

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Curso de Biomedicina

Camila Iani Goldoni
Nicole Sobral

**DESCOBERTAS RECENTES SOBRE A RELAÇÃO DA
APOBEC3G E SUA AÇÃO PROTETORA NA INFECÇÃO PELO
HIV**

São Paulo
2015

Camila Iani Goldoni

Nicole Sobral

**DESCOBERTAS RECENTES SOBRE A RELAÇÃO DA
APOBEC3G E SUA AÇÃO PROTETORA NA INFECÇÃO PELO
HIV**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pelo Prof. Dr. Mauro Fantini Nogueira Martins, como requisito parcial para a obtenção do título de bacharel em Biomedicina.

São Paulo

2015

Camila Iani Goldoni

Nicole Sobral

**DESCOBERTAS RECENTES SOBRE A RELAÇÃO DA
APOBEC3G E SUA AÇÃO PROTETORA NA INFECÇÃO PELO
HIV**

São Paulo, 29 de outubro de 2015

Orientador: Prof. Dr. Mauro Fantini Nogueira Martins

Prof. Me. Joes Nogueira Neto

Dedicamos este trabalho à nossa família, pelo apoio incondicional em nossa vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Eu, Camila Iani Goldoni, agradeço imensamente em primeiro lugar a minha família amada, por todo apoio nesses quatro anos de graduação, entre choros e risadas, me trouxeram o verdadeiro significado do amor, de companheirismo, amizade e fé. À minha mãe Vera Iani Goldoni por seu imenso amor a família, seus valores imprescindíveis e carinho admirável, exemplo de mulher, de mãe, esposa e filha; ao meu pai Angelo Rodrigues Goldoni por seus fiéis conselhos de sabedoria extrema, carinho e puxões de orelha necessários; a minha irmã (limã) Natálie Iani Goldoni, por seu amor incondicional, companheirismo, a minha melhor amiga; e a minha cachorrinha Sani por suas lambidas matinais.

Ao meu companheiro e amigo Edson, por todo apoio e amor, mesmo nas brigas mais épicas, é você que sempre ouviu meus desabafos e me incentivou a chegar aos meus objetivos.

Aos meus amigos e familiares que de alguma forma contribuíram neste processo e durante meu crescimento pessoal, meus sinceros agradecimentos.

Aos meus tios, tias, primos, primas e avó pela alegria de poder estar junto de pessoas tão amadas que me faz feliz.

As minhas amigas de infância Caroline Duarte e Carolline Napolitano, verdadeiras e companheiras que mesmo longe, estão sempre ao meu lado de alguma forma me confortando e completando.

Aos professores e funcionários da São Camilo, que de alguma forma participaram e contribuíram muito para nossa formação e amadurecimento.

Aos meus colegas de faculdade que vivenciaram ao meu lado difíceis momentos e provas, mas que valeram a pena e foram importantes neste processo.

A minha parceira de TCC Nicole, neste estressante e fantástico processo de conclusão de curso e ao meu orientador Mauro Fantini, que sempre acreditou em nós mesmo quando tudo parecia ser impossível e difícil; obrigada pelos conselhos e apoio.

Aos meus colegas de estágio que de alguma forma estiveram presente nos meus dias, as vezes frustrantes, ou felizes.

Aos meus amados e sinceros amigos Wizard, em especial a Rafaele, Daniel (Porchat), Daniel (pato), Mônica, Lene, Camilla e Cynthia que inúmeras vezes me fizeram e ainda me fazem chorar de rir, ao companheirismo e carinho, obrigada por esta amizade deliciosa.

Agradeço a Deus pela vida que tenho, e assim pelas oportunidades, de exercer a profissão de biomédico tão querida, entre outras paixões vivenciadas nesses anos, e a oportunidade e benção em ter pessoas maravilhosas ao meu lado que amo tanto.

Eu, Nicole Sobral, agradeço, em primeiro lugar, a Deus por ter me ajudado imensamente a cada momento que acreditei que não iria conseguir.

A minha mãe, Jaqueline Sobral, por todo o apoio que me deu durante toda a vida, sempre me incentivando a correr atrás dos meus sonhos por mais inalcançáveis que parecessem, sendo sempre meu porto seguro no meio da tempestade, minha melhor amiga e mãe.

A minha avó, Maria José Sobral, por sempre estar ao meu lado em cada momento, seja ele bom ou ruim, por sempre me guiar durante as fases difíceis, sempre me mostrar que as vezes o caminho mais difícil também é o mais correto, por não se deixar abater pelos meus humores ruins e me dizer todos os dias que eu posso ter tudo que eu quero se eu trabalhar por isso.

A Larissa Sobral (Pirralha), minha irmã favorita de todos os tempos, por ser chata e me irritar a cada oportunidade, mas estar ao meu lado sempre que eu precisei de um abraço ou um incentivo.

Aos meus amigos e familiares que contribuíram para o meu crescimento como pessoa.

A minhas amigas de 20 anos Carolina Barduk e Thaís Wissinieuski, que durante mais de duas décadas sempre estiveram ao meu lado me fazendo esquecer de todos os problemas, me mostraram que família a gente também pode escolher.

Aos professores da São Camilo que me ensinaram que é preciso determinação e dedicação para tudo na vida.

Ao meu orientador Mauro Fantini, que acreditou em nós mesmo quando tudo parecia impossível, obrigada.

A minha parceira Camila, sem ela nada disso seria possível.

A Taís Fernanda Santos, que mesmo não fazendo esse trabalho conosco, sempre esteve lá para ouvir as dúvidas e dividir as ansiedades.

Obrigada a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para meu crescimento e amadurecimento pessoal, pois se não fosse por elas talvez esse trabalho não seria do jeito que é.

GOLDONI, Camila; SOBRAL, Nicole. Descobertas recentes sobre a relação da APOBEC3G e sua ação protetora na infecção pelo HIV. 2015. (52)f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Biomedicina) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2015.

RESUMO

Durante décadas muito se ouviu sobre o HIV, principalmente sobre a falta de uma cura para a infecção causada por ele, nos últimos anos muitas foram as descobertas feitas, uma delas foi a presença da proteína endógena APOBEC3G (hA3G) que tem papel importante na proteção das células hospedeiras contra o vírus. O presente trabalho teve como objetivo expor e analisar as descobertas recentes sobre a relação entre a proteína APOBEC3G e sua ação protetora contra a infecção pelo HIV assim como possíveis usos dela na terapia antirretroviral. Para isso foram realizadas pesquisas em livros e nas principais bases de dados como: Lilacs, Pubmed, Scielo e Google acadêmico, utilizando o filtro de 2002 até 2015, procurando explorar pesquisas recentes nas línguas inglesa e portuguesa. Foi descoberto que o HIV-1 tem um método de degradar a hA3G, a proteína Vif. A proteína UBA 2 também se mostrou importante, já que quando associada com a hA3G a torna mais estável e diminui sua degradação pela Vif. Também têm relevância a utilização de pequenas partículas MM-1 e MM-2 que têm a capacidade de aumentar os níveis da APOBEC3G. Esses dados mostraram como a exploração da relação Vif-hA3G é um caminho importante para o desenvolvimento de melhores tratamentos e até mesmo a cura dessa doença tão estigmatizante mesmo nos dias atuais.

Palavras-chave: Infecções por HIV. Proteínas do vírus da imunodeficiência humana. Terapia antiretroviral de alta atividade. HIV-1.

GOLDONI, Camila; SOBRAL, Nicole. Recent discoveries on the relationship of APOBEC3G and its protective role in HIV infection. 2015. (52)f. Course conclusion thesis (Undergraduation in Biomedicine) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2015.

ABSTRACT

For decades HIV has been extensively studied, especially due to the lack of a cure for it. In recent years there have been many discoveries, one of which was the presence of endogenous protein APOBEC3G (hA3G) that plays an important role in protecting host cells against the virus. This study aimed to expose and analyze the recent findings on the relationship between the APOBEC3G protein and its protective effect against HIV infection as well as possible its uses in antiretroviral therapy. For this, we carried out research in books and in major databases such as Lilacs, Pubmed, Scielo and Google Scholar, using the filter from 2002 to 2015, seeking to exploit recent research in English and Portuguese. It was found that HIV-1 is a degradation method of hA3G, the Vif protein. The UBA 2 protein was also important, as when associated with hA3G makes it more stable and reduces its degradation by Vif. There is also a little relevance in the use of MM-1 to MM-2 particles that have the ability to increase the levels of APOBEC3G. These data show how the exploitation of Vif-hA3G relationship is an important way to develop better treatments and even a cure of this disease so stigmatized even today.

Keywords: HIV infection. Proteins of human immunodeficiency virus. Antiretroviral therapy of high activity. HIV-1.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO DA CONFORMAÇÃO DO HIV.....	15
FIGURA 2: CICLO DA REPLICAÇÃO VIRAL.....	16
FIGURA 3: COMPARAÇÃO ENTRE AS QUANTIDADES DE MRNA DE HA3G, CARGA VIRAL E CONTAGEM DE CD4.	21
FIGURA 4: COMPARAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE CARGA VIRAL E EXPRESSÃO DE HA3G	23
FIGURA 5: PROGRESSÃO DE EXPRESSÃO DE HA3G EM PACIENTES SORONEGATIVOS EXPOSTOS E CONTROLE APÓS UM ANO DE ESTUDO.	24
FIGURA 6: ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA MOSTRANDO AS PROTEÍNAS CUL5, VIF-HA, ELONGUINA B E ELONGUINA C.	31
FIGURA 7: REDUÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE VIF Δ SLQ COM CUL5-SCF.....	32
FIGURA 8: ESQUEMATIZAÇÃO DO COMPLEXO SCF.....	33
FIGURA 9: GRÁFICO DA SUPEREXPRESSÃO DE RBX1.....	33
FIGURA 10: INIBIÇÃO POR CUL5 NA DEGRADAÇÃO DE HA3G INDUZIDA POR VIF.	34
FIGURA 11: GRÁFICOS DA RELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE MM-1 E MM-2 E A VIABILIDADE CELULAR RELATIVA.	39
FIGURA 12: ESQUEMA DOS PLASMÍDEOS PRODUZIDOS.	40
FIGURA 13: FUSÃO ENTRE UBA2 E HA3G PROMOVE DIMINUIÇÃO DA ATIVIDADE INFECCIOSA VIRAL.	41
FIGURA 14: QUANTIDADE DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO VIF NA PRESENÇA DA ASK1.	45
FIGURA 15: : RELAÇÃO ENTRE INCORPORAÇÃO DE HA3G (A) OU INFECÇÃO VIRAL (B) E A INDUÇÃO DE ASK1 EM CÉLULAS T INFECTADAS PELO VÍRUS CONTENDO OU NÃO O VIF E QUE POSSUÍAM OU NÃO MUTAÇÃO.	46
FIGURA 16: RELAÇÃO ENTRE A INFECÇÃO VIRAL E A PRESENÇA E AUSÊNCIA DE AZT NO CONTROLE E EM CÉLULAS INDUZIDAS A PRODUZIR ASK1.....	46

