

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Microbiologia

Camila Pacheco Silveira Martins da Mata

**POTENCIAL ANTI-VIRAL DO COMPOSTO TERPÊNICO MIRIADENOLÍDEO PARA
O RETROVÍRUS HTLV-1**

Belo Horizonte

2012

Camila Pacheco Silveira Martins da Mata

**POTENCIAL ANTI-VIRAL DO COMPOSTO TERPÊNICO MIRIADENOLÍDEO PARA
O RETROVÍRUS HTLV-1**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Microbiologia.

Orientadora: Edel Figueiredo Barbosa Stancioli

Co-orientadora: Elaine Maria de Souza Fagundes

Belo Horizonte

2012

043

Mata, Camila Pacheco Silveira Martins da.

Potencial anti-viral do composto terpênico miriadenolídeo para o retrovírus HTLV-1 [manuscrito] / Camila Pacheco Silveira Martins da Mata. – 2012.

186 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Edel Figueiredo Barbosa Stancioli. Co-orientadora: Elaine Maria de Souza Fagundes.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Vírus Linfotrópico T Tipo 1 Humano. 3. Terpenos. 4. Antivirais. I. Stancioli, Edel Figueiredo Barbosa. II. Fagundes, Elaine Maria de Souza. III. Universidade Federal e Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Co-orientadora: Profa. Elaine Maria de Souza Fagundes
Relatora e Suplente: Dra. Jaqueline Germano de Oliveira
Suplente: Dra. Leandra Barcelos Figueiredo

Às 14:00 horas do dia 30 de julho de 2012, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Dras. Jaqueline Maria Siqueira Ferreira (UFSJ), Daniel Gonçalves Chaves (HEMOMINAS), Carlos Leomar Zani (CPqRR), Flávio Guimarães da Fonseca (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG) e a Profa. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli - Orientadora, para julgar o trabalho final "Potencial anti-viral do composto terpênico miriadenolídeo para o retrovírus HTLV-1", da aluna **Camila Pacheco Silveira Martins**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Cláudio Antônio Bonjardim - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 30 de julho de 2012.

Dra. Jaqueline Maria Siqueira Ferreira

Dr. Daniel Gonçalves Chaves

Dr. Carlos Leomar Zani

Dr. Flávio Guimarães da Fonseca

Profa. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli (Orientadora)

Prof. Cláudio Antônio Bonjardim
Coordenador

*Dedico este trabalho aos meus amados pais, Ailton e Diva,
pela constante demonstração de amor, paciência,
compreensão e apoio incondicional durante toda minha vida.*

*Por todo o esforço e sacrifício que fizeram para
minha formação e por tudo que sou.*

*A integridade, princípios e caráter de vocês me fazem
a cada dia um ser humano melhor.*

Minha eterna gratidão, amor e admiração.

*A meu irmão, Alessandro, pela sua garra e integridade
e por acreditar em meus sonhos.*

A Deus,

*“Que nos deu o dom da vida,
nos presenteou com a liberdade,
nos abençoou com a inteligência,
nos deu a graça de lutarmos,
para a conquista de nossas realizações”....*

(Rui Barbosa)

*Ao meu noivo onde encontrei
uma parte de minha alma,
uma razão para sorrir
que me proporcionou e
proporciona os
momentos mais felizes e
livres de minha vida.*

AGRADECIMENTOS

À Deus “... presença doce incomparável, grande mistério...” por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Aos meus Pais, que dedicaram a vida à educação dos seus filhos. Pelo amor incondicional e exemplo de fé, retidão, integridade, força e humildade que me ajudaram nesta caminhada. Ao meu querido irmão Alessandro, pela presença amiga e reconfortante. E a minha cunhada Rosilene, e é claro ao meu amado sobrinho ou sobrinha, pelo companherismo e confiança.

Ao Frederico, meu grande amor, pela paciência, companherismo, compreensão e amor que fizeram e faz os meus dias mais bonitos e serenos.

Aos meus familiares e amigos pelas orações, apoio, paciência, amor e pelo ombro amigo que me impulsionaram a seguir em frente com garra e determinação.

