apenas em estágios tardios da infecção. Os efeitos de Nef (produto precoce) e Vpu/Env (produtos tardio) são quantitativa e qualitativamente distintos (Chen *et al.*, 1996).

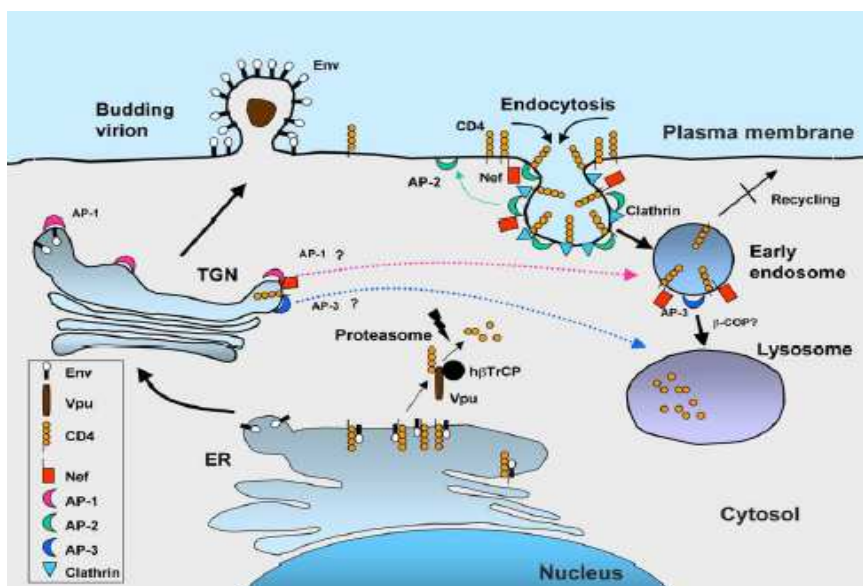


Figura 4. Mecanismos envolvidos na diminuição da expressão de CD4 da superfície da célula infectada pelo HIV-1. A modulação de CD4 ocorre em diferentes locais da célula infectada e envolve as proteínas virais Nef, Vpu e Env. Nef age como um conector na superfície da célula ligando o domínio citoplasmático de CD4 com o complexo protéico adaptador da clatrina AP-2, induzindo a formação de vesículas endocíticas, que posteriormente por recrutamento da proteína β -COP, são direcionadas ao lisossoma para degradação. Já as proteínas Vpu e Env redirecionam as moléculas CD4 recém sintetizadas presentes no RE, para degradação proteossômica (Lama, 2003).

A modulação de CD4 (Figura 4) acontece em três diferentes níveis e localizações: na membrana plasmática, no retículo endoplasmático (ER) e em menor grau no aparelho de Golgi. Na membrana, Nef age como conector ligando o domínio citoplasmático do receptor viral CD4 ao complexo heterotetramérico adaptador de clatrina, AP-2 (Harper *et al.*, 1986). Esta interação leva à formação de vesículas endocíticas, que são direcionadas para o endossoma (Schwartz *et al.*, 1995; Mangasarian *et al.*, 1997) e posteriormente para degradação lisossômica via interação com a proteína β -COP (Piguet *et al.*, 1998). Também foi proposto que Nef direcionaria as moléculas de CD4 presentes na região trans-golgi para os endossomos precoces e tardios através de interações com as subunidades micro (μ) dos complexos AP-1 e AP-3, contribuindo assim com a degradação de proteínas recém sintetizadas (Mangasarian *et al.*, 1997; Le Gall *et al.*, 1998 e Craig *et al.*, 2000).

As outras duas proteínas virais, Vpu e Env, agem no RE bloqueando o transporte das moléculas recém sintetizadas. Assim, e devido sua alta afinidade, a gp160 liga-se fortemente à molécula CD4 proporcionando a formação de agregados que bloqueiam o transporte do receptor viral para a superfície celular (Stevenson *et al.*, 1988; Geleziunas *et al.*, 1994). Posteriormente, Vpu que é uma proteína viral muito conservada entre os diversos isolados virais, mas ausente em HIV-2 e na maioria dos vírus da

imunodeficiência simiana (SIV) (Cohen *et al.*, 1988) age de forma similar a Nef, como conector entre o domínio citoplasmático de CD4 e a proteína β TrCP, membro do complexo protéico de ubiquitinação, Skp1p-CDc53-F-boxE3, que direciona o CD4 para a degradação proteossômica (Margottin *et al.*, 1998).

Existem diversas hipóteses realcionadas a relevância fisiológica deste fenômeno na infecção pelo HIV, dentre as mais aceitas pode-se citar: a) evitar a ligação cruzada da molécula CD4 na superfície de células infectadas, para evitar a transdução de sinais inibitórios, os quais podem inibir a transcrição do DNA viral a partir do “*Long Terminal repeat*” (LTR); b) inibir a indução de apoptose e efeitos citopáticos, antes que a liberação viral aconteça (Newell *et al.*, 1990; Wassmer *et al.*, 1985; Tobiume *et al.*, 2002); c) impedir a super-infecção, o que poderia por em perigo a produção viral (Potash & Volsky, 1998); d) favorecer a liberação de partículas virais (Benson *et al.*, 1993; Bour *et al.*, 1999) e finalmente, evitar a diminuição da infectividade das partículas virais liberadas (Lama *et al.*, 1999; Cortes *et al.*, 2002; Argañaraz *et al.*, 2003). Porém vale ressaltar que estas hipóteses não são excludentes podendo ocorrer concomitantemente, aumentando a eficiência do processo infeccioso.

Os primeiros trabalhos mostrando os efeitos inibitórios da expressão de CD4 na replicação viral foram de Marshall e colaboradores (1992). Posteriormente, trabalhos de Lama e colaboradores (1999), mostraram que a super-expressão do receptor viral CD4 levava a diminuição da infectividade e liberação das partículas virais e que as proteínas Nef e Vpu por meio da participação na diminuição da expressão do receptor da superfície viral, eram capazes de impedir os efeitos inibitórios mediados por CD4. Por outro lado, a eliminação dos efeitos inibitórios mediante o uso de partículas virais pseudotipadas, com as glicoproteínas dos vírus da estomatite vesicular (VSVg) ou com a do vírus da leucemia viral murina (MLV), mostraram claramente que este fenômeno requeria a interação da molécula CD4 e a glicoproteína de superfície viral, a gp120. Entretanto, estes estudos foram realizados em células 293T previamente transfectadas com vetores expressando a molécula CD4, o que pode levar a maior expressão da que é observada nas células infectadas naturalmente, já que estas células não expressam a proteína de transmembrana Lck, a qual se associa a CD4 na superfície viral. Com o objetivo de abordar estas questões, Cortes e colaboradores (2002) realizaram os mesmos estudos de inibição em linhagem de células Jurkat, que expressam Lck, com altos e baixos níveis de expressão de CD4. Desta forma, foi possível observar a diminuição da infectividade entre 75-85%, ainda em células com baixos níveis de CD4, o que mostrava que pequenas

quantidades de CD4 eram prejudiciais para a infectividade viral. Já em células expressando altos níveis de CD4 os níveis de inibição atingiram 95% (Cortes *et al.*, 2002).

Estes estudos em conjunto, mostraram claramente que a inibição da infectividade podia acontecer em condições fisiológicas de expressão de CD4 e bem abaixo dos níveis de expressão requerida para inibir a liberação de partículas virais. A independência entre estes dois fenômenos foi demonstrada pelo mapeamento de domínios diferentes na molécula CD4, para a verificação de ambos os fenômenos (Bour *et al.*, 1999).

Evidências proporcionadas pelos trabalhos de Cortes *et al.* (Cortes *et al.*, 2002) e posteriormente pelos de Argañaraz *et al.* (Argañaraz *et al.*, 2003), onde foram detectados níveis de incorporação da molécula CD4 na superfície das partículas virais, levaram a sugerir inativação funcional da gp120 como consequência da co-expressão de ambas as proteínas na superfície do vírus.

1.3.1. A modulação de CD4 mediada por Nef.

A proteína Nef do HIV e do SIV estão envolvidas na redução da expressão de várias moléculas envolvidas no funcionamento do sistema imune, evento que integra parte das inúmeras estratégias virais para evasão do sistema imune e persistência viral (Aiken *et al.*, 1994; Swigut *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 1996; Stumptner *et al.*, 2001; Hrecka *et al.*, 2005).

Umas das funções mais estudadas de Nef é a capacidade de reduzir dramaticamente o estado de expressão da molécula de CD4 na superfície celular (Aiken *et al.*, 1994). Todos os alelos de Nef isolados fazem modulação de CD4 em vários tipos de célula e em várias condições experimentais. Em camundongos transgênicos expressando Nef do HIV-1 ocorre redução na expressão de CD4 em tímócitos imaturos e comprometimento na seleção de linfócitos CD4+ (Marini & Showronski, 1993). Provavelmente as funções de Nef nas células infectadas pelo HIV são mediadas por interações específicas com proteínas celulares. A elucidação destes mecanismos de ação de Nef requer a identificação destes parceiros.

Nef age sobre as moléculas de CD4 que são incorporadas na membrana celular, ao contrário das outras proteínas virais que agem a nível intracelular. A modulação de CD4 mediada por Nef envolve o aceleração da endocitose do receptor, seguido de degradação pela via lisossomal (Aiken *et al.*, 1994). No entanto, não foram encontradas

modificações no transporte pela via exocítica e na síntese da molécula de CD4 (Sanfridson *et al.*, 1994; Rhee & Marsh, 1994). A hipótese de que a modulação de CD4 mediada por Nef é realizada pela via lisossomal é sustentada por experimentos onde células transfectadas com a proteína viral mostraram maior número de moléculas CD4 marcadas com clatrina do que células que não foram transfectadas (Johannes *et al.*, 2003). Outra evidência em favor do envolvimento da via lisossomal foi obtida mediante o uso de agentes bloqueadores da atividade lisossomal, o que levou ao bloqueio da endocitose de CD4 mediada por Nef (Sanfridson *et al.*, 1994).

A endocitose da molécula de CD4, igual a de outros receptores de membrana, ocorre por intermédio da ligação de clatrina à regiões presentes nas caldas citoplasmáticas destas moléculas, permitindo a internalização e direcionamento dos receptores para os endossomos primários (Robinson *et al.*, 1994). A molécula de CD4 possui quatro aminoácidos hidrofóbicos, incluindo dois resíduos de lisina na calda citoplasmática próximos da região transmembrânica que são importantes para este processo de endocitose (Aiken *et al.*, 1994; Salghetti *et al.*, 1995). Esta região geralmente é encoberta pela ligação de p56 Lck que evita a internalização de CD4 mediada pela ligação de proteínas adaptadoras (AP) ao complexo de clatrina.

Nef apresenta uma via secundária de modulação de CD4. Este mecanismo envolve a fosforilação do resíduo S408 (Garcia *et al.*, 1991) e a ligação direta ao motivo dileucina presente na cauda citoplasmática de CD4 (Mangasarian *et al.*, 1997). Os resíduos W57, L58, G95, G96, L97, R106 e L110 em Nef estão envolvidos no contato com CD4 (Grzesiek *et al.*, 1996; Grzesiek, Bax *et al.*, 1996). O resíduo D204 mostrou ser crítico para a ligação com CD4, desde que o mutante D204K eliminou a ligação a CD4 e conseqüentemente sua internalização (Iafrate *et al.*, 1997). Além disso, Nef também possui um motivo di-leucina, o qual recruta AP2 via cadeia μ 2 (Greenberg *et al.*, 1997). Mutações nos resíduos Y38 e Y39 em Nef elimina esta interação, porém o mutante D204K ainda recruta μ 2 (Piguet *et al.*, 1998). Esta evidência aponta a proteína Nef como uma proteína conectora entre a molécula CD4 e cadeia μ 2, deslocando p56 Lck.

Nef também interage com a subunidade V1H de uma ATPase vacuolar que possivelmente está envolvida no processo de modulação de CD4 (Lu *et al.*, 1998; Mandic *et al.*, 2001). V1H também é chamada de NBP1 (Nef binding protein-1) e se encontra em uma parte de vesículas marcadas com clatrina, sendo necessária para a acidificação de endossomos e lisossomos. Experimentos demonstraram que a região C-

terminal de Nef é importante para a interação com V1H (Erdtmann et al., 2000). NBP-1 se liga a Nef e a subunidade $\mu 2$ de AP2, o que sugere que esta interação possa vir a aumentar a fraca ligação existente entre Nef e AP2 (Lu *et al.*, 1998; Geyer *et al.*, 2002).

Uma outra região de Nef compreendida entre os resíduos EE155/156 foi inicialmente proposta como região de ligação a β -COP, sendo descrita como crítica na modulação de CD4 (Benichou *et al.*, 1994; NA *et al.*, 2004). Esta região foi descrita como sendo responsável pelo direcionamento do complexo Nef-CD4 para os lisossomos secundários. No entanto, um mutante da proteína viral, EK ao invés de EE, ainda se mostrou totalmente funcional na modulação de CD4 (Foster *et al.*, 2001) levantando a possibilidade da existência de um co-fator no recrutamento da proteína β -COP mediada por Nef (Janvier *et al.*, 2001).

Em 1997 Liu et al, através de um sistema, de dupla hibridação em que *nef* foi fusionada a Gal4AD, responsável por encontrar moléculas celulares que se ligam a Nef, conseguiu-se isolar uma tioesterase (hTE), enzima responsável por clivar ligações tioester. A partir da caracterização da seqüência de nucleotídeos desta proteína que interage com Nef, produziu-se um vetor de expressão de hTE recombinante, que teve sua atividade enzimática conferida através de espectrofotometria com auxílio de 5,59-di-tiobis (2-ácido nitrobenzóico). Além disto, o uso de mutantes de Nef possibilitaram a conclusão de que a região de ligação de hTE estaria envolvida na modulação de CD4, já que um tipo de Nef que não realizava modulação de CD4 também não se ligava a hTE.

Posteriormente Cohen et al (2000), através de mutações randômicas na molécula de Nef, obtiveram a região responsável pela interação com hTE (resíduos entre 70 e 125), região esta, também, importante para a modulação de CD4, que foi confirmada através de citometria de fluxo. No entanto, experimentos de co-imunoprecipitação e imunofluorescência confocal demonstraram que alguns mutantes e algumas cepas de Nef (SF2 e mac239) não se ligam a hTE "in vitro", mas continuam modulando CD4. Sendo assim, a necessidade de ligação que a cepa NL43 de Nef possui levanta questões a serem respondidas dentro de um contexto evolutivo e fisiológico viral.

Portanto, a tioesterase humana II (hTE) também foi envolvida no processo de endocitose de CD4 mediado por Nef (Liu *et al.*, 1997). Porém, a participação desta proteína no mecanismo de modulação de CD4 foi questionada já que alguns alelos de Nef não interagem com esta proteína celular, mas continuam diminuindo eficientemente a expressão da molécula CD4 (Cohen *et al.*, 2000).

O resíduo D123 de Nef foi descrito como crítico na interação com hTE, assim como na dimerização da proteína viral na modulação de CD4 e do complexo de histocompatibilidade do tipo I (MHC I) (Liu *et al.*, 1997). Assim como a dimerização, a miristoilação do extremo N-terminal de Nef é fundamental para o ancoramento da proteína à membrana celular, fenômeno este fundamental nas diferentes funções exercidas pela proteína (Geyer *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 2001).

1.4. A importância do processamento lipídico na regulação do CD4 na infecção pelo HIV-1.

1.4.1. O envolvimento de membranas no funcionamento celular.

Em uma célula constantemente as moléculas são renovadas, sendo que para isso muitas necessitam ser substituídas e então degradadas por estruturas celulares. A todo o momento novas moléculas estão sendo originadas e substituindo outras não mais funcionais. Grande parte da comunicação e renovação realizada pela célula é realizada através de vesículas que transitam pelo espaço intracelular. Uma grande quantidade de moléculas é sintetizada no interior da célula como, por exemplo, no retículo endoplasmático (RE) e necessitam ser levados para a membrana plasmática, para outros compartimentos ou para fora da célula. O tráfego de vesículas é um evento constante no espaço intracelular (Rothman, 1996). Portanto a liberação e a fusão de vesículas são pontos chave para grande parte dos processos metabólicos da célula. Eventos como a comunicação entre compartimentos subcelulares, endocitose, secreção de substâncias, infecções celulares e a divisão celular são eventos que envolvem fusão de membranas (Rothman, 1996).

Os receptores presentes na superfície celular são constantemente capturados por vesículas que são fusionadas a endossomos, levando consigo moléculas como, por exemplo, lipoproteínas e ferro, substâncias altamente importantes para o crescimento e o funcionamento celular. Os receptores então são encaminhados novamente para a superfície celular através de outras vesículas ou encaminhadas para os lisossomos para a sua degradação e utilização de seus produtos pela célula (Rothman, 1996).

Desta forma, entender os mecanismos moleculares presentes na formação e fusão destas vesículas no interior da célula é de fundamental importância para a possível interferência e correção quando estes mecanismos encontram-se envolvidos em processos infecciosos ou distúrbios metabólicos graves.

As proteínas integrais são proteínas que estão fortemente ligadas à membrana por ligações hidrofóbicas que só podem ser liberadas por agentes que rompem a membrana como solventes orgânicos ou detergentes. Já as proteínas periféricas se ligam a membrana através de interações eletrostáticas e pontes de hidrogênio que podem ser dissociadas da membrana por mudança de pH. Proteínas ligadas a lipídeos são proteínas que possuem ligação covalente com lipídeos que servem como âncoras hidrofóbicas que se inserem na bicamada lipídica e mantêm a proteína ou parte dela ligada de forma indireta a membrana celular (Nelson *et al.*, 2002).