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: RELAÇÃO ENTRE CÓPIAS DE HA3G E PACIENTES LTNP E NC (PACIENTES INFECTADOS E COM SINTOMAS).	22
GRÁFICO 2: EXPRESSÃO DE HA3G EM PACIENTES HC, ES E LVL.	23
GRÁFICO 3: RELAÇÃO ENTRE CÓPIAS DE PRÓVIRUS DE HIV E CÓPIAS DE HA3G.....	25
GRÁFICO 4: QUANTIDADE DE HA3G EM CADA UMA DAS FORMAS DETERMINADAS POR AUTORADIOGRAFIA.....	26
GRÁFICO 5: COMPARAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE PRÓVIRUS (A) E DE HA3G (B).	27
GRÁFICO 6: NÍVEIS DE HA3G RNA EM DIFERENTES SUBTIPOS DE LINFÓCITOS T CD4.	29
GRÁFICO 7: INFECTIVIDADE DE VÍRUS LIBERADOS POR CÉLULAS TCM E TEM.....	30
GRÁFICO 8: MM-1 E MM-2 DIFICULTAM A INFECTIVIDADE VIRAL NA PRESENÇA DE HA3G E VIF.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

293T - Células embrionárias expressando antígeno T

A - Adenina

AIDS - Síndrome da imunodeficiência humana adquirida

APOBEC3G - Apolipoprotein B-editing catalitic polypeptide 3G

AS – Pacientes sob tratamento antiretroviral

ASK1 – Kinase-1 reguladora de sinal de apoptose

CCR5 – Receptor de quimiocina tipo 5

Cul5 – Cullin 5

CXCR4 – Receptor de quimiocina tipo 4

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ES – Pacientes soronegativos expostos

G – Guanina

gp 120 – Glicoproteína 120

gp 41 – Glicoproteína 41

hA3G – APOBEC3G

HC – Controle saudável

HDAC6 – Histona deacetilase celular 6

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HMM - Complexo ribonucleico de alta massa molecular

IL-2 – Interleucina 2

LMM – Complexo ribonucleico de baixa massa molecular

LTNP – Long-term nonprogressors, pacientes há muito tempo infectados e sem tratamento, mas sem apresentar sintomas

LVL – Baixa carga viral

mRNA – RNA mensageiro

NC - Pacientes infectados e com sintomas

NGF - Fator de crescimento do nervo

PBMC – Células mononucleares do sangue periférico (Peripheral Blood Mononuclear Cells)

RA LMM - Complexo ribonucleico associado a *lipid rafts* – insolúvel

RNA – Ácido ribonucleico

T CD4 – Linfócito T auxiliares

T CD8 – Linfócitos T citotóxicos

Tcm – Linfócitos T de memória central

Tem - Linfócitos T de memória efetora

Tn - Linfócitos T naive

UBA2 – Ubiquitina associada a domínio 2

UV - Ultravioleta

VC – pacientes controladores da viremia

Vif – Fator de infecciosidade viral

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVO	18
3	MÉTODOS	19
4	DESENVOLVIMENTO.....	20
4.1.	PROTEÍNA APOBEC3G.....	20
4.1.1.	COMPLEXO VIF-CUL5-SCF.....	31
4.2.	MM-1 E MM-2.....	37
4.3.	APOBEC3G-UBA2.....	40
4.4.	COMPLEXO HDAC6/APOBEC3G.....	42
4.5.	ASK1-APOBEC3G.....	44
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
	REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

Os primeiros casos de infecção por HIV foram descobertos entre 1977 e 1978 na África Central, EUA e Haiti, porém só receberam o nome de AIDS em 1982, quando a nova síndrome foi classificada. O primeiro caso relatado no Brasil foi em 1980. (OMS, 2012)

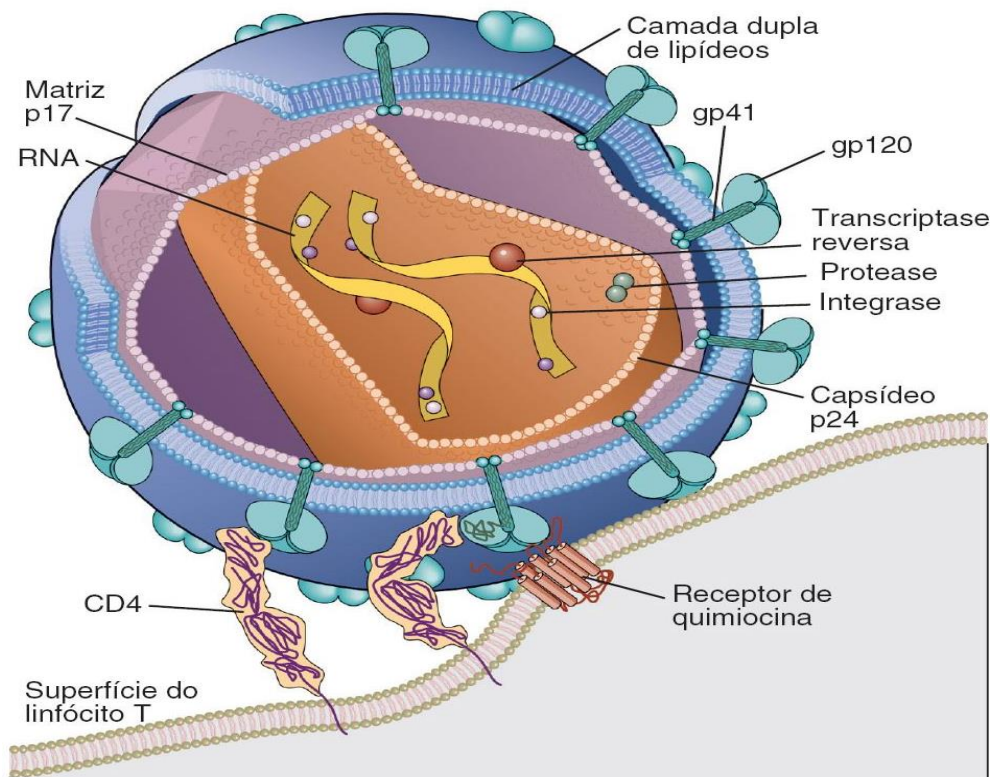
A Organização Mundial de Saúde (OMS, 2012) estima que existam cerca de 35,3 milhões de pessoas (adultos e crianças) infectadas pelo vírus no mundo, sendo que a maior parte está concentrada na região da África Subsaariana. Em 2012 1,6 milhões de pessoas morreram de AIDS, sendo que 210.000 dessas pessoas eram crianças com menos de 15 anos.

No Brasil, em 2012, foram notificados 39.185 casos de AIDS. Esse valor vem se mantendo estável nos últimos 5 anos. A taxa de incidência nacional foi de 20,2 casos para cada 100.000 habitantes. A maior taxa de detecção foi observada na Região Sul, 30,9/100.000 habitantes, seguida pela Região Norte (21,0), Região Sudeste (20,1), Região Centro-Oeste (19,5), e Região Nordeste (14,8). (MS, 2013)

Foram declarados, em 2012, 11.896 óbitos por AIDS no Brasil, que corresponde a um coeficiente de mortalidade por AIDS de 5,5/100.000 habitantes. Observa-se uma redução de 14% na taxa de mortalidade no Brasil nos últimos 10 anos. (MS, 2013)

O HIV (vírus da imunodeficiência humana) é o causador da AIDS, e ataca o sistema imunológico infectando macrófagos, células dendríticas e linfócitos T CD4. O vírus se liga à célula hospedeira a partir da afinidade de suas proteínas de membrana gp120 e gp41 (Figura 1) pelo CD4, porém só isso não é suficiente para a infecção da célula, é preciso que ocorra a expressão de correceptores presentes nas células T e macrófagos que são, respectivamente, CXCR4 e CCR5 (ABBAS, 2008; KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008).

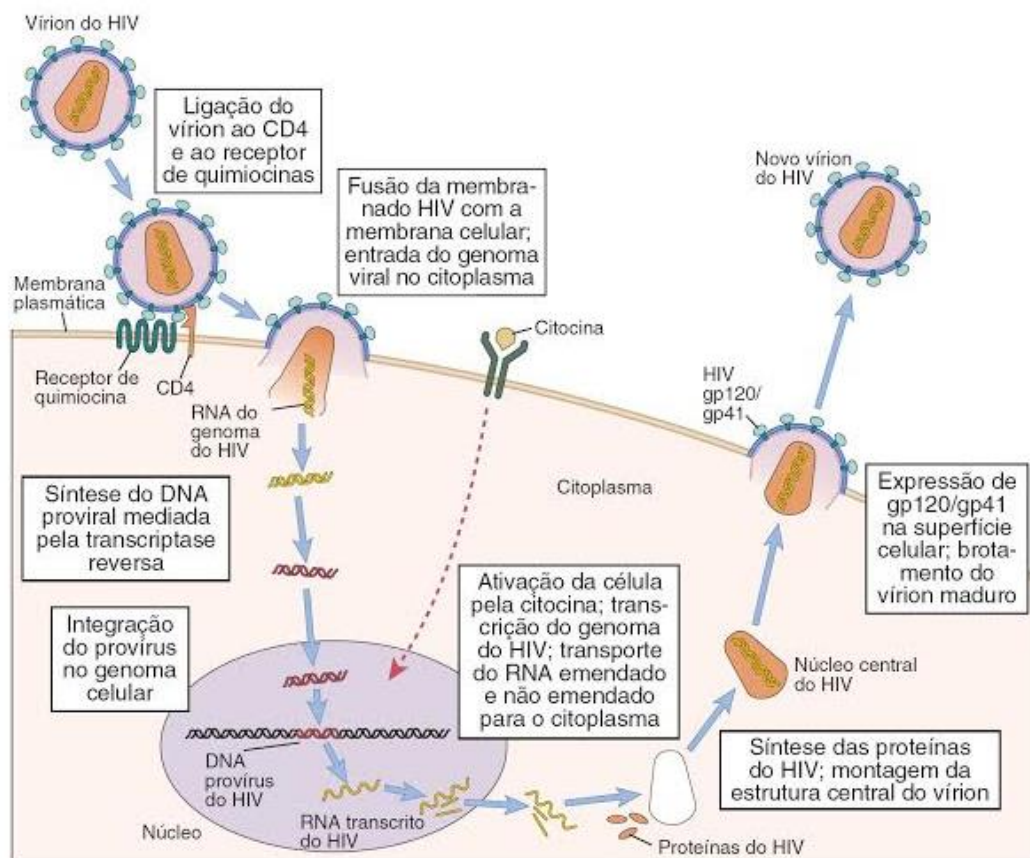
Figura 1: Representação da conformação do HIV.



Fonte: (ABBAS, 2008)

Essa ligação permite a entrada do genoma viral no citoplasma da célula, onde ocorrerá a síntese do DNA viral mediada pela transcriptase reversa, gerando a integração do DNA viral no genoma celular. A célula sofre ação de uma citocina que ativa a transcrição do genoma do HIV e o transporte do RNA emendado e não emendado para o citoplasma, onde ocorrerá a montagem da estrutura central do vírus. A expressão de gp120 e gp41 na superfície celular permite o brotamento do vírus maduro (Figura 2) (ABBAS, 2008; KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008).

Figura 2: Ciclo da replicação viral



Fonte: (ABBAS, 2008)

Para “driblar” a infecção pelo vírus, a imunidade adaptativa age contra os antígenos virais permitindo a ativação de células TCD8+ que vão exercer citotoxicidade pelo reconhecimento de antígenos virais via MHC classe I nas células alvo, e consequente liberação de granzima e de perforinas com lise das células infectadas e também dos vírus. Durante a resposta imune adaptativa há também ativação das células TCD4+, que vão colaborar com as células B na produção de anticorpos (MACHADO, 2004)

Os anticorpos antivirais atuam principalmente como moléculas neutralizantes, para evitar a interação do vírus com a célula do hospedeiro. Esses anticorpos neutralizantes se ligam ao envelope viral ou a antígenos do capsídeo, e também participam no controle da infecção viral por opsonização e por ativação do sistema complemento. Entretanto, as atividades dos anticorpos ocorrem somente na fase extracelular do ciclo viral (ABBAS et al., 2008).