À Edel, minha querida orientadora, que me ensinou a enfrentar desafios com coragem e otimismo e despertou em mim o entusiasmo pela Ciência. Agradeço pela confiança, dedicação e apoio durante todas as etapas de minha vida acadêmica, pela sua postura ética pela sua maneira simples e desprendida de transmitir seus conhecimentos e mostrar o caminho a seguir.

À Elaine, minha co-orientadora, que abriu as portas de seu laboratório e me deixou usufruir de seu ambiente com muito carinho e atenção. Por toda confiança, presteza e profissionalismo. Aos colegas do laboratório de Fisiologia, Cristiano, Carla, Fabiana, Débora, Livia e ao Prof^o Almir por todo apoio.

Há algumas oportunidades na vida científica para aprendermos que a execução de idéias depende do trabalho em equipe:

Aos amigos do Laboratório de Virologia Básica e Comparada (LVBA): Aline, Alice, Amanda, Adriano, Bárbara, Marcela, Danielle, Fabiana, Fernando, Iracema, Juliana, Leandro, Lorena, Lorena Ribeiro, Luis Adan, Mateus, Rodrigo, Tânia Mara, Thiago, Vinicius. Em especial a Jaqueline e Luciana que me auxiliaram no desenvolvimento deste estudo.

Ao Prof^o Flávio por nos receber em seu laboratório com disposição e alegria. Por toda presteza e dedicação.

Ao Rodrigo, “meu estagiário”, por todo auxílio na execução deste estudo, pela paciência, pelo ombro amigo e por toda dedicação ao longo deste tempo.

Ao Laboratório de Vírus, por todo apoio, em especial a Prof^a Dra Erna Kroon, Prof^o Dr^o Cláudio Bonjardin e ao doutorando Jonas, pela colaboração nos experimentos de microscopia eletrônica e confocal.

À Fundação HEMOMINAS, em especial a Dr^a Marina Lobato pela colaboração nos experimentos de biologia molecular. Agradeço toda dedicação, orientação e paciência. Ao Laboratório de Pesquisa agradeço em especial a Rafaela e a Poliane pelo companherismo, dedicação e amizade.

Ao Centro de Microscopia – CDTN, em especial o Kniulpe, Roberta e Denilson pela preparação das amostras e produção das imagens de microscopia eletrônica.

Ao CETEC, nas pessoas do Vilela e Margareth, pelo acolhimento e disponibilização do Microscópio de Força Atômica. Ao Prof^o Orlando por toda a disposição e dedicação na produção e análises das imagens. E ao Dener por todo auxílio, presteza e dedicação.

Aos professores e colegas da Pós-graduação de Microbiologia que me apoiaram e ensinaram os caminhos da Ciência.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação, Douglas, Fatinha, Tiago e Patrícia, e funcionários da secretária de Microbiologia, em especial a Gina, por todo carinho, presteza e dedicação.

Às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPEMIG pelo apoio financeiro.

“Acredito que o trabalho é amor em movimento. Tenho a impressão de que, se mais pessoas encarassem o trabalho e a vida desta forma, seriam capazes de maiores realizações.”