A ligação de proteínas a lipídeos pode ocorrer de três formas: a) miristoilação: um processo irreversível em que o ácido mirístico, um ácido graxo saturado de 14 carbonos, se liga a proteína de membrana através de ligação amida com o grupo α -amino da glicina amino terminal; b) palmitoilação: É um processo reversível em que o ácido palmítico, um ácido graxo saturado de 16 carbonos, é adicionado ao resíduo de cisteína por ligação tioéster; c) prenilação: os lipídeos estão ligados as proteínas por unidades de isopreno (figura 5) (Nelson *et al.*, 2002).

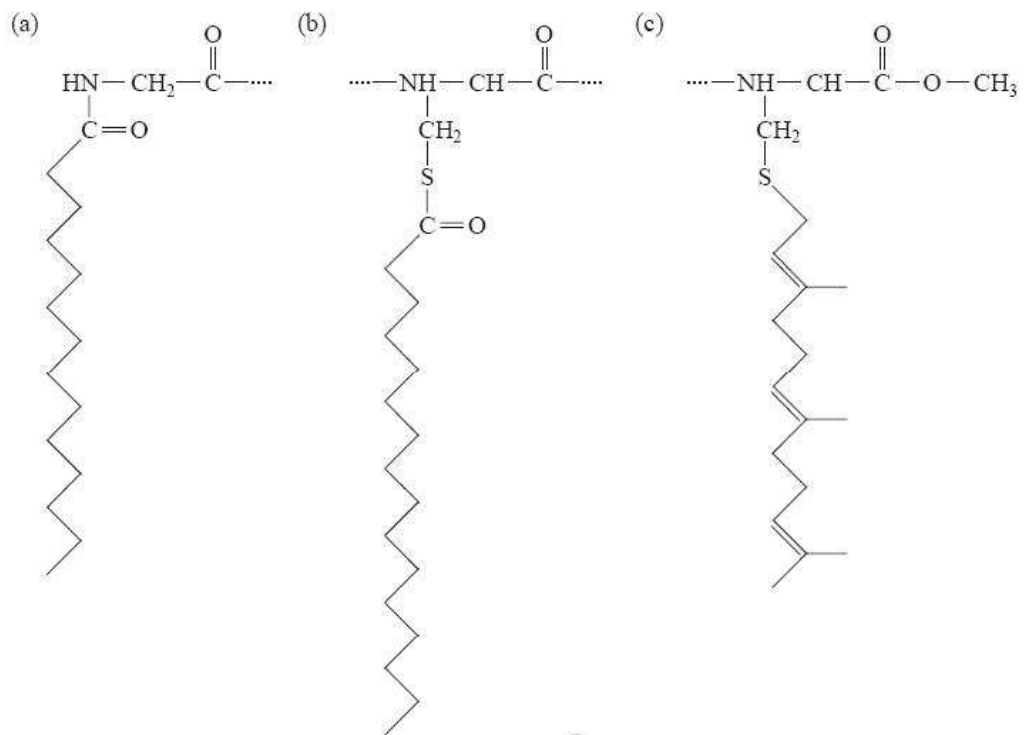


Figura 5. Diferentes tipos de ligação de ácidos graxos as proteínas. Processos pós traducionais fazem com que ácidos graxos sejam ligados as proteínas e com isso elas se ancoram na membrana. (a) Miristoilação. (b) Palmitoilação. (c) Prenilação.

1.4.2. O processo de palmitoilação.

Modificações lipídicas em proteínas são necessárias para a destinação e enriquecimento de proteínas em membranas e vesículas celulares (Resh, 1999; Berthiaume, 2002; Hancock, 2003). A palmitoilação está relacionada à função das proteínas, aumentando a hidrofobicidade e contribuindo para a associação das proteínas às membranas. A palmitoilação possui funções importantes no tráfego subcelular de proteínas através de compartimentos membranosos, assim como a modulação de interações proteína-proteína (Berthiaume, 2002). A modificação por lipídios é um mecanismo universal em células eucariontes e a palmitoilação é uma modificação encontrada exclusivamente em proteínas de membrana (Smotrys & Linder, 2004).

Assim como a grande maioria das reações químicas presentes nas células, a palmitoilação é uma reação enzimática, a qual é mediada por uma proteína palmitoiltransferase (PAT) ou simplesmente aciltransferase. No entanto a relevância desta enzima ainda não foi totalmente elucidada (Kasinathan *et al.*, 1990; Berthiaume & Resh, 1995; Das *et al.*, 1997), pois as regiões de palmitoilação não seguem uma regra rigorosa (Bijlmakers & Marsh, 2003) e, também, devido a proteínas com resíduos de cisteínas alvo para palmitoilação sofrerem, *in vitro*, o processo de palmitoilação na presença de apenas palmitoil-CoA (Duncan & Gilman, 1996; Veit *et al.*, 1998; Veit, 2000; Bizzozero *et al.*, 2001).

O processo de palmitoilação de proteínas foi descrito pela primeira vez na glicoproteína do vírus da estomatite vesicular (VSVG) (Schmidt & Schlesinger, 1980). Subseqüentes experimentos demonstraram que os resíduos de cisteína estão envolvidos no processo de palmitoilação (Rose *et al.*, 1984). A família de proteínas modificadas por palmitoilação é grande e diversificada. De forma geral a palmitoilação aumenta a afinidade das proteínas pela membrana, afetando a localização e função das proteínas. Além disto, a modificação por lipídeos tem importância na distribuição lateral de proteínas na membrana plasmática formando regiões ricas em lipídeos "Lipid rafts" (LR). A palmitoilação junto com outras modificações lipídicas, possui importância na destinação das proteínas modificadas no interior da célula (Bizzozero *et al.*, 2001). A remoção de palmitato das proteínas ocorre constitutivamente e em resposta a sinais celulares. Este processo de despalmitoilação é um processo realizado pelas enzimas tioesterases (Bizzozero *et al.*, 2001).

A molécula de CD4 é uma glicoproteína integral com 55 kDa encontrada na superfície de linfócitos T e macrófagos (Stewart *et al.*, 1986; Thomas *et al.*, 1983). Esta proteína está envolvida na adesão celular (Doyle & Strominer, 1987), sinalização molecular durante a ativação celular (Rosoff *et al.*, 1987) e também serve como receptor para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Dalglish *et al.*, 1984). A molécula de CD4 possui 5 resíduos de cisteína espalhados pelos domínios citoplasmáticos e transmembrânicos. Dois destes resíduos, C420 e C422, fazem parte dos oito resíduos de aminoácidos presentes na parte citoplasmática da molécula envolvidos na ligação de CD4 a tirosina kinase p56 Lck (Shaw *et al.*, 1990; Turner *et al.*, 1990).

Estudos demonstraram que CD4 pode incorporar ácido palmítico marcado com H^3 (Crise & Rose, 1992) e que os resíduos de cisteína presentes na proximidade da junção do domínio transmembrânico e citoplasmático são importantes para a incorporação deste ácido palmítico. Mutações nas cisteínas 394 e 397 reduzem significativamente a incorporação de palmitato marcado pela molécula de CD4, indicando que estes resíduos são palmitoilados (Crise & Rose, 1992). Além disto, estudos prévios demonstraram que a palmitoilção de CD4 é importante para o acúmulo deste receptor nas regiões LR (Fragoso, *et al.*, 2003).

1.4.3. A família das Tioesterases.

As tioesterases são enzimas envolvidas na clivagem de ligações tioesters, reação principalmente envolvida no metabolismo de lipídios. As acetil-CoA tioesterases (ACOT), nome mais correto para as tioesterases, fazem parte de um grupo de enzimas que hidrolisam acetil-CoAs em ácidos graxos livres e coenzima A (CoASH) (figura 6) (Hunt *et al.*, 2002; Yamada, 2005), o que sugere que sejam reguladores em potencial de acetil-CoAs intracelulares, ácidos graxos livres e CoASH. Estas enzimas são localizadas em muitos compartimentos celulares tais como retículo endoplasmático, citosol, mitocôndria e peroxissomos (Hunt *et al.*, 2002). As ACOTs são reguladas pelo Receptor Ativador da Proliferação de Peroxissomos (PPARs) e fatores nutricionais, o que leva a conclusão de que elas estejam envolvidas no metabolismo de lipídios. No entanto as funções fisiológicas destas enzimas ainda não foram totalmente elucidadas (Lee *et al.*, 1995; Hunt *et al.*, 2001). Estas enzimas também podem ser citadas como acetil-CoA hidrolases, acetil-CoA tioester hidrolases e palmitoil-CoA hidrolases.

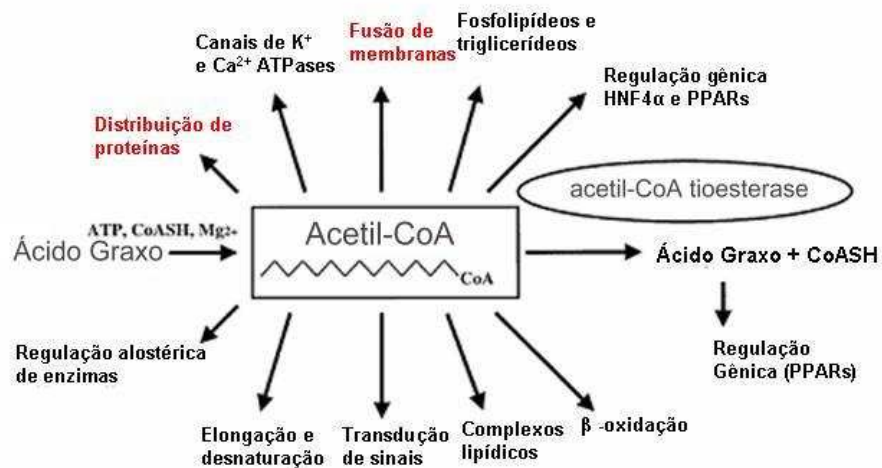


Figura 6. **Possíveis funções celulares da tioesterase humana.** Representação esquemática de prováveis funções celulares em que as tioesterases podem ter participação, destacando-se (em vermelho) a distribuição de proteínas e a fusão de membranas no citoplasma celular (Hunt *et al.*, 2002).

Apesar da função das tioesterases ainda não serem totalmente compreendidas, se admite que estejam envolvidas no controle dos níveis de CoA esters, ácidos graxos livres e coenzima. Desta forma controlaria os efeitos que a variação dos níveis destas moléculas possam ter em processos celulares. Podemos entender a importância das acetil-CoA tioesterases quando observamos a grande quantidade de processos que envolvem longas cadeias de acetil-CoA tioesters e ácidos graxos livres. Estas moléculas são importantes intermediários na síntese e degradação de ácidos graxos (Hunt *et al.*, 2002), além de possuírem papéis importantes na distribuição de proteínas (Wedegaertner *et al.*, 1995; McCabe *et al.*, 1999), regulações alostéricas de muitas enzimas, regulação dos canais de K^+ sensíveis ao ATP, ativação de ATPases de Ca^{2+} , regulação da secreção de insulina, transdução de sinal através da kinase C, redução da indução de apoptose via ácido retinóico e o envolvimento na ligação e na fusão de membranas intracelulares (Hunt *et al.*, 2002) (Figura 6). Além disto, recentemente foi demonstrado a participação de acetil-CoA na regulação transcricional através da interação com receptores nucleares. O acetil-CoA se comporta como um ligante para o receptor nuclear hepático 4 alfa (HNF-4a) o qual é ativado ou inibido dependendo da presença ou ausência de acetil-CoA (Hertz *et al.*, 1998). Acetil-CoA também se liga ao receptor nuclear do hormônio tireoideano e portanto inibe a ligação natural do T^3 (Li *et al.*, 1993). Notavelmente, acetil-CoAs funcionam como antagonistas de $PPAR\alpha$ e $PPAR\gamma$ (Elholm *et al.*, 2001; Murakami *et al.*, 2001), no entanto foi mostrado que

ácidos graxos livres ativam PPAR α (Gottlicher *et al.*, 1992) e agem como ligantes para vários outros PPARs (Kliwer *et al.*, 1997; Forman *et al.*, 1997) (Figura 6).

Em camundongo existem seis genes distintos, todos localizados em grupo, (‘‘cluster’’), com 120 Kb no cromossomo 12D3. Estes seis genes codificam uma proteína que se localiza no citosol (ACOT1), uma proteína na mitocôndria (ACOT2) e quatro proteínas localizadas nos peroxissomos (ACOT3 – ACOT6). Estes genes são resultantes de três exons (Hunt *et al.*, 2005).

Em humanos, no entanto, existem quatro genes distintos presentes no cromossomo 14q24.3 que codificam duas proteínas citosólicas (ACOT1 e ACOT6), uma enzima mitocondrial (ACOT2) e uma enzima peroxissomal (ACOT4). Além disso, o gene *ACOT8* se encontra no cromossomo 20q12-q13.1 (Hunt *et al.*, 2005). Este gene foi clonado de várias espécies e a sua proteína foi caracterizada. ACOT8 (NM_005469) foi descrita primeiramente como uma proteína que interage com a proteína Nef do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) e recebeu denominações como hTE, hTE II e hTE III. Depois este gene foi identificado e caracterizado como uma acetil-Coa tioesterase peroxissomal (Hunt *et al.*, 2005). Porém novas informações são necessárias para o completo entendimento da participação desta enzima no funcionamento celular.

Uma grande quantidade de proteínas é modificada em suas cisteínas por ácidos graxos (palmitoiladas). Esta modificação implica em um aumento de hidrofobicidade, que é importante para diversas atividades biológicas tais como: interação com a membrana, interação com outras proteínas, transporte vesicular, transdução de sinal e manutenção da arquitetura celular. Notavelmente podemos incluir a estas proteínas, palmitoiladas, a óxido nítrico sintetase (Robinson *et al.*, 1995), receptores de transferrina (Jing e Trowbridge, 1987), acetilcolinesterase (Randall, 1994), subunidade α da proteína G, alguns receptores acoplados a proteína G tais como adrenérgicos, serotoninérgicos, receptores dopaminérgicos (Dunphy & Linder, 1998), o receptor CD4 (Crise & Rose, 1992) e proteínas neuronais tais como a proteína sinaptossomal associada (SNAP-25) (Veit, 2000). Ciclos de palmitoilação e despalmitoilação são conhecidos e as ACOTs são enzimas que quando hiper - expressas levam a um aumento de despalmitoilação de subunidade α da proteína G (Duncan & Gilman, 2002). A partir destes dados pode se entender que as ACOTs possuem grande importância nas funções que estas proteínas, acima citadas, exercem no metabolismo celular.

Estudos demonstraram que as ACOTs estão envolvidas na despalmitoilação de resíduos de cisteínas de proteínas presentes nos lisossomos (Lu *et al.*, 1996). Mutações

nestas ACOTs levam a uma desordem neurodegenerativa infantil chamada de Lipofuscinose ceróide neuronal (LCN), caracterizada pelo acúmulo de grânulos amorfos nos neurônios corticais que leva a cegueira, agitação e morte cerebral por volta de três anos de idade (Lu *et al.*, 1996). Possivelmente esta é a patologia mais grave envolvendo a participação de ACOTs, descrita até o momento.

1.5. RNA de interferência.

1.5.1. Um breve histórico.

Um dos grandes avanços nas últimas décadas na biologia molecular, foi a descoberta de que as moléculas de RNA podem regular a expressão de genes (Fire *et al.*, 1998). Por muitos anos as moléculas de RNA eram conhecidas apenas por participar em processos clássicos como transcrição, processamento e tradução. Porém estes conceitos começaram a ser mudados quando em 1998 cientistas descreveram um novo mecanismo de inibição da expressão gênica induzido pela presença de RNA de dupla fita (dsRNA), conhecido como silenciamento da expressão gênica por RNA de interferência (RNAi) (Fire *et al.*, 1998). Este fenômeno foi inicialmente caracterizado como um mecanismo de defesa celular contra infecção viral e mobilização de trasposons que funcionava através da inibição traducional por dsRNA (Ketting *et al.*, 1999). Desde então, este mecanismo também foi descrito em plantas, protozoários, nematóides e insetos. Mostrando sua conservação através da evolução das espécies (Tomari & Zamore, 2005).

No entanto, com o descobrimento de uma nova classe de pequenos RNAs codificados pelo genoma de células eucariontes chamados de micro RNAs (miRNAs) a participação deste fenômeno foi largamente ampliado para vários processos biológicos, tais como: diferenciação, desenvolvimento, morte celular, proliferação celular e hematopoiese, dentre outros (Ambros *et al.*, 2004; Bartel, 2004; Lee *et al.*, 1993; Lim *et al.*, 2003).

Finalmente, o mecanismo de RNAi se tornou poderosa ferramenta para estudo das funções gênicas e bloqueio de infecções pela introdução de dsRNA homólogas ao RNAm alvo (Elbashir *et al.*, 2001; Jacques *et al.*, 2002; Novina & Sharp, 2002; Brisibe *et al.*, 2003).

A primeira tentativa de inibir a expressão gênica com RNAi foi através de transfecção de células de mamíferos em cultivo com oligonucleotídeos sintéticos com 21 nucleotídeos de comprimento chamados de dsRNAs (Elbashir, Lendeckel & Tuschl,

2001; Elbashir *et al.*, 2001). A partir disto, diversos grupos de pesquisa começaram a aplicar esta ferramenta no silenciamento da expressão gênica em células de mamífero em cultivo (Paddison & Hannon, 2002; Paddison *et al.*, 2002). Ao mesmo tempo, outro laboratório desenvolveu um mecanismo de expressão constitutiva de moléculas de dsRNA através do uso de vetores que expressavam RNA com um pequeno dobramento em uma das extremidades (shRNA) (Brummelkamp *et al.*, 2002). Para a expressão de shRNA, estes vetores possuem promotores para RNA polimerase III (H1 e U6) que transcrevem um RNA com sequência senso e anti-senso separadas por uma região que serve de dobramento. Além disso, estes vetores possuem genes de resistência a antibióticos como puromicina e neomicina (Paddison *et al.*, 2002; Brummelkamp *et al.*, 2002). Recentemente, os vetores lentivirais tem se tornado a forma mais usada para a expressão de RNAi (Lee *et al.*, 2003; Anderson & Akkina, 2005).