Além disso, quando há a entrada do vírus na célula, ocorre redução de células T CD4 no organismo, por três mecanismos. O primeiro é de que há a morte direta das células infectadas pelo vírus; o segundo de que há um aumento da susceptibilidade do organismo; e o terceiro, a morte de células T CD4. Adicionalmente, estas células também podem ser destruídas pela citotoxicidade mediada pela célula T CD8 (JANEWAY *et al.*, 2002).

Quando os níveis de T CD4 ficam abaixo de um nível crítico, o corpo humano tem a imunidade celular comprometida, assim como diminuição nos níveis de citocinas. A partir disso, é que aparecem os sintomas mais variados, como febre, sudorese noturna, diarreia e perda de peso, abrindo caminho para doenças oportunistas, causada por *Candida albicans* e *Mycobacterium tuberculosis* (JANEWAY *et al.*, 2002).

Um mecanismo de defesa natural do organismo ao HIV é a proteína APOBEC3G (hA3G), presente em linfócitos T CD4 e macrófagos. Ela pertence à família da citidina desaminase celular, sendo a mais importante. Na fase tardia do ciclo de vida viral a hA3G é encapsulada em partículas virais por meio da interação com a proteína viral Gag (sabe-se que a região N-terminal da hA3G tem papel essencial na atividade antirretroviral). Uma vez que o vírus infecta uma nova célula o RNA viral será transcrito em cDNA antes de interagir com o DNA hospedeiro, em presença de hA3G esse cDNA sofre mutações que criam códons de parada que é eliminado pelos mecanismos de reparação do DNA hospedeiro (HARRIS *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2003; NEOGI *et al.*, 2013).

O vírus, por sua vez, tem um mecanismo de defesa contra a hA3G, a proteína viral Vif, presente em HIV tipo 1, ela interage com a hA3G citoplasmática como parte do complexo Vif-Cul5-SCF, resultando na ubiquitinação e degradação da hA3G (MA *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2003).

Esses entre outros mecanismos serão essenciais para possíveis descobertas em prol da melhora no tratamento, prevenção e, talvez, a cura da AIDS.

2 OBJETIVO

Expor as descobertas sobre a relação entre a proteína APOBEC3G e sua ação protetora contra a infecção pelo HIV assim como suas possíveis utilizações na terapia antirretroviral.

3 MÉTODOS

Foram realizadas pesquisas em livros e nas principais bases de dados como: Lilacs, PubMed e Google Acadêmico, utilizando o filtro de 2002 até 2015, procurando explorar pesquisas recentes nas línguas inglesa e portuguesa, dando preferência a artigos experimentais.

Os termos usados para a busca foram: APOBEC3G, Vif complex, Vif-Cul5-SFC complex, HIV-APO, HIV-Vif.

4 Desenvolvimento

4.1. Proteína APOBEC3G

Cerca de 5% dos pacientes há muito tempo infectados pelo HIV e sem nenhum tipo de tratamento não demonstram nenhum sinal da infecção, inclusive mantendo altos níveis de CD4 e baixos de HIV. Um possível mecanismo para explicar esse cenário seria a APOBEC3G (hA3G) (*apolipoprotein B-editing catalitic polypeptide 3G*) (JIN *et al.*, 2005) que é uma proteína, presente em células T e macrófagos, com função antirretroviral, tendo papel inibidor na replicação do HIV, na transcriptase reversa e integração do DNA viral (VÁZQUEZ-PÉREZ *et al.*, 2009).

Jin *et al.* (2005) também citaram que a APOBEC3G (hA3G) é um fator de acolhimento que confere resistência a infecções por lentivírus sob condições experimentais. O HIV tipo 1 (HIV-1), no entanto, produz fator de infecciosidade viral (Vif) que tem como alvo hA3G para a proteólise, escapando, assim, desse sistema de defesa.

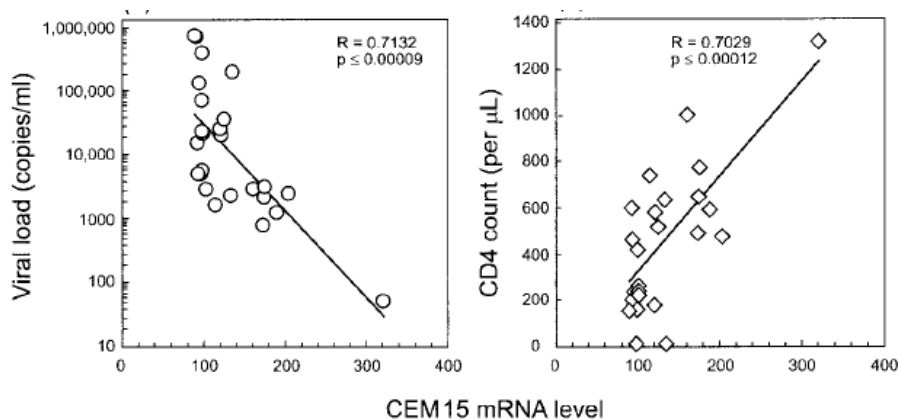
Outro sistema que inibe a hA3G é a presença de NGF (fator de crescimento do nervo) que estimula a replicação viral em macrófagos causando uma regulação negativa de hA3G (RODRIGUES, 2009).

A atividade da citidina desaminase da hA3G catalisa a troca, *in vivo*, de Guanina (G) para Adenina (A). Essas mutações no gene viral causam a produção de sequências letais de stop códons (códons de parada) no material genético viral, por isso a hA3G tem uma capacidade de reduzir a produção de DNA viral em células recém infectadas (GUO *et al.*, 2007).

Um estudo de Nova York demonstrou pela primeira vez uma relação entre os níveis de hA3G mRNA, a carga viral de HIV e a contagem de células CD4, ambos marcadores da progressão da infecção em pacientes sem nenhum tipo de tratamento. Durante os experimentos foi constatado que existe uma correlação diretamente proporcional entre os níveis de hA3G mRNA (também conhecida como CEM 15) e a contagem de células CD4. Já a relação entre

número de cópias virais e nível de hA3G é inversamente proporcional (Figura 3) (JIN *et al.*, 2005).

Figura 3: Comparação entre as quantidades de mRNA de hA3G, carga viral e contagem de CD4.



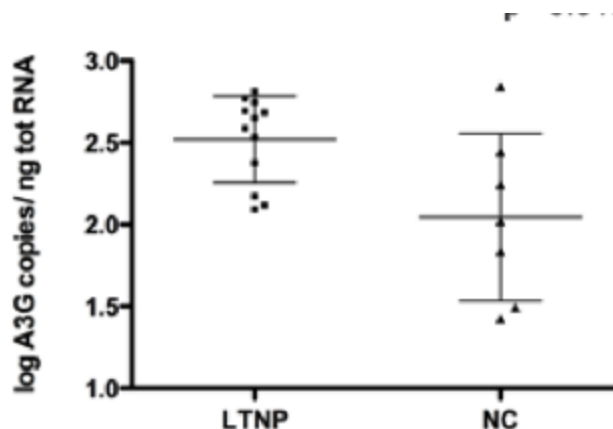
Legenda: De acordo com os gráficos acima nota-se que quanto maior os níveis de hA3G menor são os níveis de cópias virais e maior o nível da contagem de CD4.

Viral load (carga viral), CEM 15 mRNA level (nível de hA3G mRNA), CD4 count (contagem de CD4)

Fonte: (JIN *et al.*, 2005)

Interessantemente, foi visto que em pacientes infectados há muito tempo, mas sem manifestar nenhum sintoma (pacientes LTNP – long-term nonprogressors, pacientes há muito tempo infectados e sem tratamento, mas sem apresentar sintomas) há um nível de hA3G mRNA significativamente mais alto que em pacientes não infectados e nos pacientes com sintomas (JIN *et al.*, 2005). Isso foi confirmado mais recentemente por Kourteva *et al.* (2012) como vemos no gráfico a seguir.

Gráfico 1: Relação entre cópias de hA3G e pacientes LTNP e NC (pacientes infectados e com sintomas).



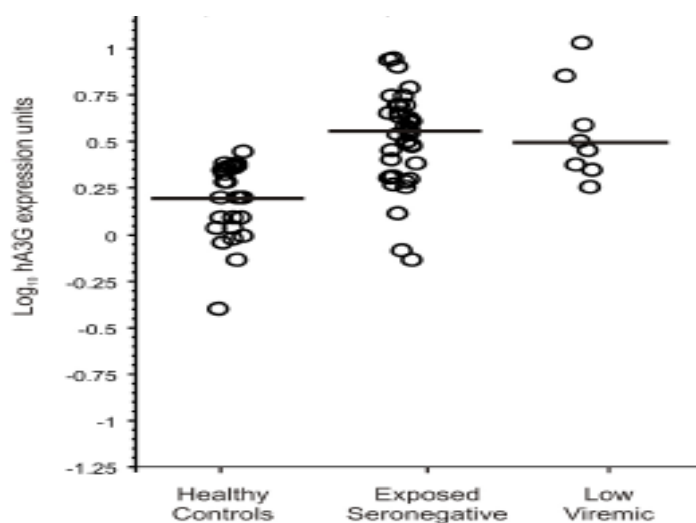
Legenda: O gráfico mostra que em pacientes LTNP o número de cópias de hA3G é muito superior ao de pacientes NC, vale destacar que NC também tem hA3G.

Fonte: (KOURTEVA *et al.*, 2012).

A menor taxa de progressão da doença em pacientes LTNP é provavelmente multifatorial, porém o estudo mostra que aumentar a expressão do gene hA3G pode proporcionar uma vantagem no futuro, acumulando mutações no genoma do HIV até o ponto em que ele estará tão debilitado que isso irá suprimir a viremia (JIN *et al.*, 2005).

Outra pesquisa mediu a expressão de hA3G mRNA em indivíduos soronegativos expostos ao HIV (ES), controles saudáveis (HC – healthy control), pacientes infectados, mas com baixa carga viral por no mínimo 3 anos (LVL – low viral load) e pacientes infectados em diferentes estágios da doença (HIV+) e viu-se que não existe uma diferença relevante dos níveis de hA3G mRNA entre pacientes ES e LVL, porém quando comparados ao grupo HC e HIV+ esses níveis são significativamente mais elevados (Gráfico 2) (VÁZQUEZ-PÉREZ *et al.*, 2009).

Gráfico 2: Expressão de hA3G em pacientes HC, ES e LVL.