Papa João XXIII

RESUMO

O HTLV-1 (*Human T-lymphotropic virus 1*) possui distribuição cosmopolita, infectando milhões de pessoas. Este retrovírus é o agente causador de várias síndromes como a Mielopatia Associada ao HTLV / Paraparesia Espástica Tropical – HAM/TSP, uma doença de natureza degenerativa inflamatória, a Leucemia Linfoma de Células T do Adulto (ATL) uma doença de natureza neoplásica; estes adoecimentos desencadeiam manifestações debilitantes nos indivíduos infectados, sendo observadas altas taxas de morbidade e mortalidade. O desenvolvimento das doenças relacionadas ao HTLV-1 são em grande parte direcionadas pela atividade da proteína regulatória viral Tax, que modula a expressão de genes virais e celulares, favorecendo a instalação e agravamento das doenças relacionadas a este retrovírus. Considerando a gravidade do quadro clínico apresentado pelos indivíduos infectados pelo HTLV-1, especialmente no que se refere à cronificação e instalação do quadro de HAM/TSP e a ausência de um tratamento eficaz, faz-se necessário a busca de potenciais drogas a serem utilizadas como medicamentos. Neste contexto, diferentes estudos têm demonstrado o potencial terapêutico de compostos terpenos no tratamento de diferentes patologias. Dentre o grupo dos terpenos, destaca-se o diterpeno labdano miriadenolídeo (AMY) que apresenta atividade imunomodulatória, sendo observado efeito citotóxico em células cancerosas humanas, e, efeito antiinflamatório inibindo a produção de TNF- α , IL-12 e NO. Neste trabalho avaliou-se a atividade antiviral e imunomodulatória do composto diterpeno miriadenolídeo em células permanentemente infectadas pelo HTLV-1. O AMY reduziu a acumulação de mensageiros codificadores de proteínas estruturais e não estruturais, bem como de proteínas do capsídeo, envelope e a proteína Tax. Este diterpeno também modulou a expressão de diferentes genes da resposta imune inata responsivo aos receptores tipo *Toll*, NOD e RIG e via INF, além de reduzir a expressão da citocina pró-inflamatória IL-6. Ensaios com microscopia eletrônica, confocal e de força atômica mostraram a redução no número de partículas e alteração do biofilme induzido pelo vírus, necessário para a transmissão viral célula a célula.

Palavras-chave: HTLV-1; terpenóides; miriadenolídeo, atividade antiviral.

ABSTRACT

The HTLV-1 (Human T-lymphotropic virus 1) infection is intractable and endemic in many countries, having a worldwide distribution. This retrovirus can be considered a neglected public health problem and is the causative agent of Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) and HTLV-Associated Myelopathy / Tropical Spastic Paraparesis - HAM / TSP, a degenerative/inflammatory disease. The myelopathy trigger debilitating manifestations in infected individuals, and are observed high rates of morbidity and mortality. The development of diseases related to HTLV-1 are largely driven by the activity of the viral regulatory protein Tax, which modulates the expression of viral and cellular genes, favoring the installation and aggravation of diseases related to this retrovirus. Considering the severity of the clinical presentation of individuals infected with HTLV-1, especially with regard to the slowly progressive disorder resulting from a chronic immune inflammation and the lack of effective treatment, it is necessary to search for potential drugs to be used in therapeutic approach. In this context, studies have demonstrated the potential of terpene compounds in the treatment of many syndromes, highlighting the diterpene labdane (AMY), which has immunomodulatory activity specially showed by the inhibited production of TNF- α , IL-12 and NO. In this study was evaluated the antiviral and immunomodulatory activity of the diterpene compound in cells permanently infected with HTLV-1. AMY reduced accumulation of viral RNA messengers encoding structural and nonstructural proteins, besides negative regulation of the viral proteins, especially p19 e gp46. Cells treated with AMY also showed modulation on the interferon type I pathway, and reduced the production of proinflammatory cytokine IL-6. The transmission electron microscopy, confocal and atomic force microscopy assays showed a reduction in the number of HTLV-1 particles in treated cells compared to mock cells, and a induced either a reduction in the viral biofilm which is required for cell to cell viral transmission.