O uso de RNAi também tem sido utilizado no combate a doenças como câncer, diabetes e outras doenças que envolvem patógenos como vírus, bactérias, fungos e protozoários (Brown & Catteruccia, 2006; Fritz *et al.*, 2006; Simmons *et al.*, 2006; Tong, 2006), devido o RNAi ter o poder de bloquear a expressão de genes possivelmente envolvidos nos processos patogênicos.

1.5.2. Mecanismo geral do RNAi.

Existem duas formas de RNA envolvidas no RNAi: miRNAs e siRNAs (‘‘small interferência RNA’’). Os miRNAs são gerados de regiões codificadas no genoma de células eucariontes, enquanto que os siRNAs podem ser gerados de dsRNAs de vírus, elementos transponíveis ou introduzidos nas células de forma artificial (Fire *et al.*, 1998) (Figura 7).

O processo de produção de miRNAs se inicia com a síntese de longos transcritos primários de miRNAs (pri-miRNAs) (Bartel, 2004). Ainda no núcleo este pri-miRNA é clivado em estruturas estáveis com um dobramento em uma das extremidades, apresentando aproximadamente 70 nucleotídeos e 2 nucleotídeos na extremidade 3’ sem pareamento complementar. Esta clivagem é realizada por uma nuclease conhecida como Drosha (Lee *et al.*, 2003). A esta estrutura resultante damos o nome de pre-miRNA (Lee *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003). Este pre-miRNA é exportado para o citoplasma através de uma Exportina 5 (Yi *et al.*, 2003). No citoplasma este pre-miRNA, assim como dsRNAs artificialmente introduzidos no citoplasma das células, é processado por uma outra

nuclease, chamada Dicer, em fragmentos com aproximadamente 22 nucleotídeos e com os dois nucleotídeos prolongados na extremidade 3' (Hammond *et al.*, 2000). Após esta clivagem, estes pequenos pedaços de RNA dupla fita resultante com grupo fosfato na extremidade 5' e dois nucleotídeos prolongados na extremidade 3' tem suas fitas separadas por uma helicase ainda não caracterizada, através de um mecanismo dependente de ATP (Bernstein *et al.*, 2001). A fita com baixa estabilidade na extremidade 5', chamada de fita guia, é selecionada e incorporada ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) (Hammond *et al.*, 2000; Elbashir *et al.*, 2001). Desta forma, RISC identifica as sequências alvo nos RNAs mensageiros que possuem sequências complementares idênticas as fitas guias, induzindo a degradação do RNAm através de uma nuclease chamada de Argonata 2 (Hammond *et al.*, 2000; Hammond *et al.*, 2001) (Figura7).

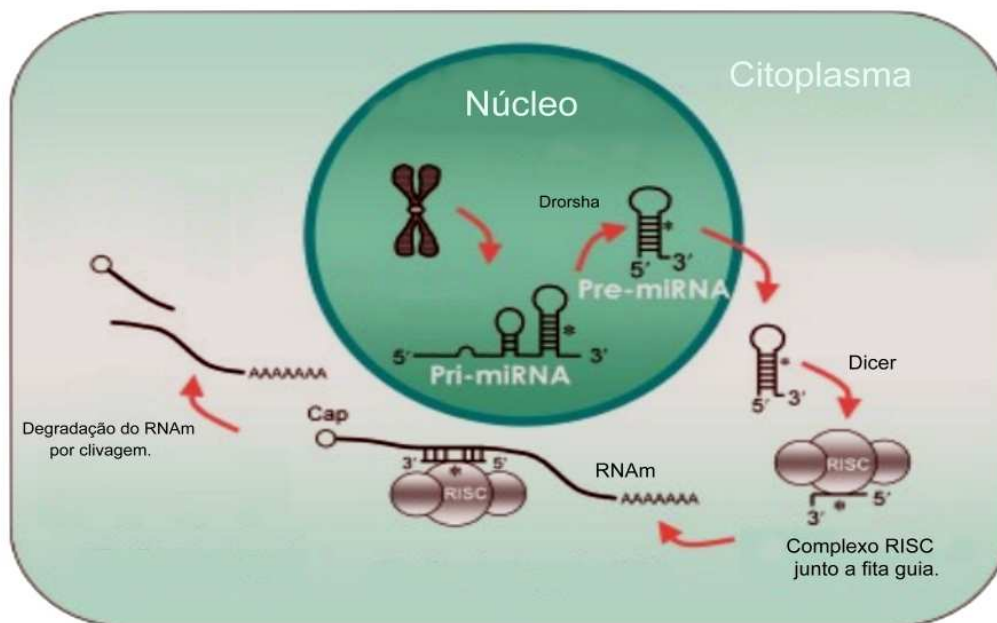


Figura 7. Silenciamento gênico via RNAi em células eucariontes. A produção de RNAi em células eucariontes. Na transcrição se produz moléculas primárias de micro RNAs (pri-miRNA), sendo que, ainda no núcleo ocorre a clivagem da molécula de pri-miRNA por uma RNase do tipo III (Drosha), o que resulta em moléculas de RNA dobradas (pré-miRNA). Estas moléculas de pré-miRNA são exportadas do núcleo e sofrem outra clivagem no citoplasma através de outra RNase do tipo III (Dicer). Após a segunda clivagem a fita guia se liga ao complexo RISC, ocorrendo então a interação com a molécula de RNAm alvo e sua degradação.

1.5.3. RNAi como uma nova ferramenta contra o HIV-1.

A habilidade do HIV-1 de rapidamente sofrer mutações é uma das fortes razões da atual terapia antiretroviral não conseguir erradicar completamente o vírus de

pacientes infectados. O uso de terapia gênica nestes pacientes é baseado nos resultados de experimentos “in vitro” que demonstram que a replicação do HIV-1 pode ser inibida por RNA anti-sentido, RNA catalítico (Ribozimas) e RNA de interferência (Li *et al.*, 2003; Zhang & Burke, 2005; Morris & Rossi, 2006). Dentre estes, o RNAi possivelmente é a ferramenta mais promissora no combate ao HIV. Estudos já demonstraram a capacidade de inibição da replicação do HIV-1 em cultura de células (Novina *et al.*, 2002).

Diversos genes do HIV foram alvos do RNAi, tais como *gag*, *pol*, *vif*, *rev*, *env* e *nef* além da região LTR (Coburn & Cullen, 2002; Jacque *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2003; Boden *et al.*, 2004; Das *et al.*, 2004). Os genes *rev* e *tat* podem servir como bons alvos para terapia gênica por serem essenciais na replicação do HIV-1 (Lee *et al.*, 2003). O gene *nef* pode ser, também, um ótimo alvo para terapia gênica por RNAi devido a parte que possui em comum com o 3' UTR do HIV.

Devido ao fato de que o RNAi é um processo altamente sensível a mutações nas sequências alvo e o HIV possuir uma alta taxa de mutação, o vírus pode se tornar resistente ao mecanismo de RNAi. Estudos realizados “in vitro” mostraram claramente a capacidade do vírus da imunodeficiência humana de driblar este mecanismo inibitório. Estudos realizados (Boden *et al.*, 2003) mostraram que depois de 25 dias de passagens em cultura de células sobre a ação de um RNAi, o HIV-1 se tornou resistente após adquirir uma única mutação em apenas um nucleotídeo na sequência alvo. Em outro estudo utilizando *nef* como alvo, o vírus conseguiu escapar do RNAi desenvolvendo uma estrutura secundária alternativa no seu RNAm (Westerhout *et al.*, 2005). Desta forma a busca por genes do hospedeiro como alvo tem se tornado cada vez mais freqüente. Pesquisadores recentemente demonstraram que a infecção pelo HIV pode ser bloqueada em células hematopoiéticas progenitoras de CD34+ pela inibição simultânea dos co - receptores CXCR4 e CCR5 (Anderson & Akkina, 2005).

Neste contexto os miRNAs, mais do que siRNAs, seriam uma ferramenta mais promissora no tratamento da infecção pelo HIV, já que os requerimentos de complementariedade com a sequência alvo não são tão restritos como no caso dos siRNAs (Schwab *et al.*, 2006).

Apesar de que os genes virais possam servir como alvos para terapia gênica utilizando RNAi, genes do hospedeiro também podem representar bons alvos, já que possuem maior estabilidade em seus processos de transcrição e tradução. Desta forma, a

modulação do receptor CD4, que é um importante evento durante a infecção pelo HIV-1, pode ser um bom campo de estudo para a utilização de RNAi como terapia gênica

2. Relevância da Pesquisa & Objetivos

2.1 Relevância da Pesquisa

2.1.1. A modulação do receptor viral CD4 como novo alvo terapêutico.

Aproximadamente 15 anos após o desenvolvimento e implantação de potente terapia antiretroviral baseada no uso de drogas farmacológicas, a pesquisa em HIV/AIDS atingiu um ponto crítico marcado pelo surgimento de variantes virais resistentes as drogas anti-retrovirais (Cohen, 2001) e a permanência de reservatórios virais latentes (Chun, 1998). Diante deste quadro, se torna altamente prioritária a elucidação de mecanismos básicos de patogênese que permitam a elaboração de novas estratégias terapêuticas que possam auxiliar no tratamento desta doença.

Neste contexto e com o intuito de encontrar novas abordagens terapêuticas, trabalhos realizados por nosso grupo se focalizaram em desenvolver diferentes abordagens com o objetivo de bloquear a modulação do receptor viral CD4 mediado pelo HIV-1. Assim, a expressão na superfície de células infectadas de moléculas de CD4 que não sofrem os efeitos modulatórios das proteínas virais Nef e Vpu levou a uma considerável diminuição da infectividade das partículas virais (Pham *et al.*, 2004). Células 293T, assim como diversas linhagens de células T e células mononucleares de sangue periférico (PBMC) que foram transduzidas com vetores lentivirais capazes de expressar moléculas de CD4 recombinantes (sem a calda citoplasmática ou fusionada com a proteína viral matriz em lugar da mesma) produziram partículas virais com níveis de infectividade e replicação muito menores que aquelas apresentadas por vírus obtidos de células transduzidas com vetores expressando a molécula CD4 completa ou selvagem (Pham *et al.*, 2004). Estes resultados encorajadores nos mostraram claramente que o bloqueio da diminuição de CD4 em células infectadas poderia ser um bom alvo terapêutico.

Até o momento todas as funções de Nef descritas são mediadas por interações específicas com proteínas celulares, sendo que a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos nas diferentes funções de Nef requer a identificação dos diferentes parceiros celulares. Assim como o descrito com as proteínas celulares β -Cop, NBP1 e AP2, a interação de hTE-Nef parece desempenhar uma função relevante no processo de modulação de CD4, pelo menos com a cepa NL43. Porém a falta de modelos experimentais que permitam determinar a exata relevância fisiológica destas interações na modulação de CD4 fazem do RNAi uma poderosa ferramenta tanto para a

identificação de parceiros celulares de Nef, como para novas abordagens terapêuticas envolvendo o silenciamento destas proteínas.

Seguindo esta linha de raciocínio, traçamos, neste estudo, como objetivo a determinação da relevância fisiologia da interação da proteína viral Nef com hTE.

2.2. Objetivo geral

Analisar “in vitro” os efeitos da redução dos níveis da tioesterase humana (hTE) na modulação do receptor viral CD4, mediado por Nef.

2.3 Objetivos específicos

1. Desenvolver vetores codificantes para RNAi contra a thioesterase humana (hTE), a molécula CD4 e a proteína viral Nef.
2. Avaliar a eficiência dos RNAi na inibição da expressão de diferentes proteínas virais envolvidas na modulação de CD4.
3. Analisar o efeito da redução dos níveis de hTE na modulação de CD4 mediada por Nef.
4. Analisar o efeito da redução dos níveis de hTE na modulação de CD4 mediada por diferentes alelos de Nef do HIV-1 e do SIV.
5. Analisar o efeito da redução dos níveis de hTE na modulação de outras moléculas de superfície, não palmitoiladas, mediada por Nef..

3. Materiais e Métodos

3.1. Linhas celulares.

Neste trabalho foi utilizada a linhagem celular aderente de fibroblastos de rim humano denominada 293T. As células foram cultivadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e em meio de cultura Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal inativado (SBF) (Gibco), 2 mM de L-Glutamina (Gibco) e 1% de penicilina/streptomicina (Gibco).

3.2. Vetores.

3.2.1. Vetores utilizados.

Os vetores utilizados neste trabalho encontram-se listados e relacionados com o produto codificado correspondente (tabela 1). Os plasmídeos pCMX e pCG possuem um promotor proveniente do citomegalovírus, sendo desta forma plasmídeos para expressão gênica em células de mamífero. O vetor pCG possui uma região IRES (internal ribosomal entry site) entre o gene de expressão de interesse, *nef* por exemplo, e o gene de GFP (green fluorescence protein), possibilitando assim a expressão do gene de interesse ao mesmo tempo da expressão de GFP (Swigut *et al.*, 2001). O vetor pSUPER (Oligoengine) possui o promotor H1, para RNA polimerase III de mamíferos, antes do sítio de clonagem para seqüências alvo para RNAi. O vetor pBABE é um vetor retroviral de expressão em células de mamífero, sendo que o gene para hTE foi clonado fusionado à um epítopo para HA (Hemaglutinina). O vetor pBEB é o vetor controle negativo para pBABE (Cohen *et al.*, 2000). O vetor pCDNA3 é um vetor comercial sem nenhum gene clonado.

Bactérias *E. coli* (DH5 α) foram transformadas, através da técnica de choque térmico, com os vetores listados abaixo. As bactérias transformadas foram crescidas em 250 ml de meio LB e purificadas através de colunas de cromatografia MIDI-PREP (Promega) conforme descrições do fabricante. A quantificação do DNA obtido foi realizada por meio de espectrofotometria, em comprimento de onda de 260 nm.

Plasmídeo	Produto codificado	Referência /Companhia
pCMX-CD4	Receptor CD4	Argañaraz <i>et al.</i> , 2003.
pCMX-Nef	Proteína Nef-NL43	Aiken <i>et al.</i> , 1994.
pcCCR4	Co-receptor CXCR4	Morgenstern & Land., 1990.
pCG GFP	Proteína GFP	Greenberg <i>et al.</i> , 1997.
pCG mac239 Nef	Proteína Nef do SIV	Greenberg <i>et al.</i> , 1997.
pCG SF2 Nef	Proteína Nef SF2	Greenberg <i>et al.</i> , 1997.
pBEB	Nenhum	Cohen <i>et al.</i> , 2000.
pBABE-hTE HA	hTE com epítipo HA	Cohen <i>et al.</i> , 2000.
pSUPER	Nenhum	Oligoengine
pSUPER CD4	RNAi contra CD4	-
pSUPER Nef	RNAi contra Nef	-
pSUPER hTE	RNAi contra hTE	-
pCDNA3	Nenhum	Clontech

Tabela 1. Listagem e descrição de plasmídeos. vetores utilizados para expressão de moléculas em células de mamífero expressão de RNAi. Os produtos expressos e as referências se encontram indicados ao lado de cada vetor.

3.2.2. Construção de plasmídeos para expressão de RNAi.

Resumidamente, obteve-se as seqüências alvo para os RNAi contra as proteínas a serem bloqueadas a partir das seqüências dos cDNAs de hTE ([NM_005469](#)) e CD4 ([NM_000616](#)) e utilizando-se o programa siDESING disponível na página da companhia Dharmacon (www.dharmacon.com) (Tabela 2). Já a seqüência alvo para Nef ([NC_001802](#)), foi obtida a partir de informação publicada por Westerhout *et al* (2005).

Gene	Seqüência alvo
CD4	5` TGATCGCGCTGACTCAAGA 3`
Nef	5` GTGCCTGGCTAGAAGCACA 3`
hTE	5` GGACGAGGATCTCTTCAGA 3`

Tabela 2. Seqüências alvos para RNAi. Seqüências alvo utilizadas para inibição das proteínas CD4, Nef e hTE, sendo que as seqüências estão dispostas na direção 5` pra 3`.

Oligonucleotídeos contendo as seqüências alvo foram contruídos de acordo com as normas do fabricante do vetor pSUPER (Oligoengine). Posteriormente foi realizado o anelamento dos oligonucleotídeos correspondentes a cada RNAi adicionando-se à 48µl de tampão de anelamento (NaCl 100mM, HEPES 50 mM e pH 7.4) 1 µl de oligonucleotídeo sentido e 1 µl de oligonucleotídeo anti-sentido em concentração de 3 mg/ml, cada um. As condições de anelamento foram as seguintes:

Passo 1: 90°C por 04 min.

Passo 2: 70°C por 10 min

Passo 3: 37°C por 20 min

Passo 4: 10°C por 30 min

Posteriormente os oligonucleotídeos contendo os sítios de restrição para as enzimas *Bgl*II e *Hind*III foram clonados no vetor pSUPER previamente digerido com as mesmas enzimas e purificado do gel de agarose através de coluna de cromatografia para extração de DNA em gel de agarose (Promega), de acordo com as descrições do fabricante.

A reação de ligação foi realizada utilizando-se 0,5 µg de vetor aberto, 1µl de solução com os oligonucleotídeos anelados, 10 unidades de T4 DNA ligase (Fermentas) e tampão da enzima T4 DNA ligase na concentração final de 1X. A solução de ligação foi incubada a 20°C durante 3 horas.

Para obtenção de clones contendo os oligonucleotídeos clonados, bactérias *E. coli* (DH5α) foram transformadas com a reação de ligação pela técnica de choque térmico e posteriormente plaqueadas em meio LB-ágar (1,5% de ágar bacteriológico, suplementado com 100 µg/ml de ampicilina). Após incubação à 37°C por 16 horas as colônias resultantes da seleção por antibiótico foram crescidas em 7 ml de meio LB líquido suplementado com 100 µg/ml de ampicilina e submetidas a extração de DNA plasmídeo pelo método de lise alcalina (Current Protocols in Molecular Biology).