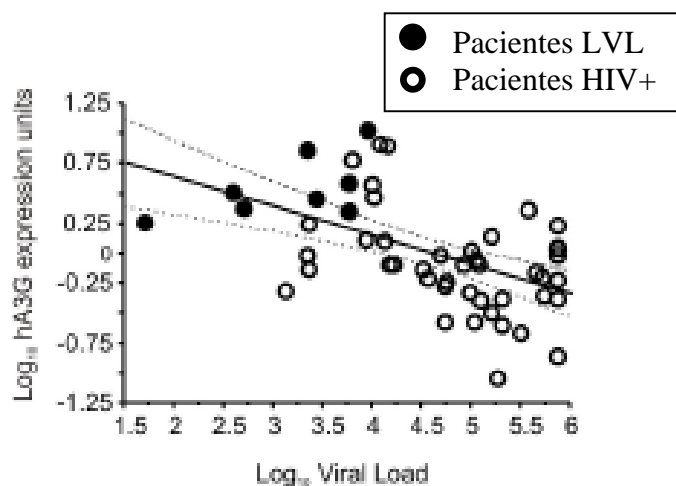


Fonte: (VÁZQUEZ-PÉREZ *et al.*, 2009)

O valor similar de expressão de hA3G entre pacientes ES e LVL sugere que esses indivíduos podem regular a hA3G de maneira similar. Em pacientes HIV+ foi visto que existe uma relação positiva entre expressão de hA3G e a contagem de células CD4 no sangue (VÁZQUEZ-PÉREZ *et al.*, 2009).

Comparando a expressão de hA3G e a carga viral dos pacientes LVL e HIV+ vemos que existe uma correlação negativa, como mostra a figura 4 (VÁZQUEZ-PÉREZ *et al.*, 2009; KOURTEVA *et al.*, 2012).

Figura 4: Comparação entre os níveis de carga viral e expressão de hA3G



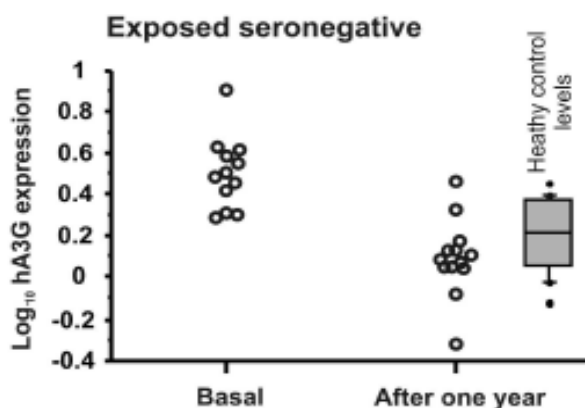
Viral Load (nível de carga viral), hA3G expression units (unidades de expressão de hA3G)

Fonte: (VÁZQUEZ-PÉREZ *et al.*, 2009)

Dados similares também foram relatados em estudos de outros pesquisadores como Jin *et al.* (2007) Ulena *et al.* (2008) e Kourteva *et al.* (2012).

Para saber se a alta expressão de hA3G mRNA em pacientes ES é constitutiva ou resultado da exposição aos antígenos do HIV os pesquisadores mediram a expressão de hA3G em 12 indivíduos ES no momento em que seus parceiros foram diagnosticados e após um ano, em todos os pacientes os níveis de hA3G diminuiu chegando aos mesmos níveis dos controles saudáveis como mostra a figura 5 a seguir (VÁZQUEZ-PÉREZ *et al.*, 2009).

Figura 5: Progressão de expressão de hA3G em pacientes soronegativos expostos e controle após um ano de estudo.



Fonte: (VÁZQUEZ-PÉREZ *et al.*, 2009)

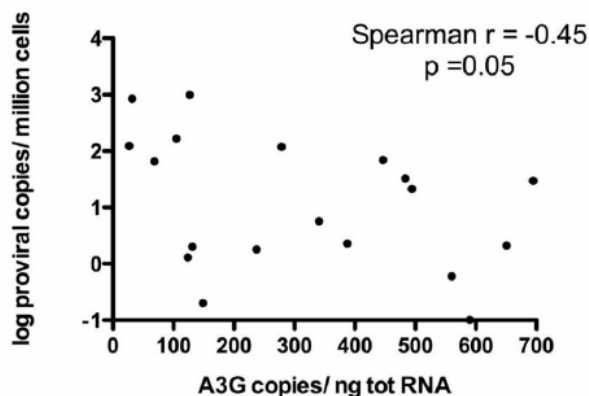
Essa queda nos níveis de hA3G depois de um ano pode estar relacionada com o tratamento da infecção nos parceiros HIV+, diminuindo a exposição a expressão de hA3G também diminui, o que daria suporte à teoria de JIN *et al.* (2005) de que a expressão de hA3G mRNA está relacionada com a exposição aos antígenos virais.

Na pesquisa de Kourteva *et al.* (2012) foi demonstrado que indivíduos expostos ao HIV têm uma expressão de hA3G mRNA aumentada, como pode-se ver no nível de expressão em pacientes ES e na relação positiva entre contagem de células CD4 e níveis de expressão de hA3G mRNA. Uma vez que o vírus sobrepõe o sistema imunológico do paciente a expressão de hA3G mRNA é quase totalmente suprimida, como é visto através da relação negativa entre

viremia e níveis de hA3G mRNA e pela baixa expressão da hA3G em pacientes HIV+.

Kourteva *et. al.* (2012) avaliou a relação dos níveis plasmáticos de RNA do HIV-1 com próvirus, expressão de hA3G e hipermutação para saber se uma hipermutação na hA3G expressa teria alguma influência no controle espontâneo da viremia. Foi visto que a carga proviral é forte e significativamente correlacionada diretamente com os níveis virais plasmáticos (gráfico 3), já o nível de hA3G mRNA é inversamente correlacionado com os níveis plasmáticos de HIV-1, o que sustenta as descobertas de JIN *et al.* (2005).

Gráfico 3: Relação entre cópias de próvirus de HIV e cópias de hA3G.



Fonte: (KOURTEVA *et. al.*, 2012)

No mesmo estudo (KOURTEVA *et al.*, 2012) foi visto que em pacientes LTNP o nível de mutação na Vif (proteína viral que degrada a hA3G) origina uma quantidade menor de cópias virais, o mesmo não foi visto em pacientes infectados e com sintomas, o que pode dar começo a discussões sobre como podemos interferir nessa proteína específica para dar origem a tratamentos mais eficazes.

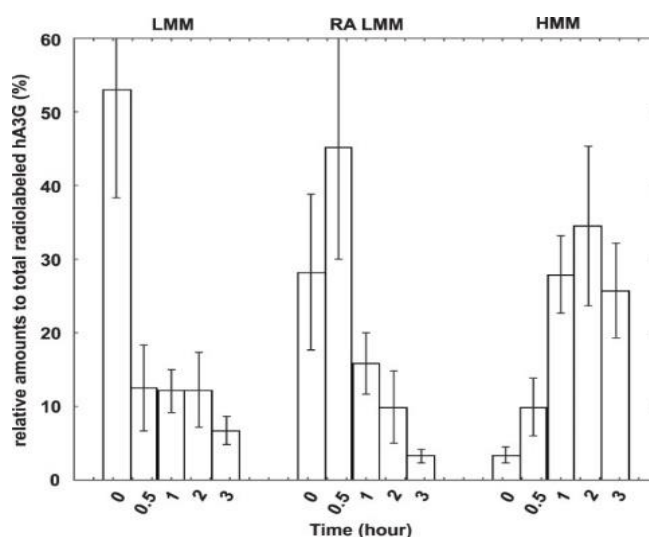
De acordo com Ma e colaboradores (2013), foi necessário realizar um estudo que explicasse a interação da hA3G recém-sintetizada com os lipídios presente na membrana celular, agindo como precursor da maturação do complexo HMM hA3G (complexo ribonucleico), importante fonte que permite a

encapsidação da hA3G no vírus. Além disso, analisaram as mutações presentes na proteína e como elas interferem nesse processo.

Utilizando células H9 e células T que expressavam hA3G endógena, iniciou-se um processo de centrifugação de ambas as células, permitindo como resultado a formação de três moléculas: LMM (complexo ribonucleico de baixa massa molecular - solúvel); HMM (complexo ribonucleico de alta massa molecular); e RA LMM (complexo ribonucleico associado a *lipid rafts* – insolúvel) (MA *et al.*, 2013).

Como parte do processo todas essas formas foram marcadas com fluorocromo contendo hA3G e analisadas por autorradiografia.

Gráfico 4: Quantidade de hA3G em cada uma das formas determinadas por autorradiografia.



Fonte: (MA *et al.*, 2013)

Durante os primeiros 30 minutos, apesar de ocorrer diminuição de hA3G na molécula LMM houve um aumento de hA3G na molécula RA LMM, concluindo um movimento rápido da hA3G recém-sintetizada aos lipídeos rafts (Gráfico 4) (MA *et al.*, 2013).

Através dessa informação sugere-se que RA LMM age como precursor do complexo HMM hA3G, ou seja, representa a maioria das hA3G recém-

sintetizadas e assim permite a entrada e o empacotamento desta no vírus para exercer sua função protetora (MA *et al.*, 2013).

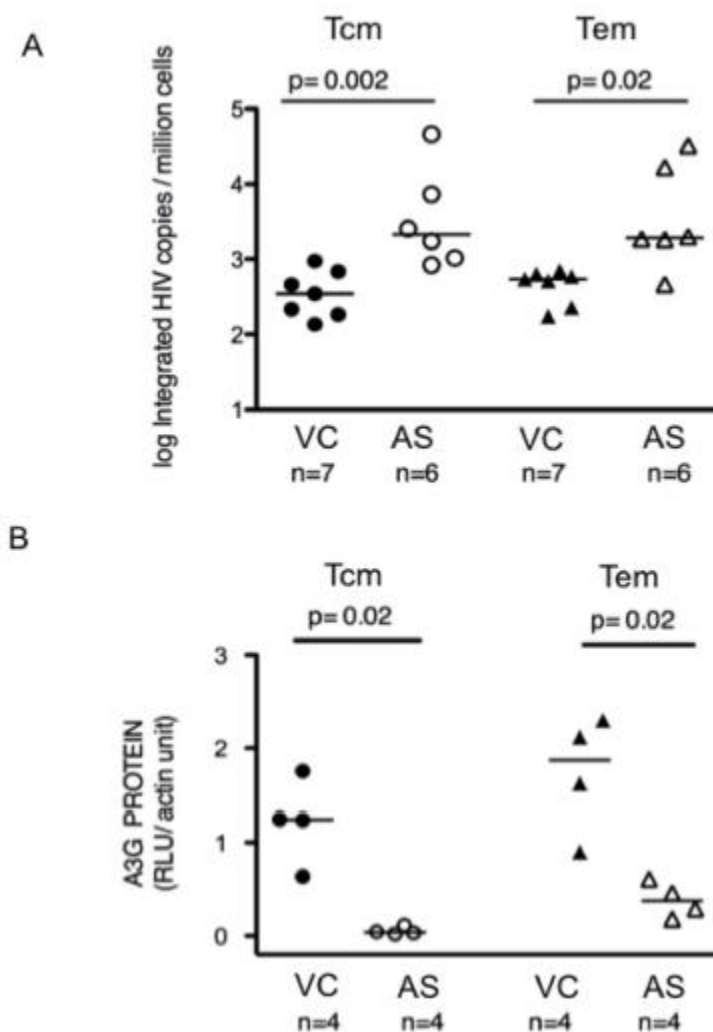
Quando ocorre perda de aminoácidos na região 1-156 da hA3G, ela falha na formação da RA LMM e, portanto, na maturação do complexo HMM. Além disso, se houver perda da região C-terminal não permite também a sua incorporação na região Gag, não permitindo sua incorporação no vírus e proteção ao organismo. Portanto a RA LMM possui um papel fundamental na ação da hA3G, já que ela é fonte celular da proteína ser encapsulada no vírus (MA *et al.*, 2013).

Outro importante resultado foi que a mutação na região Y124A da hA3G possibilita a ligação da proteína a região Gag, porém não permite a sua incorporação no vírus, sendo expressa ao mesmo nível que a hA3G sem mutação. Além disso, ela reduz a quantidade de RA LMM expresso e, portanto, do complexo HMM também (MA *et al.*, 2013).