Keywords: HTLV-1; terpenoids; diterpene; antiviral and immunomodulatory activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 -	Estrutura esquemática da partícula viral do HTLV.....	29
Figura 1.2 -	Organização do genoma proviral do HTLV.....	30
Figura 1.3 -	Representação esquemática do ciclo de multiplicação de um retrovírus.....	38
Figura 1.4	Transmissão do HTLV-1 através da sinapse virológicas.....	39
Figura 1.5 -	Representação esquemática do isopreno, unidade estrutural dos compostos terpenóides (A), ligação entre as unidades isoprenos na ordem “cabeça e cauda” formando cadeias lineares (B) e exemplo da cadeia cíclica (C).....	62
Figura 1.6 -	Estrutura esquemática do esqueleto básico dos diterpenos classe labdano.....	64
Figura 1.7 -	Estrutura química do miriadenolídeo.....	64
Figura 2.1 -	Avaliação da citotoxicidade do miriadenolídeo (AMY) em MT-2.....	88
Figura 2.2 -	Avaliação da citotoxicidade do miriadenolídeo (AMY) em células Jurkat.....	89
Figura 2.3-	Avaliação da citotoxicidade do composto miriadenolídeo (AMY) para PBMC de 8 doadores da Fundação HEMOMINAS pela técnica colorimétrica MTT.....	90
Figura 2.4 -	Análise da citotoxicidade do composto miriadenolídeo (AMY) em células MT-2 por quantificação do DNA subdiploíde.....	91
Figura 2.5	Avaliação da citotoxicidade do composto miriadenolídeo (AMY) em células C91-PL por quantificação do DNA subdiploíde.....	92
Figura 2.6-	Avaliação da citotoxicidade do composto miriadenolídeo (AMY) em células Jurkat pela técnica de HFS.....	92
Figura 2.7-	Avaliação do conteúdo de DNA subdiploíde de PBMCs tratadas com o miriadenolídeo.....	93
Figura 2.8	Eletofórese de gel desnaturante de agarose a 1% corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta.....	94
Figura 2.9 -	Curva de dissociação das PCR em tempo real para os mRNA de <i>gag-pol</i> , <i>tax-rex</i> e <i>GAPDH</i>	95
Figura 2.10-	Acumulação de mRNA de <i>gag-pol</i> (A) e <i>tax-rex</i> (B) em células MT-2 após tratamento por 24H com diferentes concentrações do miriadenolídeo (1-0,0001µM) por PCR cinética.....	96
Figura 2.11 -	Acumulação de mRNA de (A) <i>gag-pol</i> e (B) <i>tax-rex</i> em C91-PL após tratamento por 24H com diferentes concentrações de miriadenolídeo medida por PCR cinética.....	97
Figura 2.12-	Avaliação da expressão de proteínas virais em células MT-2 tratadas com miriadenolídeo.....	98
Figura 2.13	Quantificação da expressão protéica em células MT-2 tratadas com miriadenolídeo em ensaio de Western.....	99
Figura 2.14 -	Análise da expressão de genes envolvidos na atividade antiviral em células MT-2/HTLV-1+ tratadas com o miriadenolídeo.....	101
Figura 2.15 -	Avaliação da expressão de genes envolvidos na atividade antiviral em células C91-PL/HTLV-1+ tratadas com o miriadenolídeo.....	103

Figura 3.1 -	Microfotografias eletrônicas mostrando partículas do HTLV-1 em células MT-2, tratada ou não com o composto terpênico.....	132
Figura 3.2 -	Análise quantitativa das partículas do HTLV-1 em células MT-2 tratadas ou não com o miriadenolídeo por MET.....	132
Figura 3.3 -	Estruturas envoltas por membranas presentes no citoplasma de células MT-2, apresentando partículas virais em diferentes estágios de morfogênese e maturação.....	134
Figura 3.4 -	Micrografias eletrônicas demonstrando partículas do HTLV-1 em células C91-PL. As células tratadas com AMY apresentam um maior número de variações morfológicas nas partículas virais produzidas em relação ao controle não tratado.....	137
Figura 3.5 -	Avaliação quantitativa das partículas do HTLV-1 em células C91-PL tratadas ou não com o miriadenolídeo por MET.....	138
Figura 3.6 -	Estrutura envolta por membrana presente no citoplasma de células C91-PL, apresentando diferentes estágios de maturação viral.....	139
Figura 3.7 -	Micrografias eletrônicas demonstrando fibras de actina em células infectadas pelo HTLV-1.....	141
Figura 3.8 -	Avaliação quantitativa das partículas do HTLV-1 em células MT-2 tratadas ou não com o miriadenolídeo por AFM.....	143
Figura 3.9 -	Imagens das células MT-2 por Microscopia de Força Atômica.....	146
Figura 3.10 -	Visualização de células MT-2 por AFM.....	147
Figura 3.11 -	Análise do perfil de expressão de proteínas virais e celulares das células MT-2.....	150