Com objetivo de identificar os clones recombinantes, o DNA dos diferentes clones selecionados, assim como, do vetor controle (pSUPER), foram submetidos a digestão com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Hind*III. Os vetores que continham os oligonucleotídeos ligados apresentaram uma banda de 281 pares de base (pb), enquanto que vetores que não possuem apresentaram 227 pb.

3.3. Sequenciamento dos vetores codificantes para RNAi.

Com objetivo de confirmar as seqüências dos diferentes oligonucleotídeos clonados, os clones recombinantes selecionados foram seqüenciados em ambas as direções com os primers M13 "forward" e M13 "reverse" segundo o protocolo DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech) e

corridas em gel de poliacrilamida usando-se o seqüenciador ABI 377 (Amersham Biosciences).

3.4. Transfecção de células.

A transfecção das células 293T foi realizada pela técnica de precipitação de fosfato de cálcio. Resumidamente, 24 horas antes do experimento as células eram ressuspensas em solução de tampão fosfato (PBS) 1X e colocadas em placas de transfecção de seis poços a densidade de 2×10^5 células /poço em 2 ml de meio de cultura DMEM suplementado.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Para cada ponto, 5 ug (quantidade total) de DNA plasmideal era diluído na mistura de 125 µl de água destilada e 125 µl de CaCl_2 0,5 M. Paralelamente, para a formação dos cristais de fosfato de cálcio, a solução contendo o DNA plasmideal era acrescentada gota a gota à 250 µl de uma solução 2X HBS (NaCl 280 mM; KCl 10 mM; Na_2HPO_4 1.5 mM; dextrose 12 mM; HEPES 50 mM) sob agitação. Finalmente a solução de transfecção era espalhada gota a gota sobre a camada de células. Após 16 horas da transfecção o meio de cultura antigo era retirado e se adicionava meio novo. Após 48 e 72 horas da transfecção as células eram ressuspensas em PBS 1X, lisadas ou marcadas com o anticorpo fluorescente correspondente e analisadas por *immunoblotting* ou citometria de fluxo.

3.5. Preparação do extrato protéico.

A extração de proteínas celulares foi realizada através da adição de tampão RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1% NP-40; 0.25% deoxicolato de sódio; 150 mM NaCl; 1 mM EGTA; 1 mM PMSF; 1 µg/ml de aprotinina, leupeptina e de pepstatina; 1 mM Na_3VO_4 ; 1 mM NaF) sob vigorosa agitação e subsequente centrifugação a 14.500 rpm para eliminação de restos celulares que ficaram no fundo do tubo.

As determinações das concentrações de cada extrato protéico foram realizadas pelo método descrito por Bradford (1976) utilizando-se albumina sérica bovina (Sigma®) como padrão.

3.6. Anticorpos utilizados.

Os anticorpos utilizados neste trabalho se encontram listados abaixo (tabela 3), assim como suas respectivas companhias.

Reagente	Produzido em	Conjugado com	Produzido por	Número de catálogo
Anti CD4	camundongo	PE	BD Biosciences	555347
Anti hTE	camundongo	-	Santa cruz biotechnology	Sc-7343
Anti Hemaglutinina (HA)	camundongo	-	Invitrogen	326700
Anti IgG de camundongo	coelho	PE	Caltag	M35017
Anti IgG de camundongo	coelho	Fosfatase alcalina	Invitrogen	M30108
Anti α -Actina	camundongo	-	Santa cruz biotechnology	Sc-17829
Anti CXCR4	camundongo	PE	BD Biosciences	555974
IgG inespecífico	Camundongo	PE	BD Biosciences	349043

Tabela 3. Listagem de anticorpos utilizados. Lista de anticorpos utilizados (reagentes), onde é demonstrado em que animal foi produzido, se o anticorpo está conjugado com alguma enzima ou fluorocromo, a companhia produtora do reagente e o número de catálogo.

3.7. Eletroforese e Immunoblotting.

Aproximadamente 15 μ g dos diferentes extratos protéicos foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), sob condições desnaturantes e redutoras, conforme método originalmente descrito por Laemmli (1970). Para isso utilizou-se o sistema de eletroforese vertical e os géis foram preparados com concentração de 10% para o gel separador e 4% para o gel concentrador (Current Protocols in Molecular Biology). As amostras foram diluídas em tampão de amostra 5x (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8; SDS 2%; azul de bromofenol 0,1%; β -mercaptoetanol (2-Me) 15 mM e glicerol 10%) e fervidas por 5 min antes de serem aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, pH 8,8; glicina 250 mM e SDS 0,1%) a voltagem constante de 70 V e de 150 V durante a passagem das amostras pelo gel concentrador e separador, respectivamente. Como padrão de massas moleculares para o experimento de eletroforese, utilizou-se o marcador comercial da Bio-Rad: Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards (MW: 10 – 250 kDa).

Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema semi-seco de transferência horizontal (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad) conforme as recomendações do fabricante. A transferência teve duração de 80 min a corrente constante de 0,8 mA/cm², em tampão de

transferência (Tris-HCl 48,4 mM; Glicina 39 mM; SDS 0,037% e Metanol 20%). Após a transferência, a membrana foi incubada em tampão de bloqueio (PBS 1X, Twen20 0,2% e Leite em pó desnatado 5%) por 1 hora a temperatura ambiente em agitação constante.

A membrana foi lavada três vezes em tampão de lavagem (PBS adicionado de Tween 20 0,2%) e então incubado com o anticorpo primário específico para cada proteína diluído 1:200 em PBS 1X contendo 1% de leite em pó desnatado (PBS-Leite), por 1 hora. Após duas lavagens, de 10 min cada, com tampão de lavagem a membrana foi incubada com o anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina, na diluição de 1:2000 em tampão PBS Leite por 1 hora à temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão de lavagem, de 10 min cada, foi adicionado à membrana solução reveladora contendo 66 µl de p-nitro azul tetrazólico (NBT) (Gibco-BRL) e 33 µl de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) (Gibco-BRL) em 10 ml de tampão Tris-HCl 100mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM. A reação de revelação foi interrompida com lavagens sucessivas com água destilada. As massas moleculares das proteínas eram conferidas de acordo com o marcador utilizado no gel.

Para cálculo das densidades relativas (D.R.) utilizou-se o software Alpha Imager 5.0 (Alpha Innotech Corporation).

3.8. Citometria de Fluxo (FACS).

Os níveis de expressão da molécula CD4 nas células transfectadas foram mensurados por imuno-marcação com anticorpo conjugado com ficoeritrina (PE) (Tabela 3). Resumidamente, 48-72 hs após a transfecção, as células foram lavadas duas vezes com solução de PBS 1X e incubadas por 45 min no gelo com o anticorpo numa concentração de 5 µg /ml em PBS. Após incubação com o anticorpo as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X e ressuspendidas em 200 µl de paraformaldeído 2%. As células imunomarcadas foram analisadas por FACS Calibur com o programa CellQuest (BD Biosciences).

A detecção dos níveis intracelulares da proteína hTE foi determinada por imunomarcação intracelular utilizando-se o kit de permeabilização celular (Caltag Laboratory), um anticorpo primário anti-hTE e um anticorpo secundário anti-IgG-PE (Tabela 3). Após a imuno-marcação as células foram fixadas em solução de paraformaldeído 2 % e analisadas por FACS.

4. Resultados

4.1. Desenvolvimento de vetores para RNAi.

Como mencionado em materiais e métodos, a seleção dos vetores para expressão dos diferentes RNAi foi realizada através de análise por enzima de restrição, *EcoRI* e *HindIII*, e posterior sequenciamento dos vetores. A digestão do vetor que não possui a seqüência alvo para RNAi libera um fragmento de 227 pb referente apenas ao promotor H1, enquanto que o vetor que possui a seqüência alvo inserida libera um fragmento de 281 pb. Esta diferença foi observada através de eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 8).

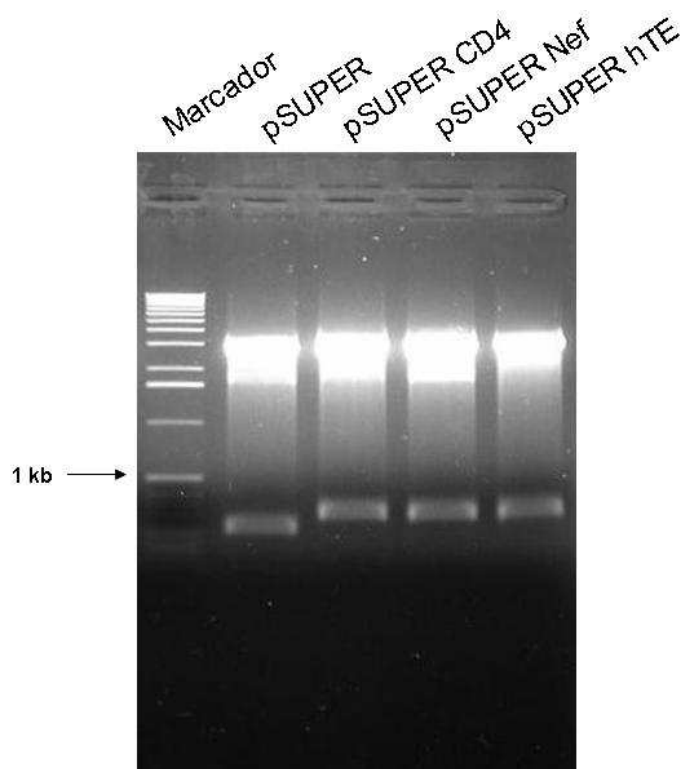


Figura 8. Confirmação da presença de insertos codificantes para os diferentes RNAi no vetor pSUPER. Os diferentes vetores foram digeridos com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* para a verificação da presença de oligonucleotídeos para os diferentes RNAs de interferência. Primeira coluna, marcador de peso molecular 1kb ladder (Invitrogen); Segunda coluna, vetor pSUPER sem oligonucleotídeo para RNAi; Terceira coluna, vetor pSUPER com o oligonucleotídeo para RNAi - CD4 (pSUPER CD4); Quarta coluna, vetor pSUPER com o oligonucleotídeo para RNAi - Nef (pSUPER Nef); quinta coluna, vetor pSUPER com oligonucleotídeo para RNAi - hTE (pSUPER hTE).

Devido ao fato de que o RNAi exige uma total complementariedade entre a fita guia e o RNAm do gene alvo (Brummelkamp *et al.*, 2002), os diferentes vetores carregando os insertos para produção de RNAi foram sequenciados em ambas as direções com objetivo de confirmar a seqüência dos diferentes oligonucleotídeos clonados (Figura 9).

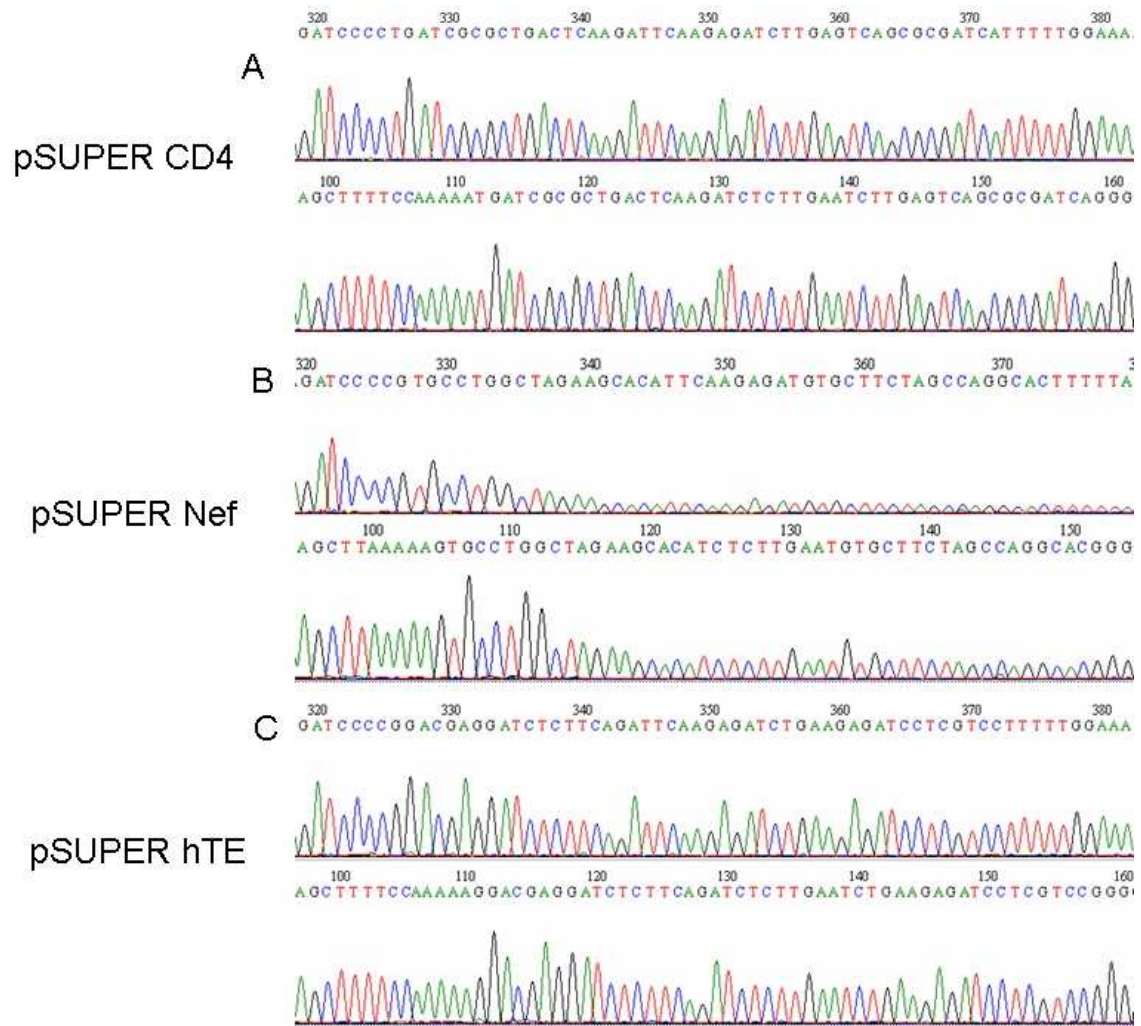


Figura 9. Confirmação da seqüência de oligonucleotídeos para os diferentes RNAs clonados no vetor pSUPER. Fluorogramas correspondentes às seqüências dos diferentes oligonucleotídeos clonados no vetor pSUPER. A) seqüência referente ao vetor pSUPER CD4; B) Seqüência referente ao vetor pSUPER Nef; C) Seqüência referente ao vetor pSUPER hTE. As seqüências superiores são referentes ao primer M13 ‘Foward’, enquanto que as seqüências referentes ao primer M13 ‘Reverse’ se encontram na parte inferior.

4.2. Inibição da expressão da tioesterase humana (hTE) por RNAi.

A eficiência do vetor pSUPER-hTE foi testada por co-transfecção de células 293T, com 0,5 µg de um vetor que expressa uma hTE recombinante (pBABE-hTE-HA), 3,5 µg do vetor pSUPER-hTE e 1 µg de pCDNA3. Após 48 hs da co-transfecção as células foram lisadas e os níveis de hTE recombinante foram determinados por *immunoblotting* com o anticorpo específico para HA (Figura 10A).

Posteriormente, a eficiência do vetor pSUPER-hTE foi testada quanto à inibição da expressão endógena da proteína. Desta forma, células 293T foram transfectadas

apenas com o vetor pSUPER-hTE. Os níveis endógenos de expressão da proteína foram aferidos por *immunoblotting* 48 e 72 hs após transfecção (Figura 10B). Assim, foi possível observar que 48 horas após a transfecção ocorre redução da densidade relativa (D.R.) da banda de hibridação correspondente a aproximadamente 40%, porém após 72 horas houve redução de aproximadamente 90% (Figura 10B). No intuito de confirmar a redução nos níveis de expressão da proteína hTE endógena, foram mensurados os níveis intracelulares da proteína por citometria de fluxo. Desta forma foi possível confirmar a diminuição da expressão da proteína 72 horas após a co-transfecção (Figura 10C).