Khan *et al.* (2008) sugerem que a impossibilidade do mutante em ser empacotado no vírus e exercer função protetora ao organismo, está associada à falha da associação aos lipídeos rafts e formação do complexo HMM.

Em um estudo mais recente de De Pasquale *et al.* (2013), foram medidos os níveis de próvirus e hA3G em células T CD4 *in vivo*, em que níveis baixos de próvirus indicavam um controle espontâneo da infecção. Foram quantificados os níveis de próvirus em subtipos de células T CD4 em pacientes que controlam a infecção espontaneamente e em pacientes que usam antirretrovirais, mas não controlam a infecção e viu-se que os primeiros têm níveis mais baixos de próvirus, paralelamente junto com os baixos níveis de próvirus tinham-se altas concentrações de hA3G, nos levando a considerar que existe uma relação inversa entre níveis de próvirus e hA3G (Gráfico 5). Isso nos indica um caminho de pesquisa onde ao descobrir como esses pacientes são capazes de controlar a infecção sem qualquer suporte químico podemos desenvolver um melhor tratamento para aqueles que não têm a mesma capacidade.

Gráfico 5: Comparação entre níveis de próvirus (A) e de hA3G (B).



Legenda: A – Em pacientes AS há um nível mais elevado de cópias de HIV, tanto em células Tcm como Tem, que em pacientes VC. B – Em pacientes VC os níveis de hA3G é maior, tanto em Tcm quanto em Tem, que os níveis de AS.

Fonte: (DE PASQUALE *et al.*, 2013)

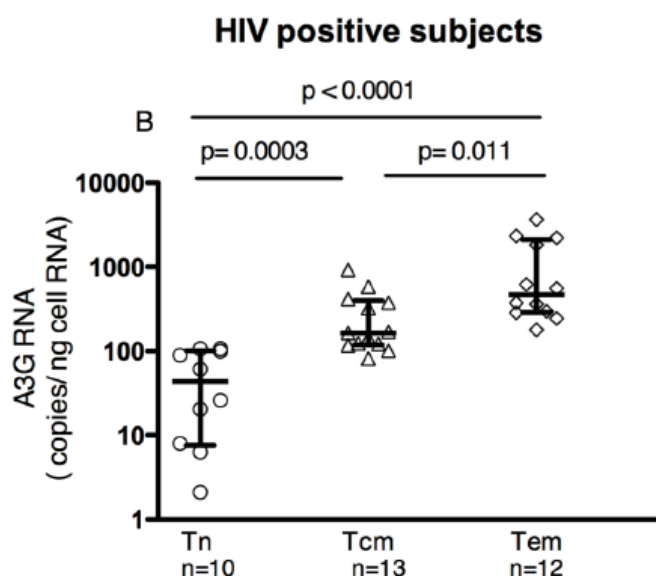
Nesse mesmo estudo foi visto que pacientes sob tratamento antirretroviral (AS) e que suprimiam a replicação viral tinham níveis virais mais baixos que pacientes “controladores da viremia” (VC). Os níveis de provirus foi significativamente mais baixo em células T CD4 de memória central (Tcm) provenientes de VC do que de AS, assim como células T CD4 de memória efetora (Tem) de pacientes VC tinham menos provirus que a dos pacientes AS.

Os níveis de hA3G eram mais elevados tanto em Tcm e Tem de pacientes VC (Gráfico A e B) (DE PASQUALE *et al.*, 2013).

Esses dados nos mostram que a habilidade da hA3G em proteger as células hospedeiras existe sim, sendo decisiva para o controle da infecção em pacientes que não usam medicamentos para controlar a doença.

Para tentar explicar porque os níveis de hA3G era maior em pacientes VC os pesquisadores pensaram que talvez esse aumento se devia à ativação celular. Sabe-se que a ativação celular precede cada estágio da diferenciação das células T, assim De Pasquale *et al.* (2013) testaram se ativando diretamente receptores de célula T em todos os T CD4 de pacientes infectados por HIV-1 os níveis de hA3G (proteína e RNA) aumentariam, o que realmente aconteceu. No gráfico 6 abaixo podemos ver como os níveis de hA3G aumentam de acordo com o estágio de ativação da célula T.

Gráfico 6: Níveis de hA3G RNA em diferentes subtipos de linfócitos T CD4.



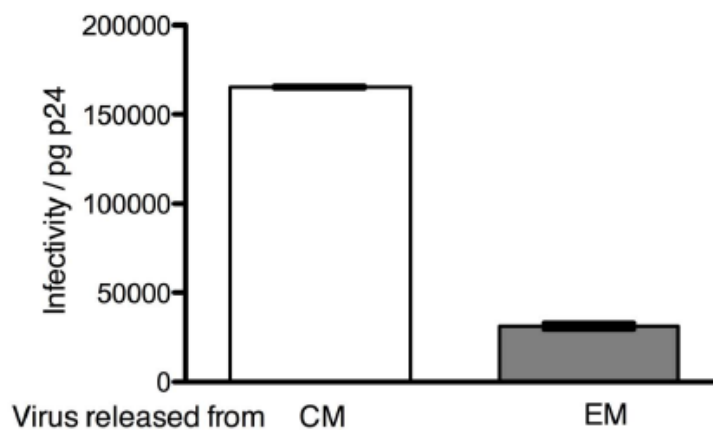
Legenda: Quanto mais ativada a célula T, maior os níveis de hA3G, logo, em Tem há mais hA3G que em naive e Tcm.

Fonte: (DE PASQUALE *et al.*, 2013).

É interessante ressaltar que próvirus provenientes de Tcm tem uma atividade infecciosa maior que próvirus de Tem (gráfico 7), relacionando esse dado com o gráfico 6, vemos que células Tem apresentam maior quantidade de

RNA hA3G e proteína hA3G, o que nos leva à conclusão que a sua presença interfere na infectividade do próvirus do HIV-1.

Gráfico 7: Infectividade de vírus liberados por células Tcm e Tem.



Legenda: Em vírus liberado de célula Tem há menor atividade infecciosa que vírus liberado de célula Tcm.

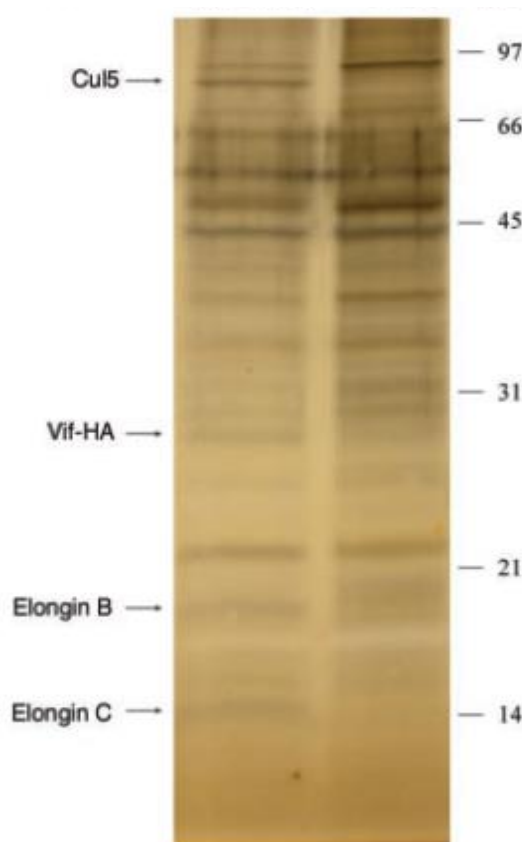
Fonte: (DE PASQUALE *et al.*, 2013)

4.1.1. Complexo VIF-Cul5-SCF

O *vif* é um gene presente na maioria dos Lentivirus, vírus com longo período de incubação associados a doenças imunossupressoras e neurológicas, responsável pela replicação viral e pela patogenicidade *in vivo*. Na sua ausência os vírus de HIV-1 produzidos por linfócitos T primário e algumas linhagens de células T são defeituosos e não têm ação infecciosa. Estudos mostram que a Vif tem ação supressora sobre a hA3G, impedindo sua ação anti-HIV-1 (YU *et al.*, 2003).

Para precipitar com eficiência a proteína Vif a partir de células infectadas e conseqüentemente identificar as proteínas celulares que pudessem interagir com ela, Xianghui *et al.* identificaram três proteínas foram identificadas como cullin-5 (Cul5), elonginas B e C e Rbx-1 (YU *et al.*, 2003).

Figura 6: Eletroforese em gel de poliacrilamida mostrando as proteínas Cul5, Vif-HA, Elonguina B e Elonguina C.

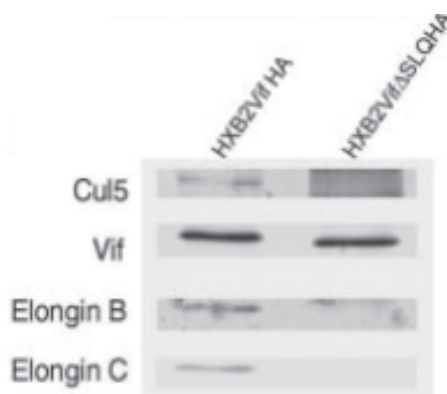


Fonte: (YU *et al.*, 2003)

Os resultados mostram que existe uma interação entre a Vif, as Elonginas B e C e a Cul5, sugerindo que talvez uma alteração em alguma dessas partes pode alterar a função da Vif como um todo.

Quando uma sequência mutada SLQ→AAA (onde A é Ala; L, Leu; Q, Gln; e S, Ser) foi introduzida na sequência altamente conservada da Vif (SLQXLA – X sendo qualquer aminoácido) a interação entre HIV-1 Vif e Cul5-elongin B-elongin C diminuiu significativamente (Figura 7) (YU *et al.*, 2003).

Figura 7: Redução da interação entre Vif Δ SLQ com Cul5-SCF



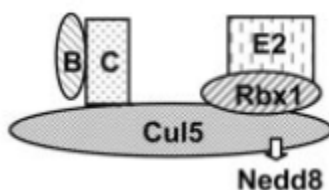
Legenda: Diminuição da interação das proteínas quando adicionada uma sequência mutada na Vif.

Fonte: (YU *et al.*, 2003)

Esses resultados indicam que HIV-1 Vif interage com Cul5, elongin B, elongin C e Rbx-1 para formar um complexo parecido com o complexo Skp1-cullin-F box (SCF) ou, mais precisamente, um complexo VHL-Elongin C-Elongin B-like. Esses complexos representam uma das maiores famílias de ubiquitina-proteínas ligases, gerando a ubiquitinação de uma ampla gama de proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular, sinal de tradução, transcrição, e outros processos celulares (YU *et al.*, 2003).

Esse complexo é responsável por degradar a hA3G, sendo então um mecanismo de evasão às defesas naturais do organismo hospedeiro contra a replicação do HIV, otimizando assim a infecção.

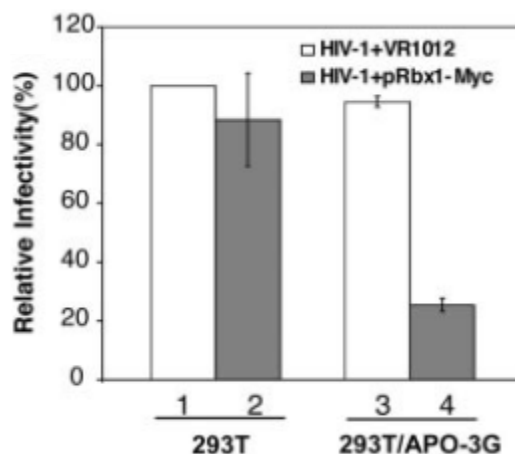
Figura 8: Esquematização do complexo SCF.