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 2.1 -	Genes envolvidos na resposta imune inata antiviral avaliados neste estudo	82
Tabela 2.2 -	Anticorpos e diluições utilizados nos ensaios de Western	86
Tabela 2.3 -	Análise da viabilidade celular (%) de células MT-2 e Jurkat tratadas com diferentes concentrações do miriadenolídeo por 24 horas pelo método de Exclusão de azul de tripan	88
Quadro 1.1-	Proteínas produzidas pelo HTLV-1	33
Quadro 1.2-	Receptores de reconhecimento de padrão e seus ligantes	48
Quadro 1.3-	Esquema terapêutico utilizado em pacientes que desenvolve a HAM/TSP – Tratamento geral	56
Quadro 1.4-	Abordagens terapêuticas utilizadas no tratamento da ATL por diferentes estudiosos	60
Quadro 2.1-	Iniciadores usados na PCR em tempo real para os genes gag-pol, tax-rex, e GAPDH	80
Quadro 2.2 -	Quantificação da regulação de mensageiros para genes antivirais da resposta imune inata	105

LISTA DE ABREVIADURAS E SIGLAS

ACTB - *Beta-actin*

AFM - Microscopia de força atômica

AIM - *Absent in melanoma*

AMY - Miriadenolídeo

AP-1 - *Activator protein 1*

APC - Células apresentadoras de antígenos

APOBEC3G - *Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G*

AS - Assintomático

ATG5 - *Autophagy related 5 homolog*

ATL - Leucemia de Célula T do Adulto

AZI2 - *5-azacytidine induced 2*

AZT – Azidotimidina

B2M - β_2 microglobulin

BHK-21 - *Baby hamster kidney*

BSA - Soro albumina bovina

CA - Capsídeo

CARD - *Caspase recruitment domain family*

CARDS - Domínios de recrutamento e ativação de caspases

CASP - *Caspase*

CBP – *CREB – binding protein*

CC – Controle cecular

CCL - *Chemokine (C-C motif) ligand*

CD – Controle de diluente

CD (1-n) – *Cluster of differentiation*

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

CHOP - Ciclofosfamida, adriamicina, vincristina e predinisona.

CHUK - *Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase*

CO₂ - Gás carbônico

CRE - Elemento de resposta ao cAMP

CREB - *cAMP response element-binding*
ATF - *Activating transcription factor*
CREM - *cAMP response element modulator*
CTL – *Linfócitos citotóxicos*
CTSB - *Cathepsin B*
CTSL1 - *Cathepsin L1*
CTSS - *Cathepsin S*
CXCL - *Chemokine (C-X-C motif) ligand*
CYLD - *Cylindromatosis (turban tumor syndrome)*
DAK - *Dihydroxyacetone kinase 2 homolog*
DDX3X - *DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked*
DDX58 - *DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58*
DHL – *Desidrogenase lactina*
DHX58 - *DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58*
DMSO - *Dimetilsulfóxido*
DNA - *Ácido desoxirribonucleico*
ELISA - *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*
ERK - *Extracellular signal-regulated kinases*
FADD - *Fas (TNFRSF6)-associated via death domain*
FOS - *FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*
g - *Grama*
GABA - *Gamma-AminoButyric Acid*
GAPDH - *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*
GLUT - *Glucose transporter*
GM-CSF - *Fator estimulante de colônias de macrófago-granulócito*
H - *Horas*
HAM/TSP - *Mielopatia Associada ao HTLV/Paraparesia Espástica Tropical*
HBZ - *HTLV- 1 basic leucine zipper*
HCl - *Ácido Clorídrico*
HFS - *Solução fluorocrômica hipotônica*
HIV - *Human Immunodeficiency Virus*

hnRNP A1 - *Ribonucleoproteína nuclear A1*
HPRT - *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*
HSP90AA1 - *Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1*
HT - HAM/TSP
HTLV - *Human T-lymphotropic virus*
ICAM - Molécula de adesão
IFIH1 - *Interferon induced with helicase C domain 1*
IFN – *Interferon*
IFNA - *Interferon alpha*
IFNAR - *Interferon (alpha, beta and omega) receptor*
IFNB1 - *Interferon, beta 1, fibroblast*
Ig - *Imunoglobulina*
IKBKB - *Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta*
IL - *Interleucina*
IN - *Integrase*
iNKT - *Invariant Natural Killer T*
IPEC - *Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas*
IPS - *Fator de regulação*
IRAK - *Interleukin-1 receptor-associated kinase*
IRF - *Interferon regulatory factor*
ISG - *Interferon-induced*
JNK - *c-Jun N-terminal kinases*
JUN - *Jun proto-oncogene*
kHz - *Quilo-hertz*
LFA1 - *Antígeno 1 de função associada ao linfócito*
LMS – *Lymphocyte Separation Medium*
LPD - *Leite em pó desnatado*
LRR - *Repetições rica em leucina*
LTR - *Long-terminal repeat*
MA - *Proteína da matrix*
MAL/TIRAP - *MyD88-adaptor like/TIR-associated protein*