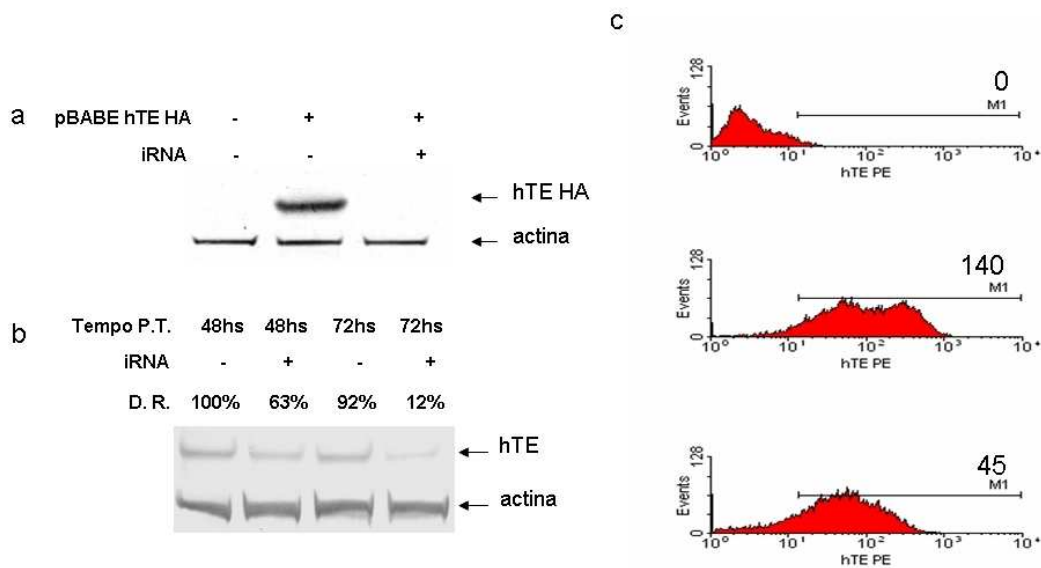


Figura 10. Diminuição da expressão de hTE pelo uso de RNAi. (a) Diminuição da expressão de hTE exógena, expressa em células 293T. *Immunoblotting* de lisados provenientes da co-transfecção de pBABE-hTE-HA e pSUPER hTE após 48 horas da co-transfecção; primeira coluna referente ao controle negativo onde se transfectou apenas pBEB (5 µg); segunda coluna referente ao controle positivo, co-transfecção com pBABE-hTE-HA (0,5 µg), pSUPER (3,5 µg) e pCDNA3 (1 µg); terceira coluna referente a co-transfecção de pBABE-hTE-HA (0,5 µg), pSUPER hTE (3,5 µg) e pCDNA3 (1 µg);. (b) *Immunoblotting* de lisados celulares com intuito de observar a diminuição da expressão de hTE endógena em células 293T. Primeira coluna, controle negativo referente ao lisado coletado 48 horas após co-transfecção com pSUPER (3,5 µg) e pCDNA3 (1,5 µg), apresentando densidade relativa (D.R.) de 100%; Segunda coluna referente a lisado coletado 48 horas após co-transfecção com pSUPER hTE (3,5 µg) e pCDNA3 (1,5 µg), apresentando D.R. de aprox. 63%; Terceira coluna, controle negativo referente a lisado coletado 72 horas após co-transfecção com pSUPER (3,5 µg) e pCDNA3 (1,5 µg), apresentando D.R. de aprox.92%; Quarta coluna referente a lisado coletado 72 horas após co-transfecção com pSUPER-hTE (3,5 µg) e pCDNA3 (1,5 µg), apresentando D.R. de aprox. 12%. (c) Nível de hTE endógena mensurada através de citometria de fluxo (FACS) 72 horas após transfecção. Histograma superior, controle negativo relativo a marcação com anticorpo não específico (IgG PE); Histograma intermediário, controle positivo referente a transfecção com pSUPER sem inserto, indicando assim os níveis normais de hTE na célula; Histograma inferior referente a células transfectadas com pSUPER-hTE, indicando redução de 68% no nível de hTE. Os números presentes em cada histograma são referentes a intensidade de hTE obtidos em cada leitura.

Nas células transfectadas com vetores pCMX-CD4 e pCMX-Nef, foi possível observar uma significativa modulação de CD4 já nas primeiras 48 horas após transfecção (redução de 50%), demonstrando ser um processo mais precoce que a inibição por RNAi (Figura 10). Porém, o uso de RNAi contra Nef só foi capaz de restaurar os níveis de expressão de CD4 após 72 horas da co-transfecção (Figura 12).

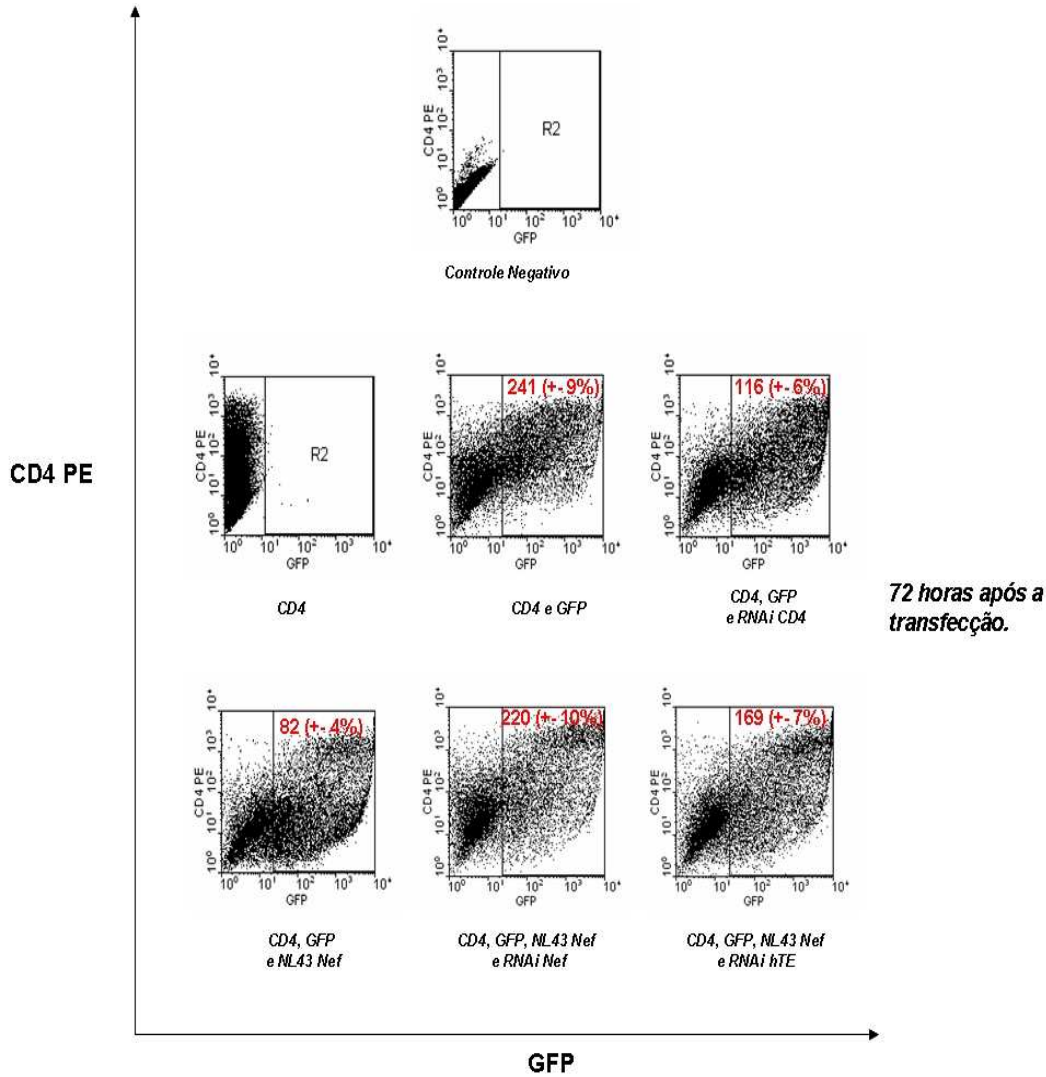


Figura 12. Efeito da expressão de RNAi(s) nos níveis de CD4, 72 horas após a transfecção. Os níveis de CD4 em células 293T co-transfectadas, em diferentes combinações de vetores para expressão de CD4, Nef, GFP e os correspondentes RNAi(s) foram analisadas por FACS. As células foram imuno marcadas com anticorpo fluorescente específico para CD4 (Anti-CD4-PE) e as intensidades de fluorescência para CD4 foram determinadas nas células GFP positivas (região R2). Os diferentes níveis de expressão de CD4 encontram-se indicados em vermelho. Na parte inferior de cada gráfico encontram-se descrito os vetores utilizados em cada experimento, no contole negativo se utilizou apenas o vetor pCDNA3 o qual não codifica nenhum produto.

Finalmente, quando as células 293T foram co-transfectadas com vetores pCMX-CD4, pCG-GFP, pCMX-Nef e pSUPER-hTE não se observou diminuição da redução na modulação de CD4 mediada por Nef, 48 horas após transfecção (Figura 10). Porém

após 72 horas foi possível observar redução na modulação de CD4 aumentando em aproximadamente 106% os níveis de expressão de CD4 (Figura 12).

4.4. Incremento nos níveis de CD4 por inibição de hTE em células transfectadas com diferentes proteínas de lentivírus.

Estudos demonstraram que alguns alelos de Nef como os presentes nas cepas HIV-SF2 e SIV-mac239 não se ligam a proteína hTE (Cohen *et al.*, 2000). Por este motivo foi testada a participação desta tioesterase na modulação da expressão de CD4 mediada por diferentes alelos de Nef e pela proteína Vpu, a qual apresenta um mecanismo diferente de modulação de CD4 (Margottin *et al.*, 1998).

Os experimento foram realizados utilizando-se 3,0 µg de vetor para expressão de RNAi (pSUPER-CD4, pSUPER-Nef ou pSUPER-hTE) ou pSUPER no caso de controle negativo, 0,5 µg do vetor pCMX-CD4, 0,5 µg de vetores expressando a proteína viral Nef (pCMX-Nef, pCG-SF2 Nef, pCG mac239 Nef e pCG- NA7 Nef) e 0,5 µg de vetor pCG-GFP, sendo que a concentração final de 5,0 µg foi mantida em todos os casos completado com DNA do vetor pCDNA 3 quando necessário.

A expressão do RNAi para hTE em células que expressam Nef da cepa NL43 (NL43 Nef) mostrou aumentar os níveis de expressão de CD4 de 76 para 180, equivalente a um aumento de 136%. Entretanto, quando utilizado o alelo de Nef da cepa NA7 foi possível observar uma diminuição da expressão de CD4 maior que a obtida com o alelo de Nef da cepa NL43 Nef (76 vs 34), sendo que expressando o RNAi para hTE os níveis de CD4 em 103% (34 vs 69) (Figura 13).

Quando usados os alelos de Nef presentes nas cepas SIVmac239 e SF2, a redução nos níveis de CD4 foram de 87% e 85% respectivamente (44 e 53). Similarmente ao observado com os outros dois alelos, houve incremento, embora menor, nos níveis de CD4 (de 44 para 81 e de 53 para 90 respectivamente), quando as células foram co-transfectadas com o vetor pSUPER- hTE (Figura 13).

Como esperado, na expressão da proteína Vpu da cepa NL43 (NL43 Vpu) também foi possível observar diminuição na expressão da molécula CD4 (de 342 para 114, equivalente a uma redução de 67%) 72 hs após transfecção (Figura 12). Entretanto inesperado aumento nos níveis de CD4 foi observado quando as células foram co-transfectadas com o vetor pSUPER-hTE (de 114 para 200, equivalente a uma aumento de 57%) (Figura 13).

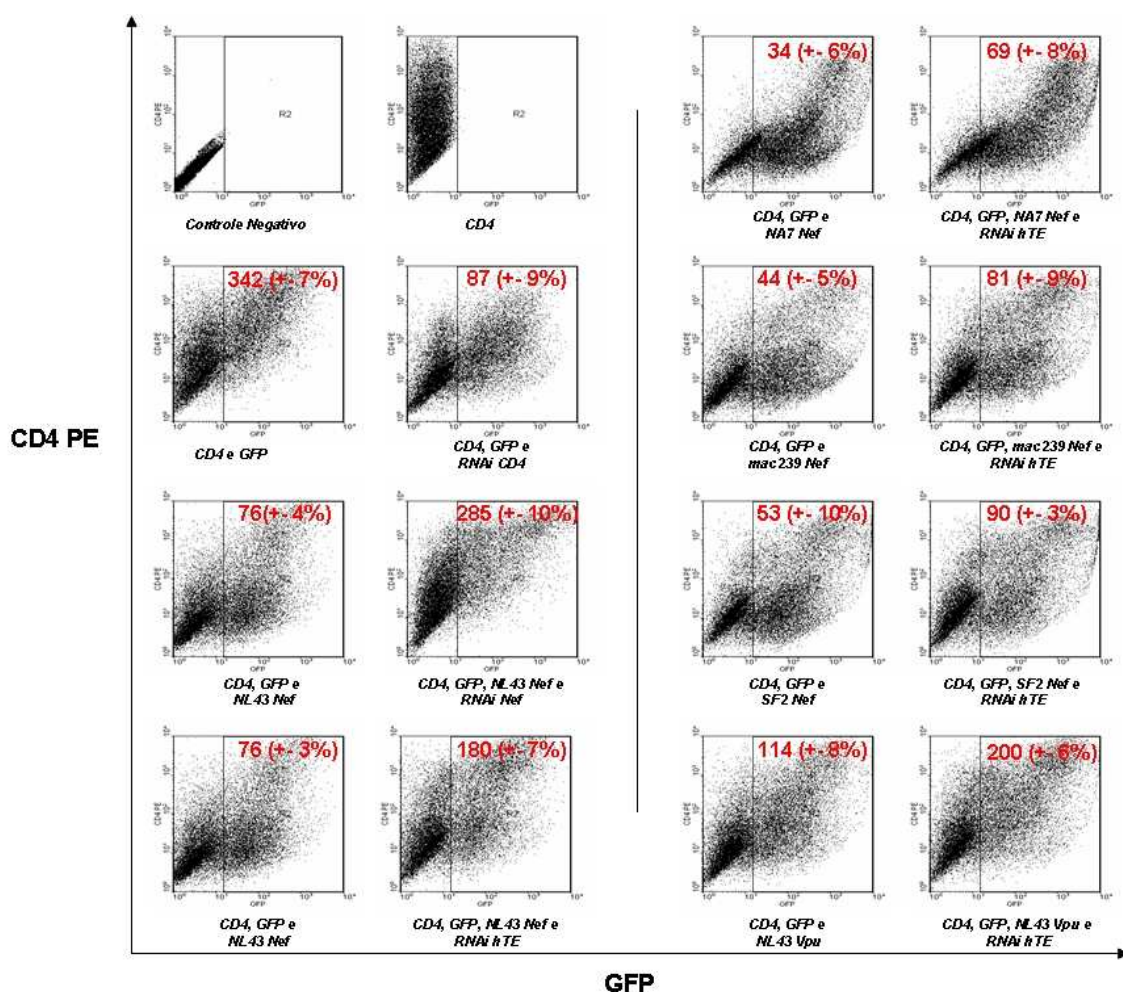


Figura 13. Efeito da expressão de RNAi para hTE na modulação do receptor CD4 mediada por diferentes alelos de Nef e pela proteína Vpu. Os níveis de CD4 foram determinados em células 293T 48 hs após co-transfecção, com vetores expressando as proteínas CD4, os diferentes alelos de Nef (NL4.3, SF2 e SIV-mac239), GFP e o RNAi para hTE. As amostras foram analisadas por FACS. As células foram imuno-marcadas com anticorpo fluorescente específico para CD4 (Anti-CD4-PE) e as intensidades de fluorescência para CD4 foram determinadas nas células GFP positivas (região R2). Os diferentes níveis de expressão de CD4 encontram-se indicados em vermelho. Na parte inferior de cada gráfico encontra-se descritos os vetores utilizados em cada experimento, no controle negativo se utilizou apenas o vetor pCDNA3 o qual não codifica nenhum produto.

4.5. Reciclagem de CD4 mediada por hTE independentemente de Nef.

Baseado nos resultados anteriores relacionados à possível participação de hTE na modulação do receptor CD4, mediada por proteínas que não se ligam a esta proteína celular, foram determinados os níveis de expressão de CD4 em células apenas transfectadas com os vetores codificando as proteínas CD4, GFP e o RNAi para hTE. Interessantemente foi possível observar aumento de 60% (362 vs 561) nos níveis de expressão de CD4 após 72 horas de co-transfecção (Figura 14).

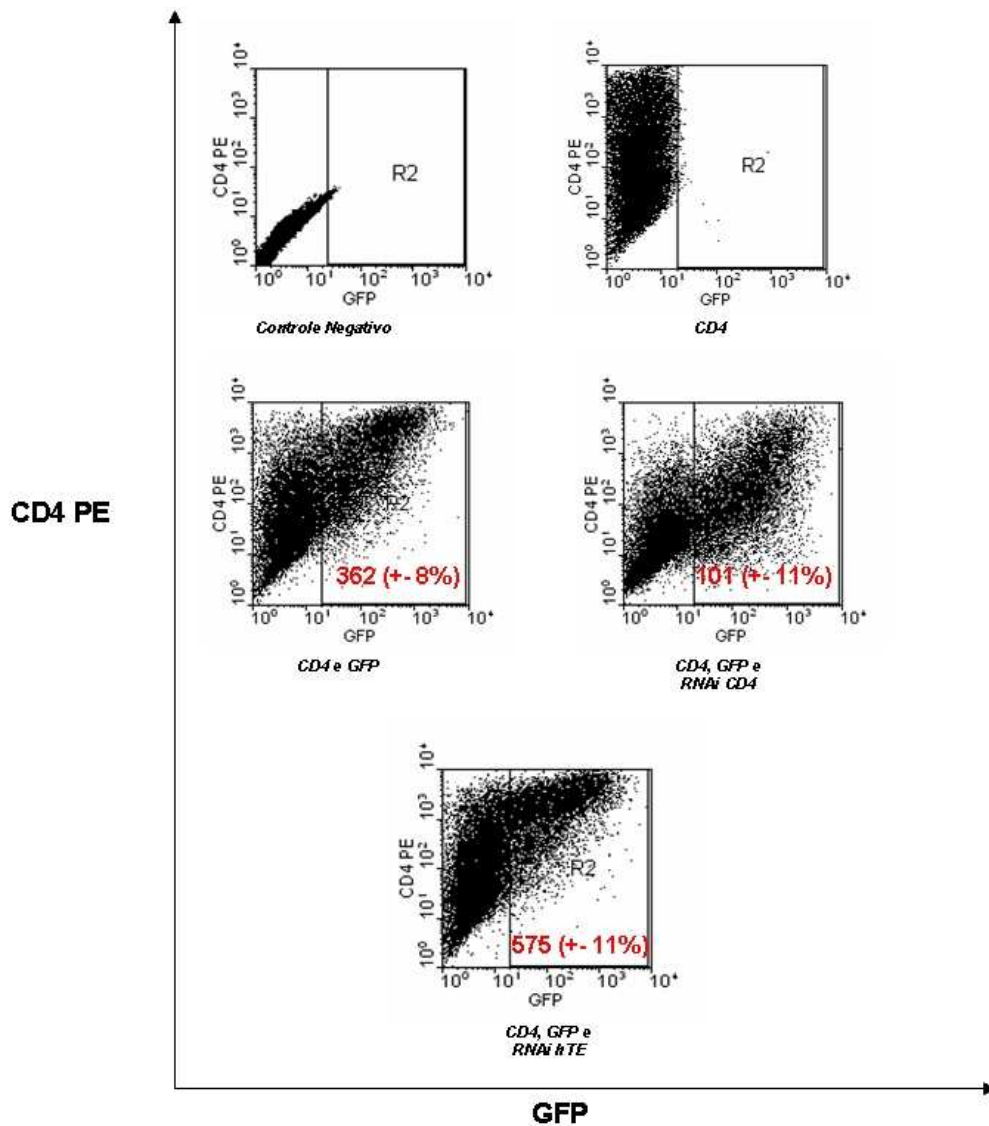


Figura 14. Efeito da expressão de RNAi para hTE na expressão do receptor CD4. Os níveis de CD4 em células 293T co-transfectadas, com vetores para expressão de CD4, GFP e RNAi para hTE foram analisadas por FACS 72 hs após a transfecção. As células foram imuno-marcadas com anticorpo fluorescente específico para CD4 (tabela3) e as intensidades de fluorescência para CD4 foram determinadas nas células GFP positivas (região R2). Os diferentes níveis de expressão de CD4 encontram-se indicados em vermelho. Na parte inferior de cada gráfico encontram-se descrito os vetores utilizados em cada experimento, no controle negativo se utilizou apenas o vetor pCDNA3 o qual não codifica nenhum produto.