Fonte: (YU *et al.*, 2003)

Rbx1 é um componente do complexo SCF e sua superexpressão pode interferir na função do complexo e comprometer a habilidade da Vif em impedir a atividade antiviral da hA3G, assim os pesquisadores pensaram que a superexpressão de Rbx1 deveria reduzir a infecção por HIV-1 na presença de hA3G, os resultados mostraram que a atividade infecciosa reduziu cerca de 75% nessas condições (figura 9) (YU *et al.*, 2003).

Figura 9: Gráfico da superexpressão de Rbx1



Legenda: Quando há superexpressão de Rbx1 existe uma diminuição da atividade infecciosa viral em cerca de 75%.

Fonte: (YU *et al.*, 2003)

A Rbx1 vem sendo mostrada em associação com vários complexos Cullin SCF, toda a família Cullin é modificada pela molécula Nedd8, a atividade infecciosa do HIV-1 foi significativamente reduzida quando o Nedd8

(pCul5 Δ Nedd8) ou a Rbx1 (pCul5 Δ Rbx1) foram coexpressadas com HIV-1 em células 293T/APOBEC3G (YU *et al.*, 2003).

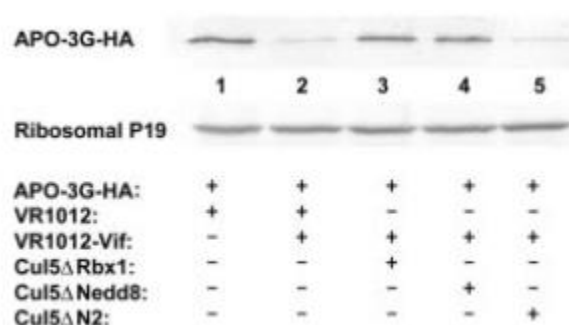
Esses dados mostram que a presença de hA3G é essencial para qualquer tipo de ação anti-HIV. Mariani *et al.* (2003) e Yu *et al.* (2003) concordam que apenas a interação da Vif com a hA3G, sem interação com Cul5-elongin B-elongin C, não é capaz de suprimir a atividade da hA3G.

O efeito da Vif na estabilidade da hA3G também foi avaliado, os experimentos indicaram que HIV-1 Vif induz rápida degradação da hA3G (YU *et al.*, 2003).

De Pasquale e colaboradores (2013) sugerem que existam subtipos de Vif que induzam mais ou menos degradação de hA3G.

O tratamento com proteossomo inibidor MG132 aumentou significativamente os níveis de hA3G mesmo na presença de Vif. Cul5 mutados que bloqueiam a função da Vif também inibem a degradação da hA3G mediada por Vif, resultando em níveis de hA3G parecidos tanto na ausência quanto na presença de Vif (Figura 10) (YU *et al.*, 2003).

Figura 10: Inibição por Cul5 na degradação de hA3G induzida por Vif.



Legenda: Em tratamento com proteossomo ocorre aumento dos níveis de hA3G mesmo em presença da Vif.

Fonte: (YU *et al.*, 2003)

No meio de todas essas dependências e relações intrincadas de funcionamento é possível perceber uma constante, qualquer tipo de tratamento contra a replicação ou infecção deve ser manejado a partir da presença de hA3G, mesmo introduzindo elementos transgênicos capazes de interferir na ação degradadora da Vif é preciso que a célula hospedeira expresse APOBEC3G em sua superfície para que o bloqueio do ciclo viral aconteça, isso nos mostra a importância do estudo aprofundado dessa proteína.

De Pasquale *et al.* (2013) sugerem também que quanto mais hA3G expressa em pacientes Vif-positivo, melhor será bloqueada a formação de próvirus na próxima célula alvo, como se o efeito da hA3G fosse de alguma maneira acumulativo.

Mercenne *et al.* (2010), ainda indicaram que a ligação do Vif a região 5' do RNAm da hA3G, é crucial a função do Vif na desregulação da tradução da proteína hA3G.

O experimento teve como propósito analisar a ligação do Vif as regiões 3' e 5' do RNAm da proteína hA3G, e sua ligação ao RNA do HIV-1. Obteve-se alta afinidade de ligação entre o Vif e a região 3' do RNAm da proteína, enquanto que na região 5' não foi tão alto. Essa afinidade é crucial para a função do Vif em desregular a formação da proteína que tem função protetora ao organismo contra o vírus da imunodeficiência humana. E no vírus o Vif se liga com maior afinidade na região 5' (MERCENNE *et al.*, 2010).

Ainda no experimento, permitiram que ocorresse a mutação do Vif na região AALA e observou-se pouca diferença na preferência de ligação por cada região. Porém percebeu-se uma sutil preferência em se ligar a região 3' do que na região 5' do HIV-1, e preferiu a região 3' do que a 5' do RNA da proteína hA3G, mas há uma diferença de estabilidade nessa ligação que é menor no Vif mutado do que no Vif original (MERCENNE *et al.*, 2010).

Com esses dados, percebe-se uma maior afinidade de ligação desse gene pelo RNA do vírus do que pela própria hA3G, e também há a não tradução,

ou seja, formação da proteína, concluindo que apesar de sua função protetora, ainda não é o suficiente para combater ou eliminar a carga viral, já que não apresenta tamanha afinidade de ligação ao gene viral (MERCENNE *et al.*, 2010).

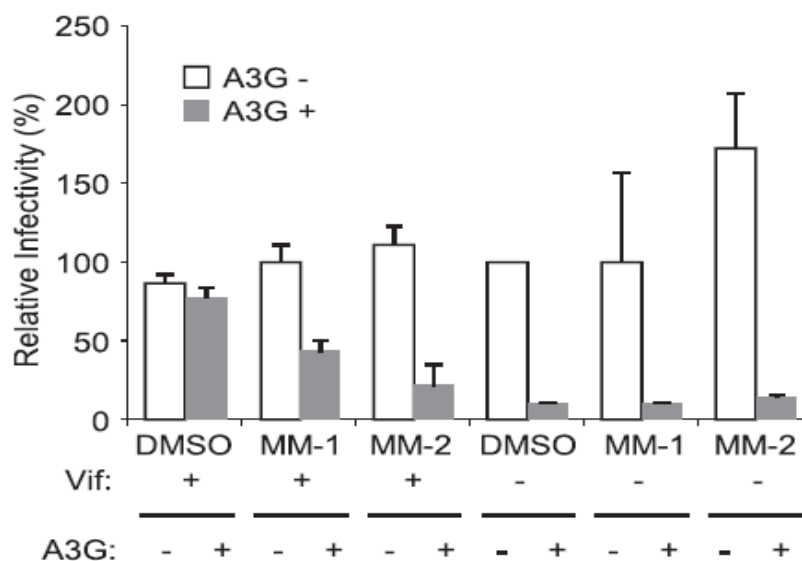
Além do mais, se o gene sofrer mutações essa afinidade provavelmente será menor ainda, portanto, diminui as chances de esperar por uma alternativa terapêutica dependente desta proteína (MERCENNE *et al.*, 2010).

4.2. MM-1 e MM-2

Matsui *et al.* (2014) realizaram um estudo sobre possíveis moléculas pequenas capazes de inibir a degradação da hA3G pela Vif e descreveram duas novas moléculas que elevam os níveis da hA3G na presença de Vif e inibiam a replicação viral, à essas moléculas deram o nome de MM-1 e MM-2.

Para confirmar o efeito dessas moléculas sobre a hA3G foi feita análise em *imunoblotting* e medições da intensidade de fluorescência vinda da hA3G. A Vif causa redução da fluorescência, mas quando tratado com MM-1 e MM-2 a intensidade da fluorescência é recuperada, a análise de *imunoblotting* mostrou que na presença das duas novas moléculas recupera significativamente os níveis proteicos de hA3G e recupera a sensibilidade do vírus a ela como mostra o gráfico 8 (MATSUI *et al.*, 2014).

Gráfico 8: MM-1 e MM-2 dificultam a infectividade viral na presença de hA3G e Vif.



DMSO = Controle e A3G = APOBEC3G
 Fonte: (MATSUI *et al.*, 2014)

No decorrer do estudo surgiu a dúvida se os efeitos da MM-1 e MM-2 seriam dependentes da interação hA3G-Vif e foi visto que o tratamento com essas moléculas parece aumentar os níveis de hA3G tanto na ausência quanto na presença de Vif, porém o efeito foi melhor na presença da Vif, o que não exclui

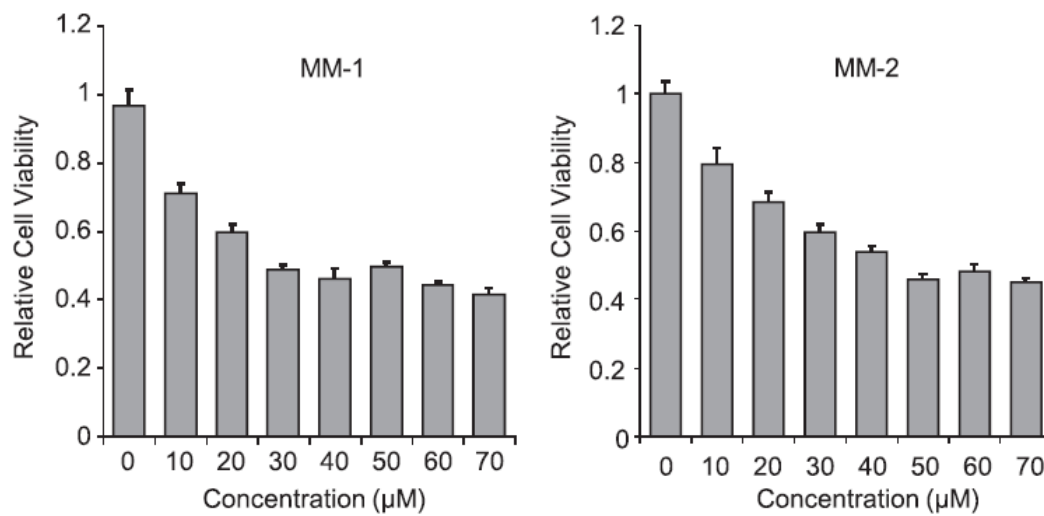
a possibilidade de que essas moléculas são efetivas também na ausência de Vif (MATSUI *et al.*, 2014).

Para determinar em qual etapa as duas novas moléculas interferem Matsui *et al.* (2014) fizeram três diferentes experimentos na presença e ausência dessas moléculas: 1 – ligação entre hA3G e Vif, 2- ubiquitinação da hA3G pela Vif e 3 – inibição da atividade proteossomal. Os resultados foram: 1- nenhuma das duas moléculas pareceu inibir a ligação, 2 – os estudos sugerem que MM-1 e MM-2 não inibem a ubiquitinação mediada pela Vif da hA3G e 3 – a adição dessas moléculas não comprometeu a atividade proteossomal.

Embora não fique claro em qual etapa a MM-1 e MM-2 interferiram para contribuir para o aumento dos níveis de hA3G, é evidente que elas são um objeto de estudo importante para o desenvolvimento de drogas mais eficazes anti-HIV, sendo que as atuais não eliminam os próvirus integrados e devem ser administradas durante toda a vida.