MAP - Kinases

MAP2K - *Mitogen-activated protein kinase kinase*

MAP3K - *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase*

MAPK - *Mitogen-activated protein kinase*

MAVS - *Mitochondrial antiviral signaling protein*

MBL - Mannose-binding lectin

MEFV - *Mediterranean fever*

mg - Micrograma

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

mL - Mililitro

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

MTOC - Centro de organização do microtúbulo

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2-5-difeniltetrazólio

MVB - Corpos multivesiculares

MX1 - *Myxovirus (influenza virus) resistance 1*

MYD88 - *Myeloid differentiation primary response gene (88)*

NaOH – Hidróxido de sódio

NC - Nucleocapsídeo

NES - Exportação nuclear

NFKB - *Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*

NFKBIA - *Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*

NF- κ B - Fator nuclear κ B

NI – Não infectado

NIAID - *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*

NIH - *National Institutes of Health*

NK - *Natural killer*

NLR - Receptores de domínio de nucleotídeos de oligomerização

NLRP - *NLR family, pyrin domain containing*

nm - Nanômetros

NOD - *Nucleotide-binding oligomerization domain containing*

OAS2 - *2'-5'-oligoadenylate synthetase 2*

OD - Densidade ótica

P&D – Pesquisa e desenvolvimento

PAGE - *Polyacrylamide*

PAMPs - Padrões moleculares associados aos patógenos

PBMC - Células mononucleares do sangue periférico

PBS – Solução salina

PBS - *Primer-binding site*

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PI - Iodeto de Propídio

PIN1 - *Peptidylprolyl cis/trans isomerase, NIMA-interacting 1*

PR - Protease

PRR - Receptores de reconhecimento de padrão

PSTPIP1 - *Proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 1*

PTHrP - Proteína relacionada ao hormônio da paratireóide

PYCARD - *PYD and CARD domain containing*

PYDC1 - *PYD (pyrin domain) containing 1*

RELA - *V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A*

RIPK1 - *Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1*

RLR - Receptor do ácido retinóico indutível

RNA – Ácido ribonucleico

PRL13A - *Ribosomal protein L13a*

RT – Transcrição reversa

RT-PCR - Reverse transcription polymerase chain reaction

SARM - *Sterile α - and armadillo-motif containing protein*

SDS – Sodium dodecyl sulfate

SEM - Erro padrão

SEM - *Scanning Electron Microscopy*

SFB - Soro Fetal Bovino

SFR - *Serum Response Factor*

SNC – Sistema Nervoso Central

SPP1 - *Secreted phosphoprotein 1*

SRE - Elemento de resposta ao soro
SRF - Fator de resposta ao soro
STAT1 - *Signal transducer and activator of transcription 1*
STM - *Scanning Tunneling Microscopy*
SU - Proteínas de superfície
SUGT1 - *Suppressor of G2 allele of SKP1*
TBK1 - *TANK-binding kinase 1*
TBP - Proteína de ligação ao TATAbox
TBS – Solução salina Tween
TCLE - Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TCR - Receptores de células T
TEM - *Transmission Electron Microscopy*
TGF - Fator de crescimento tumoral
TICAM1 - *Toll-like receptor adaptor molecule 1*
TIR - Receptor *Toll/IL-1*
TLR - Receptores do tipo *toll*
TM - Proteínas transmembrana
TNF - *Tumor necrosis factor*
TR - Transcriptase reversa
TRADD - *TNFRSF1A-associated via death domain*
TRAF - *TNF receptor-associated factor*
TRAM - *Toll-receptor-associated molecule*
TRIF - *Toll-receptor-associated activator of interferon*
TRIM - *Tripartite motif containing*
UK - United Kingdom
USA - *United States of America*
v/v – Volume/ volume
VLP - *Virus-like particles*
VPA - Ácido valpróico
VPs - Vacuolar protein sorting-associated protein
WB - *Western Blot*