As verificações dos níveis de expressão da molécula CD4 na superfície de células 293T foram obtidas através de FACS. Os experimento foram realizados utilizando-se 3,0 μ g de vetor pSUPER-hTE, pSUPER-CD4 ou pSUPER no caso de controle negativo, 0,5 μ g do vetor pCMX-CD4, 0,5 μ g de vetor pCMX-Nef e 0,5 μ g de pCG-GFP, sendo que a concentração final de 5,0 μ g foi mantida em todos os experimentos completado-se com DNA do vetor pCDNA3 quando necessário.

4.6. hTE não interfere na modulação de CXCR4 mediada por Nef.

Com o intuito de observar o efeito da redução dos níveis de hTE em outra molécula também expressa na superfície celular e modulada por Nef, porém não palmitoilada, foram mensurados os níveis do co-receptor CXCR4 (X4) na presença e ausência de NL43-Nef e RNAi para hTE. Dessa forma, foi possível observar que os níveis de expressão da molécula X4 diminuíram em 40% (134 vs 82) na presença de Nef, porém quando co-expresso o RNAi para hTE os níveis de expressão não sofreram variação significativa (82 vs 72). Finalmente, não foi observada variação significativa nos níveis de expressão deste co-receptor na superfície celular apenas na presença do vetor pSUPER- hTE (Figura 15).

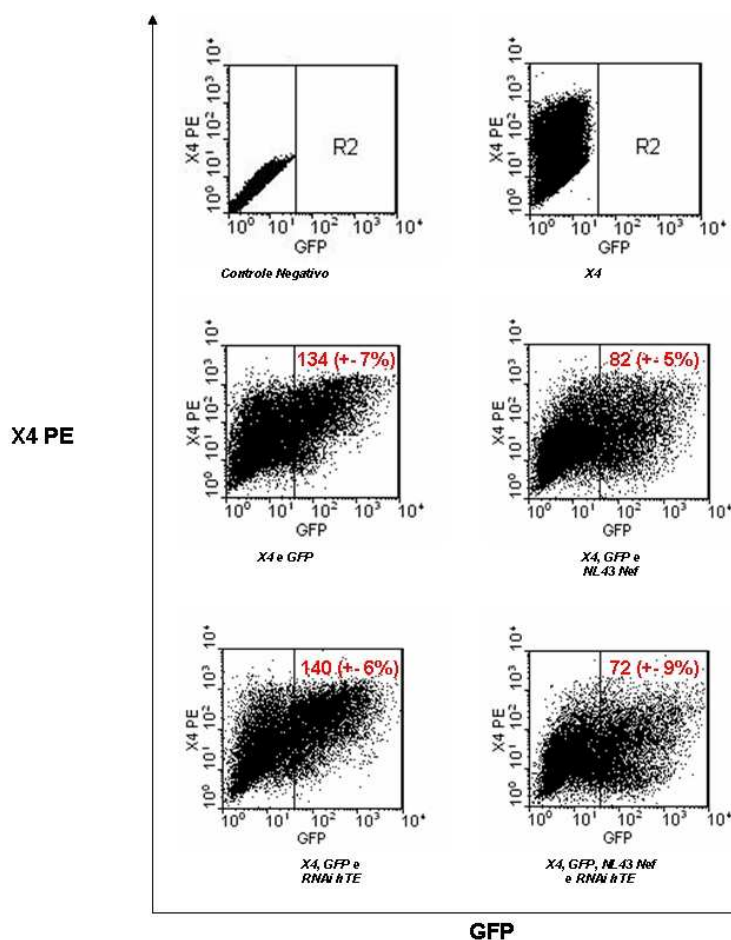


Figura 15. Efeito da expressão de RNAi para hTE na modulação da expressão do co-receptor CXCR4 mediada por Nef. Os níveis de CXCR4 (X4) em células 293T co-transfectadas, com vetores para expressão de X4, GFP e RNAi para hTE foram analisadas por FACS 72 hs após a transfecção. As células foram imuno marcadas com anticorpo fluorescente específico para X4 (tabela3) e as intensidades de fluorescência para X4 foram determinadas nas células GFP positivas (região R2). Os diferentes níveis de expressão de X4 encontram-se indicados em vermelho. Na parte inferior de cada gráfico encontram-se descrito os vetores utilizados em cada experimento, no contole negativo se utilizou apenas o vetor pCDNA3 o qual não codifica nenhum produto.

As variações nos níveis de expressão da molécula X4 na superfície de células 293T foram obtidas através de FACS. Os experimento foram realizados utilizando-se 3,0 µg de vetor pSUPER-hTE ou pSUPER no caso de controle negativo, 0,5 µg do vetor pcCCR4, 0,5 µg de vetor pCMX-Nef e 0,5 ug de pCG-GFP, sendo que o volume final de 5,0 µg era completado com o vetor pCDNA3 quando necessário.

5. Discussão

Como observado em diferentes processos infecciosos, os diferentes níveis de progressão da AIDS observada em pacientes infectados pelo HIV-1 são determinados por complexa interação entre fatores genéticos do hospedeiro e do vírus (Willey *et al.*, 1992; Weiss, 1993). O vírus HIV consegue através da expressão de algumas proteínas denominadas de proteínas acessórias, controlar a maquinaria celular e assim a expressão de alguns receptores, co-receptores e outras moléculas da superfície celular. Estes eventos permitem que o HIV consiga driblar a resposta imune do hospedeiro, aperfeiçoar sua infectividade e capacidade replicativa, dentre outras funções, assegurando desta forma a sobrevivência no seu hospedeiro.

Dentre as principais moléculas presentes na superfície celular, cuja expressão é modulada por Nef, encontram-se as moléculas de CD4, CD28, CXCR4, MHC I, MHC II e DC-SIGN (Aiken *et al.*, 1994; Swigut *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 1996; Stumptner-Cuvelette *et al.*, 2001; Hrecka, *et al.*, 2005), proteínas chaves para o funcionamento do sistema imune. A expressão de todas estas proteínas na superfície celular é regulada total ou parcialmente pela proteína viral Nef.

Neste contexto a elucidação dos diferentes mecanismos envolvidos na modulação da expressão destas moléculas é de suma importância no entendimento da patogênese da doença e no desenvolvimento de novas estratégias anti-HIV que possam vir a se somar ao arsenal de drogas anti-retrovirais atualmente existentes no mercado.

A diminuição da expressão do receptor CD4 na superfície da célula infectada é um dos mais importantes eventos durante a infecção pelo HIV-1, já que a expressão do principal receptor viral na célula infectada inibe dois cruciais eventos na replicação viral: a) infectividade; b) liberação das partículas virais das células infectadas (Benson *et al.*, 1993; Lama *et al.*, 1999; Cortes *et al.*, 2002). A importância deste fenômeno para replicação deste retrovírus se vê reforçada pelo fato de que o HIV-1 usa três proteínas, Nef, Vpu e Env, para assegurar a inibição da expressão de CD4 (Lama, 2003; Levesque *et al.*, 2003). Entretanto, os mecanismos exercidos por Nef (produto inicial) e por Vpu/Env (produtos tardios) são quantitativamente e qualitativamente diferentes. As proteínas Vpu e Env interferem no transporte das moléculas de CD4 recém sintetizadas para a superfície celular, direcionando-a para degradação proteossômica (Margottin *et al.*, 1998).

Apesar de que o mecanismo de ação de Nef tenha sido amplamente estudado nestes últimos anos, existem pontos obscuros que ainda esperam ser esclarecidos.

Porém, é amplamente aceito de que esta proteína age na superfície celular como um conector entre a calda citoplasmática da molécula CD4 e o complexo formado pela proteína clatrina através da interação com AP2, um adaptador heterotrimérico (Greenberg *et al.*, 1997; Piguet *et al.*, 1998). Esta ligação induz a formação de vesículas endocíticas (Bresnahan *et al.*, 1999; Craig *et al.*, 2000) que posteriormente são direcionadas para degradação lisossomal por intermédio da interação de Nef com β -COP (Piguet *et al.*, 1999).

Por outro lado, outras duas proteínas celulares foram também envolvidas na diminuição do receptor CD4 mediada por Nef, uma tioesterase humana II (hTE) e uma bomba vacuolar de próton dependente de ATP, denominada de NBP1 (Cohen *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 1998). Entretanto, o real papel destas proteínas ainda é controverso.

Neste contexto, com o intuito de compreender melhor a participação dos parceiros celulares de Nef e consequentemente identificar possíveis alvos terapêuticos, traçamos como principal objetivo deste estudo determinar a relevância fisiológica de hTE na diminuição da expressão de CD4.

Para atingir este objetivo foi utilizada a técnica de RNA de interferência no intuito de reduzir os níveis intracelulares desta proteína e posterior avaliação da redução da expressão de CD4 mediada por Nef.

No primeiro momento foi possível observar que a vida média da proteína hTE é um fator crítico na inibição da expressão desta proteína pelo vetor pSUPER-hTE. Esta observação se sustenta pelo fato de que o bloqueio da expressão protéica é quase total 48 hs após a transfecção, quando a proteína é expressa a partir do vetor pBABE-hTE-HA (Figura 10A). Porém inibição significativa da expressão da proteína endógena foi atingida apenas 72 hs após a transfecção do vetor pSUPER-hTE (Figura 10B).

Por outro lado, os máximos níveis de inibição da expressão das proteínas CD4 e Nef, foram atingidos apenas 72hs após transfecção com os correspondentes vetores para RNAi (Figuras 11 e 12), resultados estes que podem ser explicados em parte pela diferença nos promotores presentes nos vetores para expressão das proteínas CD4 e Nef, promotor CMX, e o presente nos vetores para expressão dos diferentes RNAi, o promotor H1. Um outro fator importante na interpretação destes resultados é que o bloqueio exercido pelo mecanismo de RNAi ocorre após a transcrição e antes da tradução das proteínas, fazendo com que as proteínas já presentes na célula não fossem afetadas pelo RNAi. Isso poderia explicar o tempo requerido para a observação do efeito do RNAi nos níveis da proteína endógena.

Devido a existência de diferenças na seqüência primária da proteína Nef, foi possível identificar diferentes variantes como, por exemplo, as cepas NL43, NA7 e SF2 do HIV e mac239 do SIV. A região de Nef, da cepa NL43, responsável pela interação com hTE encontra-se entre os resíduos 70 e 125, entretanto, esta região apresenta variações nas cepas SF2 e SIV (Cohen *et al.*, 2000).

Um dado curioso e ainda não elucidado é que apesar de que as variantes presentes nas cepas SF2 e mac239 não se ligam a hTE, como faz a cepa NL43, elas continuam modulando eficientemente a expressão da molécula CD4 (Cohen *et al.*, 2000). Com objetivo de investigar a participação da proteína celular no mecanismo de diminuição da expressão de CD4 mediado pelas variantes presentes nas cepas SF2 e mac239, foram analisados os níveis de CD4 na presença do RNAi contra hTE. Inesperadamente a redução dos níveis endógenos da proteína hTE, pelo uso de RNAi, interferiu na diminuição da expressão de CD4 mediada por todas as variantes de Nef inclusive a mediada pela proteína Vpu, proteína que usa mecanismo diferente ao usado por Nef (Figura 13).

A variabilidade no aumento dos níveis de CD4 após tratamento com o RNAi contra hTE observada nas diferentes variantes de Nef e Vpu, (NL43 136%, NA7 103%, mac239 84%, SF2 70%, Vpu 75%) indicaram fortemente a existência de mecanismo geral e independente de Nef na regulação da expressão de CD4. Entretanto, os aumentos observados na variante que se liga a hTE (NL43 136%) em comparação as que não se ligam, assim como, em comparação a Vpu (mac239 84%, SF2 70%, Vpu 75%) e uma cepa que ainda não se tem informação sobre sua interação com hTE (NA7 103%), poderiam ser um indicativo de certa participação da proteína hTE na modulação de CD4 mediada pela variante presente na cepa NL43.

Com objetivo de verificar a possível dependência dos níveis intracelulares de hTE na manutenção normal dos níveis de CD4 na superfície celular foram determinados os níveis de CD4 em células apenas transfectadas com o vetor para RNAi contra hTE (Figura 14). Após 72 hs da transfecção com o vetor codificante para RNAi contra hTE foi possível observar que os níveis de CD4 na superfície das células eram aumentados em aproximadamente 60% em relação a aqueles observados nas células transfectadas apenas com o vetor para CD4. Desta forma a participação da proteína hTE na regulação dos níveis de CD4 na superfície celular ficou claramente demonstrada. Acreditamos que este fenômeno poderia estar relacionado ao processo de despalmiteilação de CD4, já que esta molécula é palmitoilada e o processo de despalmiteilação na célula é um

processo realizado por tioesterases como, por exemplo, hTE. Este processo de despalmiteoilação pode levar a endocitose do receptor CD4, sendo que a diminuição dos níveis de hTE intracelular levaria o seu aumento na superfície celular. No entanto, é importante ressaltar que o aumento de aprox. 60% no nível de CD4, é bem menor ao observado com as variantes de Nef das cepas NL43 e NA7 (136 % e 103% respectivamente) quando usado o RNAi contra hTE, o que poderia vir a reforçar a idéia que existiria certa contribuição da proteína hTE na modulação de CD4 mediada por estas variantes.

Finalmente tentamos investigar se o efeito da redução nos níveis endógenos da proteína hTE no nível de expressão de CD4 não seria apenas um epifenômeno, ou seja um efeito indireto de outra alteração induzida pela falta de hTE na célula hospedeira como, por exemplo, alteração metabólica geral ou diminuição nos níveis de alguma(s) outras proteína(s) envolvida(s) no mecanismo geral de reciclagem de receptores celulares. Desta forma, foi analisado o efeito da redução dos níveis de hTE na endocitose do co-receptor CXCR4, uma molécula celular também envolvida no processo de infecção e cuja expressão é modulada pela proteína Nef (Hrecka, *et al.*, 2005). É importante ressaltar que esta molécula não é palmitoilada, ao contrário do receptor CD4 (Dzung & Dennis, 2002). Os experimentos de inibição demonstraram que a diminuição dos níveis de hTE pelo uso de RNAi não afetaram a diminuição do co-receptor induzida por Nef (Figura 15), reafirmando a hipótese de que o aumento da expressão da molécula CD4 e a interferência na modulação de CD4 mediada por Nef, provocados pela redução dos níveis de hTE, estariam ao menos em parte relacionados a falta de despalmiteoilação da molécula por hTE.

A menor capacidade de modulação de CD4 da variante de Nef presente na cepa NL43, quando comparada com formas presentes em outras cepas, sugere que a interação de Nef NL43 com hTE poderia ajudar esta variante a incrementar a capacidade de endocitar a molécula CD4 não por um efeito direto da proteína viral mas sim por um aumento na atividade da proteína celular, aumentando assim os níveis de despalmiteoilação do receptor viral. Esta hipótese encontra sustentação em trabalhos prévios relacionados a um aumento da atividade enzimática como consequência da interação com Nef da cepa NL43 (Watanabe *et al.*, 1997). Alternativamente, o aumento da atividade da proteína hTE como consequência da interação com Nef poderia levar a outras modificações no linfócito infectado e ter algum impacto na patogênese da doença. Entretanto estas possibilidades não foram abordadas neste estudo.

Humanos infectados por HIV-1 e macacos por SIV possuem sintomas parecidos definidos como AIDS, porém os mecanismos envolvidos no desencadeamento desta doença ainda não estão claros. Contudo, a partir de informações clínicas, está claro que o tempo de sobrevivência dos pacientes com AIDS está associado com a hipertrigliceridemia, que leva a um decréscimo de armazenamento de lipídeos no tecido adiposo (Safrin & Grunfeld, 1999). Estudos demonstram que a hTE pode estar envolvida na ativação de receptores nucleares, PPAR α e PPAR γ por exemplo, e com isto controlar o metabolismo de lipídios celulares (Elholm *et al.*, 2001; Murakami *et al.*, 2001). Por outro lado, também foi demonstrado que Nef da cepa NL43 participa do processo da transdução de sinais e programa transcricional (Simmons *et al.*, 2001; Shaheduzzaman *et al.*, 2002). Estes dados, vão ao encontro da hipótese de que a interação de Nef-NL43 com hTE possa vir a desempenhar papel importante no desencadeamento de outros distúrbios celulares, como descontrole no metabolismo de lipídios e transcrição de genes relacionados com estes receptores nucleares, além da influência sobre a modulação de CD4.