É importante destacar que essas pequenas moléculas para funcionarem precisam de uma concentração específica e essa concentração está muito próxima aos níveis citotóxicos (MATSUI *et al.*, 2014) o que torna improvável que essas moléculas se tornem fármacos diretamente, é mais provável que moléculas derivadas sejam desenvolvidas (Figura 11).

Figura 11: Gráficos da relação entre a concentração de MM-1 e MM-2 e a viabilidade celular relativa.



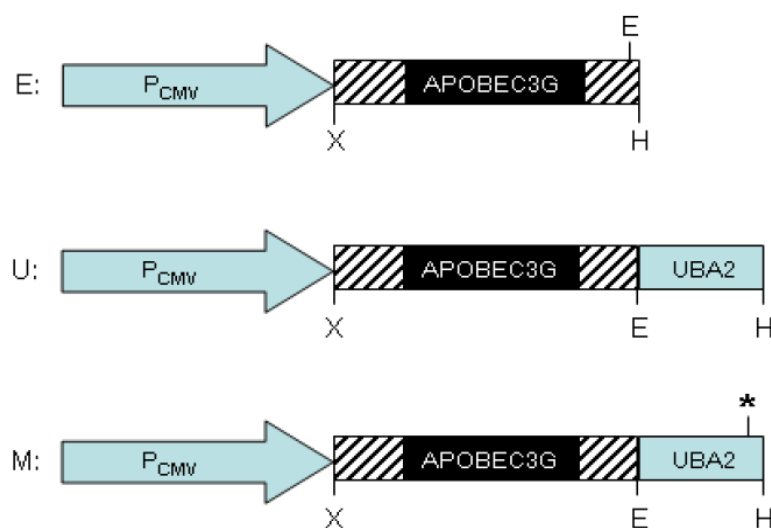
Fonte: (MATSUI *et al.*, 2014)

4.3. APOBEC3G-UBA2

A ubiquitina associada a domínio 2 (UBA2) tem normalmente 45 aminoácidos que se ligam especificamente tanto a mono- quanto a poliubiquitina. Sua estrutura sugere que o domínio UBA2 pode estar relacionado com múltiplas funções como: ubiquitinação protéica, reparo à exposição a UV e sinalização celular (LI *et al.*, 2008).

Os resultados da pesquisa de Li *et al.* (2008) mostram que a fusão entre hA3G e UBA2 é mais resistente à degradação da hA3G mediada por Vif. Para testar se a UBA2 consegue estabilizar a hA3G foram usadas 3 formas da proteína, a UBA2 inserida no C-terminal da hA3G, apenas a hA3G e a fusão de L392A UBA2 (mutação incapaz de promover estabilização de proteínas) + hA3G que foi usada como controle (Figura 12) (LI *et al.*, 2008).

Figura 12: Esquema dos plasmídeos produzidos.



Fonte: (LI *et al.*, 2008)

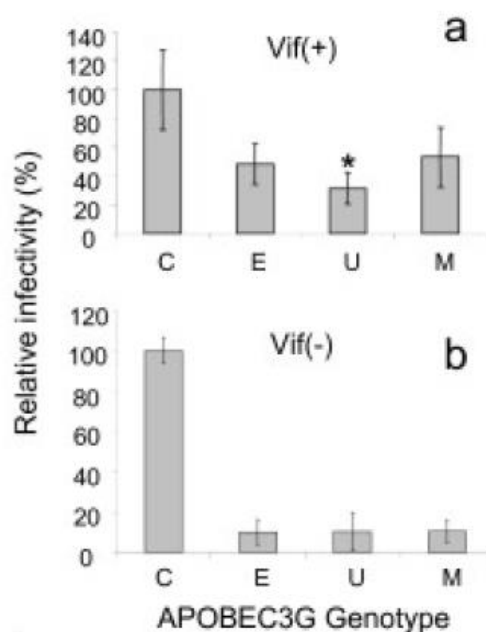
Durante os experimentos foi constatado que a junção entre hA3G-UBA2 é mais eficaz contra os efeitos da Vif do que apenas a hA3G e a fusão hA3G-UBA2 mutada (LI *et al.*, 2008).

LI *et al.* (2008) sugerem que a UBA2 têm a habilidade de sequestrar cadeias de poliubiquitina, responsável por quebrar a hA3G, impedindo assim a

degradação da hA3G promovida pela Vif, porém ressalta que uma superprodução de poliubiquitina anularia a função da UBA2 na junção.

A UBA2 além de estabilizar a hA3G impedindo sua degradação pela Vif também suprime de maneira mais significativa a atividade infecciosa dos vírus formados por células que expressam hA3G-UBA2 (Figura 13 a, b) (LI *et al.*, 2008).

Figura 13: Fusão entre UBA2 e hA3G promove diminuição da atividade infecciosa viral.



Legenda: A atividade infecciosa de vírus formados em células U é reduzida em comparação com os vírus liberados de C, E e M.

C – controle, E – hA3G, U – hA3G+UBA2, M – hA3G+UBA2 mutada.

Fonte: (LI *et al.*, 2008)

A partir do estudo de Li *et al.* (2008) demonstra-se uma possibilidade de estabilizar a hA3G para assim diminuir a atividade infecciosa do HIV-1.

4.4. Complexo HDAC6/APOBEC3G

Valera *et al.* (2015) relatam a descoberta de um complexo capaz de promover a autofagia da Vif e aumentar os níveis de hA3G. A histona deacetilase celular 6 (HDAC6) interage diretamente com a hA3G formando um complexo que se forma tanto na ausência quanto em presença de Vif.

Foi observado que a degradação da hA3G pela Vif é de maneira dose-dependente, porém, em presença de HDAC6, constatou-se um efeito protetor dose-dependente contra a Vif correlacionado com sua degradação extensiva (VALERA *et al.*, 2015).

Curiosamente, mesmo na ausência de hA3G, a HDAC6 também reduziu a expressão de Vif de maneira dose-dependente (VALERA *et al.*, 2015).

Os experimentos sugerem que HDAC6 endógena age na modulação dos níveis de expressão da Vif. De fato, HDAC6 pode proteger a hA3G interferindo no complexo Vif-Cul5-SCF degradando a Vif (VALERA *et al.*, 2015). Nesse estudo ainda, pela primeira vez, é mostrado que HDAC6 induz a degradação da Vif protegendo a hA3G da degradação por ela promovida.

Valera *et al.* (2015) também estudaram como a HDAC6 interage com a hA3G na ausência da Vif e foi visto que essa interação acontece com a HDAC6 endógena, por imunoprecipitação constatou-se a ligação entre hA3G-HDAC6.

As regiões na proteína onde ocorrem a ligação entre HDAC6-Vif e HDAC6-hA3G são distintas, o que indica que pode haver uma formação de um complexo ternário entre HDAC6-Vif-hA3G. De fato, experimentos mostram que uma mutação da hA3G tem a habilidade de propiciar a ligação entre Vif e HDAC6 (VALERA *et al.*, 2015).

A habilidade da HDAC6 em formar esse complexo ternário abre a possibilidade de que a HDAC6 compete com a Vif pela ligação com a hA3G, protegendo-a assim da degradação proteossomal promovida pela Vif (VALERA *et al.*, 2015).

Valera *et al.* (2015) também analisaram o efeito da Vif sobre a formação do complexo HDAC6-hA3G, mostrando que: 1 - mesmo em sua ausência o

complexo é formado, 2 – em presença de Vif a HDAC6 é capaz de manter níveis estacionários de hA3G.

É interessante ressaltar que a HDAC6 é capaz de degradar a Vif independentemente da ligação Vif-hA3G e sugere ainda que faz isso induzindo degradação por autofagia (VALERA *et al.*, 2015).

Esse estudo ainda mostra que a HDAC6 controla a infecciosidade das novas partículas virais por comprometer a quantidade de Vif incorporada nos vírus, um processo que não depende da presença da hA3G (VALERA *et al.*, 2015).

Esses dados levam à proposta de que a HDAC6 e o complexo HDAC6-hA3G podem representar um fator antirretroviral natural. Eles serão capazes de proteger a ação antirretroviral da hA3G e promover a degradação de Vif impedindo sua incorporação em novos vírus.

4.5. ASK1 – APOBEC3G

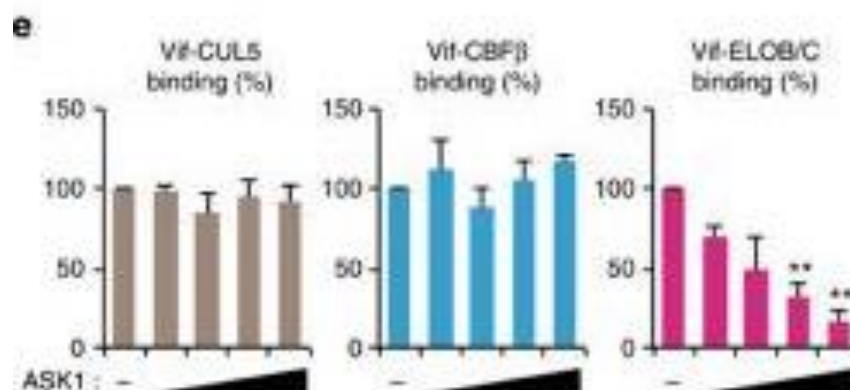
Miyakawa *et al.* (2015), expuseram um estudo em que a ASK1 (Kinase-1 reguladora de sinal de apoptose), interfere na neutralização do Vif e revitaliza o papel da proteína hA3G em relação ao vírus da imunodeficiência humana (MIYAKAWA *et al.*, 2015).

A MAP, uma quinase, reconhece uma variedade de estímulos e ativadores de transdução de sinal, e os membros de sua família permitem essa neutralização do Vif já que há a interação da ASK1 com este gene protetor do vírus. Através de um processo de imunoprecipitação foi visto que a ASK1 liga-se diretamente ao Vif e suprime sua ação inibidora a APOBEC3G (MIYAKAWA *et al.*, 2015).

Foi visto que ela se liga a todos os Vifs mutantes, exceto ao Vif sem a BC box. A ASK1 contém um domínio na região central, e dois domínios espirais enrolados nas regiões N e C-terminal, que permitem sua ligação ao gene supressor da hA3G (MIYAKAWA *et al.*, 2015).

Realizaram um teste *in vitro* que analisou versões recombinantes da proteína que formava a ligação entre o Vif e o complexo E3, composto pelas proteínas CUL5, ELOB/C e CBFb, na presença e na ausência da ASK1. A análise através de imunoblotting (Figura 14), demonstrou que a ASK1 inibiu a interação do Vif apenas com a ELOB/C, enquanto que não houve mudanças significativas de ligação entre o gene e as proteínas CUL5 e CBFb, sugerindo um melhor caminho para a neutralização do gene ser bem-sucedida pela quinase (MIYAKAWA *et al.*, 2015).