SUMÁRIO

JUSTIFICATIVA	25
CAPÍTULO 1 – O HTLV-1, SUAS CARACTERÍSTICAS E ADOECIMENTOS ASSOCIADOS: POTENCIAL DO COMPOSTO TERPÊNICO FRENTE A ESTA INFECÇÃO RETROVIRAL	
1 REVISÃO DE LITERATURA	28
1.1 HISTÓRICO	28
1.2 CARACTERÍSTICAS DO VIRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS – HTLV.....	28
1.2.1 <i>Proteínas regulatórias Tax e Rex</i>	33
1.2.2 <i>Tropismo celular.....</i>	36
1.2.3 <i>Ciclo de replicação.....</i>	37
1.2.4 <i>Formas de transmissão.....</i>	39
1.2.5 <i>Diagnóstico da infecção pelo HTLV1/2.....</i>	40
1.3 RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO NO CONTEXTO DA INFECÇÃO PELO HTLV-1	42
1.3.1 <i>Resposta imune inata</i>	45
1.4 DOENÇAS ASSOCIADAS AO HTLV.....	49
1.4.1 <i>A Leucemia/Linfoma das Células T de Adulto (ATL).....</i>	50
1.4.2 <i>A Mielopatia Associada ao HTLV-1/ Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP)</i>	51
1.5 TRATAMENTO NO ÂMBITO DA INFECÇÃO PELO HTLV-1	53
1.5.1 <i>Tratamento de HAM/TSP.....</i>	53
1.5.2 <i>Tratamento de ATL</i>	57
1.6 COMPOSTO VEGETAL TERPÊNICO E SEU POTENCIAL ANTI-VIRAL E IMUNOMODULADOR.	61
1.6.1 <i>Terpenos</i>	61
CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA REGULAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS VIRAIS E CELULARES EM CÉLULAS HTLV-1 POSITIVAS APÓS-TRATAMENTO COM O COMPOSTO TERPENÓIDE	
2.1 INTRODUÇÃO	68
2.2 OBJETIVOS	70
2.2.1 OBJETIVO GERAL	70
2.2.1.1 <i>Objetivos específicos</i>	70
2.3 METODOLOGIA.....	71
2.3.1 <i>Compostos testado – miriadenolídeo</i>	71
2.3.2 <i>Amostra de sangue</i>	71
2.3.2.1 <i>Obtenção de PBMC</i>	72
2.3.3 <i>Linhagens celulares</i>	72

2.3.3.1	<i>Cultura de MT-2 e C91-PL</i>	72
2.3.3.2	<i>Cultura de células Jurkat</i>	73
2.3.4	Ensaio de Citotoxicidade	73
2.3.4.1	<i>Avaliação da viabilidade celular pelo método de Exclusão de azul de tripan</i>	73
2.3.4.2	<i>Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico do MTT</i>	74
2.3.4.3	<i>Determinação do conteúdo de DNA subdiplóide por citometria de fluxo</i>	74
2.3.5	Extração de macromoléculas	75
2.3.5.1	<i>Preparação das culturas celulares para extração de macromoléculas</i>	75
2.3.5.2	<i>Extração de macromoléculas utilizando o Trizol</i>	75
2.3.5.3	<i>Extração de macromoléculas utilizando o Kit RNeasy</i>	77
2.3.6	Integridade do RNA	78
2.3.7	Produção de cDNA	78
2.3.8	Avaliação da modulação da expressão de genes virais por PCR cinética	79
2.3.9	Análise da expressão dos genes envolvidos na resposta imune	80
2.3.10	Avaliação da expressão de proteínas por ensaios de Western	84
2.3.11	<i>Análises estatísticas</i>	85
2.4	RESULTADOS	86
2.4.1	Avaliação da viabilidade de células MT-2, células Jurkat e PBMC tratadas com o miriadenolídeo	86
2.4.2	Acumulação de mRNA de genes virais (qPCR), após o tratamento de células MT-2 e C91-PL com o miriadenolídeo	92
2.4.2.1	<i>Integridade do RNA e curva padrão</i>	92
2.4.2.2	<i>Regulação de mensageiros virais em células MT-2 pós-tratamento com AMY</i>	95
2.4.2.3	<i>Regulação de mensageiros virais em células C91-PL pós-tratamento com AMY</i>	95
2.4.2.4	<i>Avaliação do perfil protéico total das células MT-2 a partir de anticorpos monoclonais</i>	96
2.4.2.5	<i>Quantificação densitométrica da expressão protéica em células MT-2 tratadas com o miriadenolídeo</i>	97
2.4.3	Avaliação da regulação de genes envolvidos na imunidade antiviral inata pelo miriadenolídeo em células MT-2 e C91-PL	99
2.4.3.1	<i>Avaliação da regulação de genes da resposta antiviral inata em células permanentemente infectadas pelo HTLV-1 tratadas com AMY – MT-2 e C91-PL</i>	99
2.5	DISCUSSÃO	107
2.6	CONCLUSÃO	120