É importante destacar que os processos de palmitoilação e despalmitoilação estão altamente envolvidos no processo de renovação de moléculas na superfície celular, já que a hiper-expressão de tioesterase leva a um aumento de despalmitoilação de proteínas presentes na membrana celular (Smotrys & Linder, 2004; Duncan & Gilman, 1998). Sendo assim, foi demonstrado que a despalmitoilação leva a redução dos níveis do co-receptor de quimiocina CCR5 (Banplain *et al.*, 2001) e dos receptores de transferrina (Alvarez *et al.*, 1990).

No momento em que se descobriu que a hTE se ligava a Nef (Liu *et al.*, 1997) e que esta interação era importante para a modulação de CD4 (Liu *et al.*, 1997; Cohen *et al.*, 2000), imaginou-se que esta influência na modulação de CD4 mediada por Nef poderia ser proveniente da participação de hTE na formação de vesículas intracelulares, que necessitam da presença de acetil-CoA para correto funcionamento (Liu *et al.*, 1997). Porém, os dados apresentados neste trabalho suportam a idéia de que a participação de hTE estaria relacionada à regulação dos níveis de palmitoilação e não na formação de vesículas intracelulares ou relacionada com proteínas participantes no controle de processos de endocitose das moléculas de superfície celular.

Apesar de experimentos prévios demonstrarem a interação de hTE com Nef-NL43 e não com outros tipos, assim como a influência desta proteína celular na modulação de CD4, estes experimentos não elucidaram totalmente a real participação de

hTE em um contexto geral de infecção. Estes experimentos foram realizados através de sistema de hibridação entre proteínas, hTE e Nef, "in vitro" e por colunas de GST, de tal forma que as inferências e conclusões retiradas sobre os resultados são extrapolações que podem ser falhas em um contexto celular. A hTE pode estar se ligando a Nef e participando de outros eventos infecciosos, além da modulação de CD4, fazendo deste processo um evento secundário da interação entre estas proteínas.

Este trabalho, no entanto, observou pela primeira vez, a nível celular, via proteína endógena ao invés de proteínas recombinantes, que podem levar a conclusões equivocadas, a relevância de hTE em um processo infeccioso do HIV-1. Neste contexto, observamos que hTE possui uma ação mais generalizada sobre a manutenção dos níveis de CD4 na superfície celular, já que a redução dos níveis endógenos da enzima apresenta comportamento parecido em todas as proteínas lentivirais utilizadas neste trabalho.

Entretanto, estudos posteriores são necessários para o total esclarecimento do papel desta proteína na modulação da molécula CD4 e na patogênese da doença.

6. Conclusão

De acordo com os dados obtidos neste trabalho e a partir de informações contidas em literatura, concluímos que:

1. As reduções na diminuição do receptor CD4 mediadas por diferentes variantes de Nef, independentemente de suas capacidades de ligação a hTE, em células apresentando níveis reduzidos de hTE, sugerem fortemente a participação da hTE no mecanismo geral de reciclagem da proteína CD4.
2. O aumento de aproximadamente 60% dos níveis de CD4 em células com baixos níveis de hTE confirma a participação da hTE na regulação fisiológica dos níveis de CD4 na superfície celular.
3. As diferenças obtidas nas porcentagens de redução da modulação de CD4 observadas com as diferentes variantes de Nef, independentemente da interação com hTE, em células com baixo nível de hTE, indicam a participação desta proteína celular na modulação de CD4, mediada pela variante Nef-NL43.
4. A inalteração nos níveis e na modulação (mediada por Nef-NL43) de CXCR4 na superfície de células com níveis reduzidos de hTE, indicam fortemente participação da hTE no processo de despalmitoilação de CD4, e com isso, participação no mecanismo de manutenção dos níveis fisiológicos de CD4.

7. Perspectivas.

Em base aos resultados obtidos neste estudo referentes à participação de hTE na modulação de CD4 mediada pela proteína viral Nef, traçamos os seguintes objetivos futuros:

1. Confirmar a possível potencialização dos efeitos da hTE pela variante de Nef-NL43, assim como o mecanismo responsável por este fenômeno.
2. Verificar a existência da interação hTE-Nef em variantes da proteína Nef presentes em outras cepas de HIV-1, SIV e HIV-2, com o intuito de estabelecer possível impacto deste fenômeno na evolução destes retrovírus e na patogênese da doença.
3. Avaliar a relevância fisiológica da interação hTE-Nef-NL43 no contexto geral da infecção pelo HIV, como, por exemplo, o possível impacto na replicação e infectividade viral.

8. Referências Bibliográficas:

Aiken, C., et al. Nef induces CD4 endocytosis: requirement for critical di-leucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell*, v. 76, p. 853-864. 1994.

Aiken, C.; D. Trono. Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis. *Journal of virology*, v.69, n.8, p.5048-56. 1995.

Altfeld, M. e E. S. Rosenberg. The role of CD4(+) T helper cells in the cytotoxic T lymphocyte response to HIV-1. *Curr Opin Immunol*, v.12, n.4, p.375-80. 2000.

Alvarez, E.; Girones N.; Davis R.J. Inhibition of the receptor-mediated endocytosis of diferric transferrin is associated with the covalent modification of the transferring receptor with palmitic acid. *J. Biol. Chem.*, v. 265, p. 16644–16655. 1990.

Ambros, V. et al. MicroRNAs and Other Tiny Endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr. Biol.*, v. 13, p. 807–818. 2003.

Anderson, J.; Akkina R. HIV-1 resistance conferred by siRNA cosuppression of CXCR4 and CCR5 coreceptors by a bispecific lentiviral vector. *AIDS Res. Ther.*, v. 2, p. 1, p. 1. 2005.

Argañaraz, E. R., et al. Enhanced CD4 down-modulation by late stage HIV-1 nef alleles is associated with increased Env incorporation and viral replication. *The Journal of biological chemistry*, v.278, n.36, p.33912-9. 2003.

Arold, S.T.; Baur, A.S. Dynamic Nef and Nef dynamics: how structure could explain the complex activities of this small HIV protein. *TRENDS in Biochemical Sciences*, v. 26 n. 6, p. 356-363. 2001.

Bartel, D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, v. 116, p. 281–297. 2004.

Benichou S., et al. Physical interaction of the HIV-1 Nef protein with beta-COP, a component of non-clathrin-coated vesicles essential for membrane traffic. *J Biol Chem*, v. 269, p. 30073-6. 1994.

Benson, R. E., et al. Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection. *The Journal of experimental medicine*, v.177, n.6, p.1561-6. 1993.

Bernstein, E., et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, v. 409, n. 6818, p. 363-6. 2001.

Berthiaume L.; Resh M.D. Biochemical characterization of a palmitoyl acyltransferase activity that palmitoylates myristoylated proteins. *J. Biol. Chem.*, v. 270, p. 22399–22405. 1995.

- Berthiaume L.G. Insider information: how palmitoylation of Ras makes it a signaling double agent. *Sci STKE*, v. 2002, p. 41-43. 2002.
- Bijlmakers M.J.; Marsh M. The on-off story of protein palmitoylation. *Trends Cell Biol.*, v. 13, p. 32-42. 2003.
- Bizzozero O.A.; Bixler H.A.; Pastuszyn A. Structural determinants influencing the reaction of cysteine-containing peptides with palmitoylcoenzyme A and other thioesters. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1545, p. 278-288. 2001.
- Blanpain C., et al. Palmitoylation of CCR5 is critical for receptor trafficking and efficient activation of intracellular signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, v. 276, p. 23795-804. 2001.
- Boden, D., et al. Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins. *Nucleic Acids Res.*, v. 32, n. 3, p. 1154-8. 2004.
- Boden, D., et al. Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference. *J. Virol.*, v. 77, n. 21, p. 11531-5. 2003.
- Bour, S., et al. Cell surface CD4 inhibits HIV-1 particle release by interfering with Vpu activity. *The Journal of biological chemistry*, v.274, n.47, p.33800-6. 1999.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of protein Utilizing the principle of Protein-dye Binding. *Anal. Biochem.*, v.72, p. 248-54, 1976.
- Bresnahan, P.A., W. Yonemoto, and W.C. Greene, Cutting edge: SIV Nef protein utilizes both leucine- and tyrosine-based protein sorting pathways for down-regulation of CD4. *J. Immunol.*, v. 163, n. 6, p. 2977-81. 1999.
- Brisibe, E.A., et al. RNA interference: potentials for the prevention of HIV infections and the challenges ahead. *Trends Biotechnol*, v. 21, n. 7, p. 306-11. 2003.
- Brown, A.E.; Catteruccia F. Toward silencing the burden of malaria: progress and prospects for RNAi-based approaches. *Biotechniques*, Suppl, p. 38-44. 2006.
- Brummelkamp, T.R.; Bernards R.; Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, v. 296, n. 5567, p. 550-3. 2002.
- Chan, D. C., et al. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*, v.89, n.2, p.263-73. 1997.
- Chen, B. K., et al. CD4 down-modulation during infection of human T cells with human immunodeficiency virus type 1 involves independent activities of vpu, env, and nef. *Journal of Virology*, v.70, n. 9, p.6044-53. 1996.
- Chun, T.W., et al. Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, n. 15, p. 8869-73. 1998.

- Coburn, G.A.; B.R. Cullen. Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. *J Virol.*, v. 76, n. 18, p. 9225-31. 2002.
- Cohen, E. A., et al. Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1. *Nature*, v.334, n.6182, p.532-4. 1988.
- Cohen, G. B., et al. The human thioesterase II protein binds to a site on HIV-1 Nef critical for CD4 down-regulation. *J Biol Chem*, v.275, n.30, p.23097-105. 2000.
- Cohen, O.J.; Fauci A.S. Current strategies in the treatment of HIV infection. *Adv Intern Med*, v. 46, p. 207-46. 2001.
- Coleman, S. H., et al. The HIV-1 Nef protein as a target for antiviral Therapy. *Emerging Therapeutic Targets*, v.5, n.1, p.1-22. 2001.
- Cortes, M. J., et al. Cell surface CD4 interferes with the infectivity of VIH-1 particles released from T cells. *Journal Biology Chemistry*, v.277, p.1770-1779. 2002.
- Cortes, M. J., et al. Cell surface CD4 interferes with the infectivity of VIH-1 particles released from T cells. *Journal Biology Chemistry*, v.277, p.1770-1779. 2002.
- Craig, H. M., et al. 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, n.1, p.9-17. 2000.
- Crise B.; Rose JK. Identification of palmitoylation sites on CD4, the human immunodeficiency virus receptor. *J Biol Chem.*, v. 267, n. 19, p. 13593–13597. 1992.
- Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons Inc., v.2., New York. 2000.
- Dalglish, A.G., et al. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, v. 312, p. 763-766. 1984.
- Das A.K., et al. Purification and biochemical characterization of a protein-palmitoyl acyltransferase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, v. 272 p. 11021–11025. 1997.
- Das, A.T., et al. Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. *J. Virol.*, v. 78, n. 5, p. 2601-5. 2004.
- De Clercq, E. Antiviral drugs in current clinical use. *Journal of Virology*, v. 30, p.115-133. 2004.
- Deacon, N. J., et al. Genomic Structure of an Attenuated Quasi Species of HIV-1 from a Blood Transfusion Donor and Recipients. *Science*, v. 270, p. 988–991.1995.
- Domingo, E., et al. Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. *Emerging Infectious Diseases.*, v.4, p.521-527. 1998.

Doyle, C.; Strominger, J. L. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature*, v. 330, p. 256-259. 1987.

Duncan J.A.; Gilman A.G. Autoacylation of G protein α subunits. *J. Biol. Chem.*, v. 271, p. 23594–23600. 1996.

Duncan, J. A.; Gilman A. G. A cytoplasmic acyl-protein thioesterase that removes palmitate from G protein alpha subunits and p21(RAS). *J. Biol. Chem.*, v. 273, p. 15830–15837. 1998.

Dunphy, J. T.; Linder M. E. Signalling functions of protein palmitoylation. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1436, p. 245–261. 1998.

Dzung H. N.; Dennis T. Cholesterol is Essential for MIP-1 β Binding and Conformational Integrity of CC Chemokine Receptor 5. *Blood*, v. 99, n. 12, p. 4298-4306. 2002.

Elbashir, S.M., et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, v. 411, n. 6836, p. 494-8. 2001.

Elbashir, S.M.; Lendeckel W.; Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.*, v. 15, n. 2, p. 188-200. 2001.

Elholm, M., et al. Acyl-CoA Esters Antagonize the Effects of Ligands on Peroxisome Proliferator-activated Receptor alpha Conformation, DNA Binding, and Interaction with Co-factors. *J. Biol. Chem.*, v. 276, p. 21410-21416. 2001.

Emu, B., E. Sinclair, et al. Phenotypic, functional, and kinetic parameters associated with apparent T-cell control of human immunodeficiency virus replication in individuals with and without antiretroviral treatment. *Journal of Virology*, v.79, n.22, p.14169-78. 2005.

Erdtmann L., et al. Two independent regions of HIV-1 Nef are required for connection with the endocytic pathway through binding to the mu 1 chain of AP1 complex. *Traffic*, v. 1, 871-83. 2000.

Fackler O.T. et al. Activation of Vav by Nef Induces Cytoskeletal Rearrangements and Downstream Effector Functions. *Mol. Cell.*, v. 3, p. 729-739. 1999.

Fire, A., et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, v. 391, n. 6669, p. 744-5. 1998.

Forman B.M.; Chen J.; Evans R.M. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ . *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 94, p. 4312–7. 1997

Foster J.L., et al. Genetic and functional diversity of human immunodeficiency virus type 1 subtype B Nef primary isolates. *J Virol*, v. 75, p. 1672-80. 2001.

Foster, J. L., et al. Specific suppression of human CD4 surface expression by Nef from the pathogenic simian immunodeficiency virus SIVmac239 open. *Virology*, v.201, n.2, p.373-9. 1994.

Fragoso, R., et al. Lipid Raft Distribution of CD4 Depends on its Palmitoylation and Association with Lck, and Evidence for CD4-Induced Lipid Raft Aggregation as an Additional Mechanism to Enhance CD3 Signaling. *J. Immunol.*, v. 170, p. 913-921. 2003.

Fritz, J.H.; Girardin S.E.; Philpott D.J. Innate immune defense through RNA interference. *Sci STKE.*, v. 2006, n. 339, p. 27. 2006.

Furtado, M. R., D. S. Callaway, et al. Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy. *The New England journal of medicine*, v.340, n.21, p.1614-22. 1999.

Gao, F., E. Bailes, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. *Nature*, v.397, n.6718, p.436-41. 1999.

Garcia J.V.; Miller A.D. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature*, v. 350 p. 508-11. 1991.

Geleziunas, R., et al. Correlation between high level gp160 expression and reduced CD4 biosynthesis in clonal derivatives of human immunodeficiency virus type 1-infected U-937 cells. *The Journal of general virology*, v.75, n.4, p.857-65. 1994.

Geyer M.; Fackler O.T.; Peterlin B.M. Structure – function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO Rep*, v. 2, p. 580-5. 2001.

Geyer, M., et al. Structure of the Anchor-Domain of Myristoylated and Non-myristoylated HIV-1 Nef Protein. *Journal of Molecular Biology*, v. 289, p. 123-138. 1999.

Geyer, M., et al. Subunit H of the V-ATPase binds to the medium chain of adaptor protein complex 2 and connects Nef to the endocytic machinery. *J Biol Chem*, v. 277, n. 32, p. 28521-9. 2002.

Geyer, M.; Fackler, O.T.; Peterlin, B.M. Structure-function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO Report*, v. 2, p. 580–585. 2001.

Geyer, M.; Peterlin, M. Domain assembly, surface accessibility and sequence conservation in full length HIV-1 Nef. *FEBS Letters*, v. 496, p. 91-95. 2001.

Gotlieb, M. S., R. Schroff, et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosa candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *New Engl J Med*, v.305, p.1425-1431. 1981.

Gottlicher M.; Widmark E.; Li Q.; Gustafsson J. Fatty Acids Activate a Chimera of the Clofibrilic Acid-Activated Receptor and the Glucocorticoid Receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 89, p. 4653–7. 1992.

- Grant, A.D. e K. M. D. Cock. ABC of AIDS – HIV infection and AIDS in the developing world. *B.M.J.*, v.322, p.1475-1478. 2001.
- Greenberg M.E., et al. Co-localization of HIV-1 Nef with the AP-2 adaptor protein complex correlates with Nef-induced CD4 down-regulation. *EMBO J*, v.16, p. 6964-76. 1997.
- Greenberg, M. E., et al. Co-localization of HIV-1 Nef with the AP-2 adaptor protein complex correlates with Nef-induced CD4 down-regulation. *EMBO J.*, v. 16, p. 6964-6976. 1997.
- Grzesiek S., et al. 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.
- Grzesiek S., et al. The solution structure of HIV-1 Nef reveals an unexpected fold and permits delineation of the binding surface for the SH3 domain of Hck tyrosine protein kinase. *Nat Struct Biol*, v. 3, p. 340-5. 1996.
- Guy, B., et al. HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. *Nature*, v.330, n.6145, p.266-9. 1987.
- Hahn, B. H., G. M. Shaw, et al. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science*, v.287, n.5453, p.607-14. 2000.
- Hammond, S.M., et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, v. 404, n. 6775, p. 293-6. 2000.
- Hammond, S.M., et al. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, v. 293, n. 5532, p. 1146-50. 2001.
- Hancock J.F. Ras proteins: different signals from different locations. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, v. 4, p. 373–384. 2003.
- Harper, M. E., et al. Detection of lymphocytes expressing human T-lymphotropic virus type III in lymph nodes and peripheral blood from infected individuals by in situ hybridization. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA*, v.83, n.3, p.772-6. 1986.
- Healthy, O. W. <http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/epi2002/en/Who/AIDS>. Geneva: World Health Organization 2002.
- Hertz R., et al. Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4 α . *Nature*, v. 392, p. 512–6. 1998.
- Hout, D. R., et al. Vpu: a multifunctional protein that enhances the pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1. *Curr HIV Res*, v.2, n.3, Jul, p.255-70. 2004.
- Hrecka, K., et al. Nef proteins from diverse groups of primate lentiviruses downmodulate CXCR4 to inhibit migration to the chemokine stromal derived factor 1. *J. Virol.*, v. 79, p. 10650–10659. 2005.