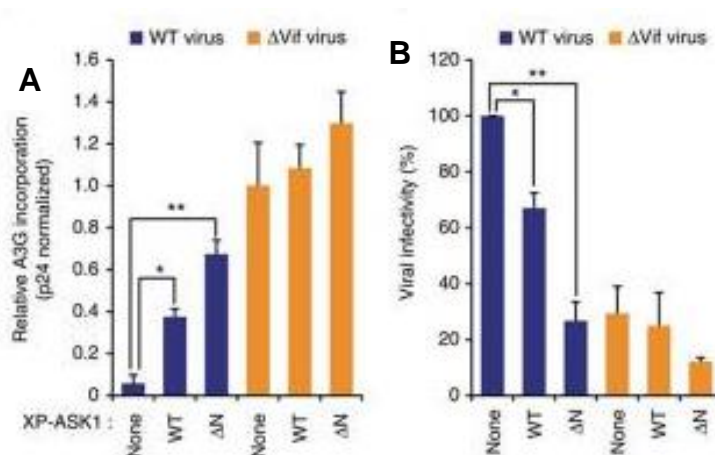
Figura 14: Quantidade de proteínas associadas ao Vif na presença da ASK1.



Fonte: (MIYAKAWA *et al.*, 2015)

Outra avaliação por imunoblotting, permitiu a análise de ligação da ASK1 a células T que continham ou não a hA3G. Para isso, células T foram tratadas com antibiótico doxiciclina (Dox), e foi feita a indução de ASK1 em ambas células contendo ou não hA3G. Notou-se que houve inibição da replicação do HIV pela ASK1 apenas em células que continham hA3G, e além disso, o número da hA3G aumentou nessas células, ou seja, a ASK1 restringe a replicação do vírus promovendo a incorporação da hA3G em células humanas T CD4 (MIYAKAWA *et al.*, 2015).

Figura 15: Relação entre incorporação de hA3G (A) ou infecção viral (B) e a indução de ASK1 em células T infectadas pelo vírus contendo ou não o Vif e que possuíam ou não mutação.



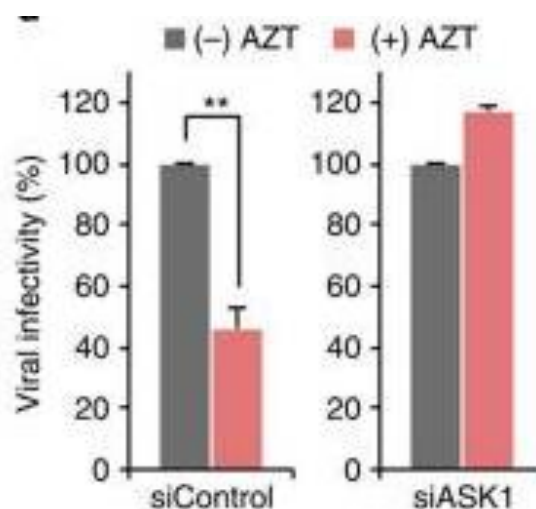
Fonte:

al., 2015)

(MIYAKAWA *et*

Por fim, foi visto também que o AZT, inibidor de transcriptase reversa e fármaco utilizado no tratamento à infecção pelo HIV, induziu a produção de ASK1 em células mononucleares de sangue periférico e em células T CD4, permitindo a incorporação da hA3G na Vif (MIYAKAWA *et al.*, 2015).

Figura 16: Relação entre a infecção viral e a presença e ausência de AZT no controle e em células induzidas a produzir ASK1.



Fonte: (MIYAKAWA *et al.*, 2015)

Com isso, percebe-se que mecanismos como a interação entre as proteínas acessórias e os fatores de restrição, podem ser regulados por eventos extracelulares. ASK1 é indispensável no processo de neutralização do Vif e da não degradação da APOBEC3G na função de barreira contra o HIV (MIYAKAWA *et al.*, 2015).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Não somente no Brasil, mas em todo o mundo a AIDS ainda representa um grave problema de saúde pública, com um grande número de novos casos registrados a cada ano.

Em razão de suas complicações, não somente a nível imunológico, mas também em todos os demais órgãos e sistemas, a infecção pelo vírus HIV acarreta uma série de impactos negativos sobre a saúde e qualidade de vida do ser humano.

Do mesmo modo, a inexistência de uma cura é outro fator que contribui para sua importância em saúde pública, fazendo um grande número de vítimas a cada ano.

Antes de analisarmos os tratamentos atualmente disponíveis para o controle da AIDS, convém destacarmos e entendermos como ocorre, em suma, o processo de infecção e patogênese nestes casos.

Na infecção pelo HIV, logo após o período de latência do vírus, vem a fase final, onde ocorre uma redução crítica de células T, tipo CD4, chegando abaixo de 200 unidades por mm^3 de sangue, sendo que em adultos saudáveis, o número de células T é de 800 a 1200 unidades. É nesta fase que passam a ser visíveis os primeiros sintomas típicos da AIDS, segundo o Ministério da Saúde (2009).

Segundo destacado por Machado (2004) há infecção especialmente sobre as células CD4, de modo que a maioria é destruída em razão da citotoxicidade mediada por células TCD8, que expressam antígenos virais na membrana. Com a destruição das células CD4, há um comprometimento na resposta imune, a sua diminuição e alteração de função leva a uma supressão imunológica, associada à diminuição de citocinas IL-2, IFN- γ e TNF- α .

Mesmo assim, alguns indivíduos infectados não apresentavam tais características, parecendo que nem haviam sido infectados pelo HIV. Estes episódios chamaram atenção dos pesquisadores que através de investigações laboratoriais encontraram dados importantes sobre o controle dessa doença que abriu portas a novos olhares frente à infecção. Foi visto que indivíduos infectados

apresentavam uma proteína capaz de barrar o mecanismo do vírus a fim de impedir que a célula infectada se desenvolvesse.

Ela utiliza um mecanismo genético, produzindo códons de parada, que impede o vírus de utilizar o material genético da célula infectada para produzir novas cepas. Isso permite que no futuro, visando o terapêutico, ela poderá permitir uma série de mutações que ao se acumularem irão impedir o vírus de se multiplicar de uma vez por todas. É claro que seu mecanismo é mais eficaz em algumas situações do que outras, por exemplo, dependendo do estágio da doença ou de sua condição, o efeito da APOBEC3G é mais eficaz ou não.

Em meio a essa descoberta, foi visto que o vírus apresenta uma proteína que exerce papel contrário da hA3G, a Vif. Essa proteína codificada pelo gene Vif, presente no vírus da imunodeficiência humana, é que possibilita a ação infecciosa do vírus e além disso suprime a ação da hA3G, por meio de sua ligação a um complexo denominado de VIF-Cul5-SCF.

Neste trabalho foram expostos dados e pesquisas que permitem mostrar mecanismos capazes de driblar esse gene, e concluir que, mesmo ainda futuramente, há possibilidade de utilização da APOBEC3G como uma forma de tratamento eficaz no controle e porque não na cura desta doença.

Alguns destes mecanismos aqui descritos são a fusão da proteína com a ubiquitina associada a domínio 2 (UBA2), sua associação ao complexo HDAC6/APOBEC3G, a ligação de uma quinase ao complexo ligador do Vif (complexo VIF-Cul5-SCF) inibindo a interação entre eles; entre outros.

Ainda em processo de descobertas sobre novas formas de tratamento, por meio das pesquisas descritas neste trabalho, a hA3G parece ser uma opção promissora para o futuro no controle da AIDS pelo mundo, sendo necessária a continuação e novas pesquisas que explorem o potencial desta proteína no assunto em questão.

REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K. et al. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

A VÁZQUEZ-PÉREZ, Joel et al. APOBEC3G mRNA expression in exposed seronegative and early stage HIV infected individuals decreased with removal of exposure and with disease progression. **Biomed Central**, Mexico City, v. 23, n. 6, p.1-8, mar. 2009.

BRASIL. Gerson Fernando Mendes Pereira. Ministério da Saúde (Org.). **HIV - AIDS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Gerson Fernando Mendes Pereira. Ministério da Saúde (Org.). **HIV - AIDS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

GUO, F.; CEN, S.; NIU, M.; YANG, Y.; GORELICK, R.J.; KLEIMAN, L. The Interaction of APOBEC3G with Human Immunodeficiency Virus. Type 1 Nucleocapsid Inhibits tRNA³ Lys Annealing to Viral RNA. **Journal of Virology**, 81(20):11322–11331, 2007.

HARRIS HR *et al.* DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. **Cell** 2003, 113: 803-809

JANEWAY, C. *et al.* **Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

JIN, X.; BROOCKS, A.; CHEN, H.; BENNETT, R.; REICHMAN, R.; SMITH, H. APOBEC3G/CEM15 (hA3G) mRNA Levels Associate Inversely with Human Immunodeficiency Virus Viremia. **Jornal of Virology**, 79(17):11513–11516, 2005.

KHAN MA, Kao S, Miyagi E, Takeuchi H, Goila-Gaur R, et al. (2005) Viral RNA is required for the association of APOBEC3G with human immunodeficiency virus type 1 nucleoprotein complexes. **J Virol** 79: 5870–5874.

KINDT, Thomas J.; GOLDSBY, Richard A.; OSBORNE, Barbara A.. **Imunologia de Kuby**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

KOURTEVA, Yordanka et al. APOBEC3G Expression and Hypermutation are inversely associated with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) burden in vivo. **National Institutes Of Health**, Nashville, v. 1, n. 430, p.1-9, ago. 2012.

LI, Lin et al. APOBEC3G-UBA2 fusion as a potential strategy for stable expression of APOBEC3G and inhibition of HIV-1 replication. **Biomed Central**, Baltimore, v. 72, n. 5, p.1-13, ago. 2008.

MA, Jing et al. The roles of APOBEC3G complexes in the incorporation of APOBEC3G into HIV-1. **Plos One**, New York, v. 8, n. 10, p.1-9, out. 2013.

MACHADO, Paulo R. L. et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, Rio de Janeiro, v. 79, n. 6, p.647-664, 28 nov. 2004.

MARIANI, R. et al. Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. **Cell**, v. 114, p. 21-31, 2003.

MATSUI, Masashi et al. Small molecules that inhibit Vif-induced degradation of APOBEC3G. **Virology Journal**, Kyoto, v. 122, n. 11, p.1-8, fev. 2014.

MERCENNE, Gaelle et al. HIV-1 Vif binds to APOBEC3G mRNA and inhibits its translation. **Oxford University Press**, France, v. 38, n. 2, p.633-646, out. 2009.

MIYAKAWA, K. et al. ASK1 restores the antiviral activity of APOBEC3G by disrupting HIV-1 Vif-mediated counteraction. **Nat. Commun.** 6:6945, 2015.

NEOGI, Ujjwal et al. Human APOBEC3G-mediated hypermutation is associated with antiretroviral therapy failure in HIV-1 subtype C-infected individuals. **Jias**, Sweden, v. 18472, n. 16, p.1-8, jan. 2013.

PASQUALE, Mariapia de et al. Lower HIV Provirus levels Are Associated with More APOBEC3G Protein in Blood Resting Memory CD4+ T Lymphocytes of Controllers In Vivo. **Plos One**, New York, v. 8, n. 10, p.1-10, out. 2013.

RODRIGUES, D.Q. Efeito do fator de crescimento do nervo (NGF) sobre a replicação do HIV-1 em células primárias humanas. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 92p., 2009.

ULENGA NK et al. The Level of APOBEC3G (hA3G)-related G-to-A mutations does not correlate with viral load in HIV type 1-infected individuals. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 2008;24(10):1285-90.

VALERA, María-soledad et al. The HDAC6/APOBEC3G complex regulates HIV-1 infectiveness by inducing Vif autophagic degradation. **Retrovirology**, La Laguna, v. 53, n. 12, p.1-26, maio 2015.

WHO (Org.). **HIV**. New York: Unaid, 2013.

Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, et al. (2003) Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. **Science** 302: 1056–1060.

Zhang, H. et al. The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. **Nature** 424:94-98