Hunt, M. C.; Alexson S. E. H. The role acyl-CoA thioesterases play in mediating intracellular lipid metabolism. *Prog. Lipid Res.*, v. 41, p. 99-130. 2002.

Hunt, M.C., et al. A revised nomenclature for mammalian acyl-CoA thioesterases/hydrolases. *J. Lipid Res.*, v. 46, p. 2029–2032. 2005.

Iafrate A.J.; Bronson S.; Skowronski J. Separable functions of Nef disrupt two aspects of T cell receptor machinery: CD4 expression and CD3 signaling. *EMBO J*, v. 16, p. 673-84. 1997.

Jacque, J.M.; Triques K.; Stevenson, M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature*, v. 418, n. 6896, p. 435-8. 2002.

Janvier K., et al. Nef-induced CD4 downregulation: a diacidic sequence in human immunodeficiency virus type 1 Nef does not function as a protein sorting motif through direct binding to beta-COP. *J Virol*, v. 75, p. 3971-6. 2001.

Jing, S.; Trowbridge I. S. Identification of the intermolecular disulfide bonds of the human transferrin receptor and its lipid-attachment site. *EMBO J.*, v. 6, p. 327–331. 1987.

Johannes L., et al. Effects of HIV-1 Nef on retrograde transport from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum. *Traffic*, v. 4, p. 323-32. 2003.

Kasinathan C., et al. Purification of protein fatty acyltransferase and determination of its distribution and topology. *J. Biol. Chem.*, v. 265, p. 5139–5144. 1990.

Kestler, W. H., et al. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell*, v.65, p. 651–662. 1991.

Ketting, R.F., et al. Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell*, v. 99, n. 2, p. 133-41. 1999.

Kirchoff, F., et al. Brief Report: Absence of Intact nef Sequences in a Long-Term Survivor with Nonprogressive HIV-1 Infection. *N. Engl. J. Med.*, v. 332, p. 228–232. 1995.

Kliwer S.A., et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 94, p. 4318–23. 1997.

Laemmli, U.K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 259, p. 680-685. 1970.

Lama, J. The Physiological Relevance of CD4 Receptor Down-Modulation During HIV Infection. *Current HIV Research*, v.1, p.167-184. 2003.

- Lama, J., et al. Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Current Biology*, v.9, n.12, p.622-31. 1999.
- Lapham, C. K., et al. Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines. *Science*, v.274, n.5287, p.602-05. 1996.
- Le Gall, S., et al. Nef interacts with the mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules. *Immunity*, v. 8, n. 4, p. 483-95. 1998.
- Lee, M.T., et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in primary macrophages by using Tat- or CCR5-specific small interfering RNAs expressed from a lentivirus vector. *J. Virol.*, v. 77, n. 22, p. 11964-72. 2003.
- Lee, R. C.; Feinbaum, R. L.; Ambros, V. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell*, v. 75, p. 843-854. 1993.
- Lee, S. S., et al. Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol. Cell. Biol.*, v. 15, p. 3012-3022. 1995.
- Lee, Y., et al. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *Embo J.*, v. 21, n. 17, p. 4663-70. 2002.
- Levesque, K., Y. S. Zhao, et al. Vpu exerts a positive effect on HIV-1 infectivity by down-modulating CD4 receptor molecules at the surface of HIV-1-producing cells. *J Biol Chem*, v.278, n.30, Jul 25, p.28346-53. 2003.
- Li Q., et al. Fatty acyl-CoA binding activity of the nuclear thyroid hormone receptor. *J Cell Biochem*, v. 51, p. 458-64. 1993.
- Li, M.J., et al. Inhibition of HIV-1 infection by lentiviral vectors expressing Pol III-promoted anti-HIV RNAs. *Mol Ther*, v. 8, n. 2, p. 196-206. 2003.
- Lim, L.P., et al. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.*, v. 17, n. 8, p. 991-1008. 2003.
- Liu LX., et al. Binding of HIV-1 Nef to a novel thioesterase enzyme correlates with Nef-mediated CD4 down-regulation. *J Biol Chem*, v. 272, p. 13779-85. 1997.
- Lu X., et al. Interactions between HIV-1 Nef and vacuolar ATPase facilitate the internalization of CD4. *Immunity*, v. 8, p. 647-56. 1998.
- Lu, J. Y., et al. Lipid thioesters derived from acylated proteins accumulate in infantile neuronal ceroid lipofuscinosis: Correction of the defect in lymphoblasts by recombinant palmitoyl-protein thioesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 93, p. 10046-10050. 1996.

- Lu, J. Y.; Verkruyse L. A.; Hofmann S. L. Lipid thioesters derived from acylated proteins accumulate in infantile neuronal ceroid lipofuscinosis: correction of the defect in lymphoblasts by recombinant palmitoyl-protein thioesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 93, p. 10046–10050. 1996.
- Mandic R., et al. Negative factor from SIV binds to the catalytic subunit of the V-ATPase to internalize CD4 and to increase viral infectivity. *Mol Biol Cell*, v. 12, p. 463-73. 2001.
- Mangasarian A., et al. The HIV-1 Nef protein acts as a connector with sorting pathways in the Golgi and at the plasma membrane. *Immunity*, v. 6, p. 67-77. 1997.
- Margottin, F., et al. A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Molecular Cell*, v.1, n.4, p.565-74. 1998.
- Marini, R.; J. Showronski. CD4 down-regulation by nef and p56lck protein-tyrosin kinase interact with a common element in CD4 cytoplasmic tail. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.90, n.12, p.54449-55533. 1993.
- McCabe J.B.; Berthiaume L.G. Functional Roles for Fatty Acylated Amino-terminal Domains in Subcellular Localization. *Mol. Biol. Cell*, v. 10, p. 3771–86. 1999.
- Miller, M. D., et al. 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. 101–113. 1994.
- Morgenstern, J. P.; Land, H. Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and complementary helper-free packaging cell line. *Nucl. Acids Res.*, v. 18, p. 3587-3596. 1990.
- Morris, K.V.; Rossi J.J. Lentivirus-Mediated RNA Interference Therapy for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Hum. Gene Ther.*, v.17, n. 5, p. 479-486. 2006.
- Murakami K, et al. Fatty-acyl-CoA thioesters inhibit recruitment of steroid receptor co-activator 1 to α and γ isoforms of peroxisome-proliferator-activated receptors by competing with agonists. *Biochem. J.*, v. 353, p. 231–8. 2001
- Na YS., et al. Nef from a primary isolate of human immunodeficiency virus type 1 lacking the EE(155) region shows decreased ability to down-regulate CD4. *J Gen Virol*, v. 85, p. 1451-61. 2004.
- Nelson, D.L.; Cox, M.M. Lehninger: *Princípios de bioquímica*. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 280-339.
- Newell, M. K., et al. Death of mature T cells by separate ligation of CD4 and the T-cell receptor for antigen. *Nature*, v.347, n.6290, p.286-9. 1990.
- Novina, C.; Sharp, P. The RNAi revolution. *Nature*, v. 8, n. 430, p. 161-4. 2004

Novina, C.D., et al. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat. Med.*, v. 8, n. 7, p. 681-6. 2002.

Paddison, P.J., et al. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.*, v. 16, n. 8, p. 948-58. 2002.

Paddison, P.J.; Hannon G.J. RNA interference: the new somatic cell genetics? *Cancer Cell*, v. 2, n. 1, p. 17-23. 2002.

Park, W.S., et al. Specific HIV-1 env gene silencing by small interfering RNAs in human peripheral blood mononuclear cells. *Gene Ther.*, v. 10, n. 24, p. 2046-50. 2003.

Peng B.; Robert-Guroff M. Deletion of N-terminal myristoylation site of HIV Nef abrogates both MHC-1 and CD4 down-regulation. *Immunol Lett*, v. 78, p. 195-200. 2001.

Pham, H.M., et al. Lentiviral vectors interfering with virus-induced CD4 down-modulation potently block human immunodeficiency virus type 1 replication in primary lymphocytes. *J. Virol.*, v. 78, n. 23, p. 13072-81. 2004.

Piguet V., et al. Mechanism of Nef-induced CD4 endocytosis: Nef connects CD4 with the mu chain of adaptor complexes. *EMBO J*, v.17, p. 2472-81. 1998.

Piguet, V., et al., Nef-induced CD4 degradation: a diacidic-based motif in Nef functions as a lysosomal targeting signal through the binding of beta-COP in endosomes. *Cell*, v. 97, n. 1, p. 63-73. 1999.

Potash, M. J.; D. J. Volsky. Viral interference in HIV-1 infected cells. *Reviews in medical virology*, v.8, n.4, p.203-211. 1998.

Randall, W. R. Cellular expression of a cloned, hydrophilic, murine acetylcholinesterase: evidence of palmitoylated membranebound forms. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 12367-12374. 1994.

Reeves, J. D., S. Hibbitts, et al. Primary Human Immunodeficiency Virus type 2 (HIV-2) Isolates Infect CD4-negative Cells via CCR5 and CXCR4: Comparison with HIV-1 and Simian Immunodeficiency Virus and Relevance Cell Tropism in vivo. *Journal of Virology*, v.73, p.7795-7804. 1999.

Resh M.D. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1451, p. 1-16. 1999.

Rhee SS.; Marsh JW. Human immunodeficiency virus type 1 Nef-induced down-modulation of CD4 is due to rapid internalization and degradation of surface CD4. *J Virol*, v. 68 p. 5156-63. 1994.

Robertson, D. L., et al. HIV-1 nomenclature proposal. *Science*, v.288, p.55-57. 2000.

- Robinson MS. The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. *Curr Opin Cell Biol*, v. 6, p.538-44. 1994.
- Robinson, L. J.; Busconi, L.; Michel T. Agonist-modulated palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, v. 270, p. 995–998. 1995.
- Rose J.K.; Adams G.A.; Gallione C.J. The presence of cysteine in the cytoplasmic domain of the vesicular stomatitis virus glycoprotein is required for palmitate addition. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 81, n. 7, p. 2050–2054. 1984.
- Rosoff, P. M.; Burakoff S. J.; Greenstein J. L. The role of the L3/T4 molecule in mitogen and antigen-activated signal transduction. *Cell*, v. 49, p. 845-853. 1987.
- Rothman J.E. The protein machinery of vesicle budding and fusion. *Protein Sci*, v. 5, p. 185-194. 1996.
- Safrin S.; Grunfeld C. Fat distribution and metabolic changes in patients with HIV infection. *AIDS*, v. 13, p. 2493–2505. 1999
- Saksela, K.; Cheng, G.; Baltimore D. Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef+ viruses but not for down-regulation of CD4. *EMBO J.*, v. 14, p. 484-491.1995.
- Salghetti S.; Mariani R.; Skowronski J. Human immunodeficiency virus type 1 Nef and p56lck proteintyrosine kinase interact with a common element in CD4 cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 92 p. 349-53. 1995.
- Sanfridson A.; Cullen BR.; Doyle C. The simian immunodeficiency virus Nef protein promotes degradation of CD4 in human T cells. *J Biol Chem*, v. 269, p. 3917-20. 1994.
- Santiago, M. L., et al. SIVcpz in wild chimpanzees. *Science*, v.295, n.5554, p.465. 2002.
- Saúde, M. www.saude.gov.br 2005.
- Schmidt, M. F. G.; Schlesinger, M. J. Relation of fatty acid attachment to the translation and maturation of vesicular stomatitis and Sindbis virus membrane glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, v. 255, p. 3334-3339. 1980.
- Schwab R., et al. Highly Specific Gene Silencing by Artificial MicroRNAs in Arabidopsis. *Plant Cell.*, v.18, p. 1121–1133. 2006.
- Schwartz, O., et al. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nature Med.*, v. 2, p. 338-342. 1996.
- Schwartz, O., et al. Human immunodeficiency virus type 1 Nef induces accumulation of CD4 in early endosomes. *Journal of Virology*, v.69, n.1, p.528-33. 1995.
- Shaheduzzaman S., et al. Effects of HIV-1 Nef on cellular gene expression profiles. *J Biomed Sci*, v. 9, p. 82–96. 2002.

Shaw, A. S., et al. Short related sequences in the cytoplasmic domains of CD4 and CD8 mediate binding to the amino-terminal domain of the p56lck tyrosine protein kinase. *Mol. Cell. Biol.*, v. 10, p. 1853-1862. 1990.

Simmons A, Aluvihare V, McMichael A. Nef triggers a transcriptional program in T cells imitating single-signal T cell activation and inducing HIV virulence mediators. *Immunity*, v. 14, n. 763–777. 2001.

Simmons, G., J. D. Reeves, et al. CXCR4 as a functional coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 infection of primary macrophages. *Journal of Virology*, v.72, n.10, p.8453-7. 1998.

Simmons, K.J., et al. Stable RNA interference of host thrombospondin-1 blocks *Trypanosoma cruzi* infection. *FEBS Lett.*, v. 580, n. 9, p. 2365-70. 2006.

Smotrys, J. E.; Linder, M. E. Palmitoylation of intracellular signaling proteins: regulation and function. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 73, p. 559–587. 2004.

Stevenson, M., et al. Envelope glycoprotein of HIV induces interference and cytolysis resistance in CD4+ cells: mechanism for persistence in AIDS. *Cell*, v. 53, n. 3, p. 483-96. 1988.

Stewart, S.J.; Fujimoto, J.; Levy, R. Human T lymphocytes and monocytes bear the same leu-3 (T4) antigen. *J. Immunol.*, v. 136, p. 3773-3778. 1986.

Stumptner-Cuvelette P., et al. HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 98, p. 2144-9. 2001.

Swigut T.; Shohdy N.; Skowronski J. Mechanism for down-regulation of CD28 by Nef. *EMBO J*, v.20, p. 1593-604. 2001.

Thomas, V.; Rogozinski L.; Chess L. Relationship between human T cell functional heterogeneity and human T cell surface molecules. *Immunol. Rev.*, v. 74, p. 112-142. 1983.

Tobiume, M., et al. Inefficient enhancement of viral infectivity and CD4 downregulation by human immunodeficiency virus type 1 Nef from Japanese long-term nonprogressors. *Journal of Virology*, v.76, n.12, p.5959-65. 2002.

Tomari, Y.; Zamore P.D. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev.*, v. 19, n. 5, p. 517-29. 2005.

Tong, A.W. Small RNAs and non-small cell lung cancer. *Curr. Mol. Med.*, v. 6, n. 3, p. 339-49. 2006.

Turner, B. G.; M. F. Summers. Structural biology of HIV. *Journal of Molecular Biology*, v.285, p.1-32. 1999.

Turner, J. M., et al. Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell*, v. 60, p. 755-765. 1990.

Unaids. www.unaids.org 2000.

Veit M. Palmitoylation of the 25-kDa synaptosomal protein (SNAP-25) in vitro occurs in the absence of an enzyme, but is stimulated by binding to syntaxin. *Biochem J.*, v. 345, p. 145–151. 2000.

Veit M., et al. Palmitoylation of rhodopsin with S-protein acyltransferase: enzyme catalyzed reaction versus autocatalytic acylation. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1394, p. 90–98. 1998.

[Veit](#), M.; Becher, A.; Ahnert-Hilger, G. Synaptobrevin 2 Is Palmitoylated in Synaptic Vesicles Prepared from Adult, But Not from Embryonic Brain *Mol. Cell. Neurosci.*, v. 15, p. 408–416. 2000.

Wassmer, P., et al. Role of the L3T4-antigen in T cell activation. II. Inhibition of T cell activation by monoclonal anti-L3T4 antibodies in the absence of accessory cells. *Journal of immunological*, v.135, n.4, p.2237-42. 1985.

Watanabe, H. et al. A Novel acyl-CoA Thioesterase Enhances Its Enzymatic Activity by Direct Binding with HIV Nef. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, v. 238, p. 234–239. 1997.

Wedegaertner P.B.; Wilson P.T.; Bourne H.R. Lipid Modifications of Trimeric G Proteins. *J. Biol. Chem.*, v. 270, p. 503–6. 1995.

Weiss, R. How does HIV cause AIDS? *Science*, v.260, n.5112, p.1273-9. 1993.

Westerhout E.M., et al. HIV-1 can escape from RNA interference by evolving an alternative structure in its RNA genome. *Nucleic Acid Res.*, v. 33, p. 796–804. 2005.

Wigg, M. D., M. T. V. Romanos, et al. Introdução à Virologia Humana. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002. p.183-197.

Willey, R. L., F. Maldarelli, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *Journal of Virology*, v.66, n.12, p.7193-200. 1992.

Yamada, J. Long-chain acyl-CoA hydrolase in the brain. *Amino Acids.*, v. 28, p. 273–278. 2005.

Yang, C., et al. Detection of Phylogenetically Diverse Human Immunodeficiency Virus Type 1 Groups M and O from Plasma by Using Highly Sensitive and Specific Generic Primers. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, n.8, p.2581-2586. 1999.

Yerly, S., L. Kaiser, et al. Transmission of antiretroviral-drug-resistant HIV-1 variants. *Lancet*, v.354, n.9184, p.729-33. 1999.

Yi, R., et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.*, v. 17, n. 24, p. 3011-6. 2003.

Zhang, Z.; Burke J.M. Inhibition of viral replication by ribozyme: mutational analysis of the site and mechanism of antiviral activity. *J. Virol.*, v. 79, n.6, p. 3728-36. 2005.