CAPÍTULO 3 – USO DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA, DE FORÇA ATÔMICA E CONFOCAL NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DO TERPENÓIDE EM CÉLULAS MT2 E C91PL

3.1	INTRODUÇÃO	122
------------	-------------------------	-----

3.2	OBJETIVOS.....	125
3.2.1	OBJETIVO GERAL	125
3.2.1.1	<i>Objetivos específicos</i>	125
3.3	METODOLOGIA.....	126
3.3.1	Avaliação por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) da atividade antiviral do composto AMY em células HTLV-1+.....	126
3.3.2	Análise por Microscopia de força atômica (AFM) da atividade antiviral do composto AMY em células HTLV-1+.....	126
3.3.3	Avaliação da expressão protéica do HTLV-1 em MT-2	127
3.4	RESULTADOS	128
3.4.1	Análise da atividade antiviral do composto AMY em células HTLV-1+ por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	128
3.4.1.1	<i>MET em MT-2</i>	128
3.4.1.2	<i>MET em C91-PL</i>	133
3.4.2	Avaliação da atividade antiviral do composto AMY em células HTLV+ por microscopia força atômica (AFM)	140
3.4.3	Análise da expressão protéica do HTLV-1 em células MT-2 tratadas com o miriadenoídeo por imunofluorescência	146
3.5	DISCUSSÃO	149
3.6	CONCLUSÃO	153
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	154
	ANEXOS	182

JUSTIFICATIVA

O HTLV é um vírus que infecta milhões de pessoas em todo o mundo, e estimativas epidemiológicas apontam o Brasil como o país detentor do maior número absoluto de indivíduos infectados. Grande parte desses indivíduos permanece como portador assintomático (95%), sendo, portanto potenciais disseminadores do vírus, enquanto 5-10% dos infectados desenvolvem diferentes entidades clínicas, dentre elas a Leucemia-Linfoma de células T do adulto (ATL), uma doença neoplásica que possui um prognóstico desfavorável, e a Mielopatia Associada ao HTLV/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP), caracterizada como uma doença neurodegenerativa inflamatória, que diminui a qualidade e sobrevida do paciente.

Embora o HTLV-1 tenha sido descoberto desde a década de 80, sendo hoje considerado endêmico na América do Sul e outras regiões do globo, a infecção por estes vírus tem sido negligenciada, sendo ainda desconhecida por profissionais de importantes segmentos da área da saúde, comprometendo medidas de prevenção e controle, e dificultando a implementação de diretrizes públicas específicas para seu enfrentamento.

Na infecção pelo HTLV-1, a cronificação induz importante imunomodulação, levando o paciente não somente a desenvolver adoecimentos vinculados diretamente à infecção, quanto a estarem sujeitos a uma série de intercorrências clínicas, gerando síndromes de difícil controle e remissão. Os critérios de tratamento são variáveis, e, as poucas diretrizes existentes mundialmente, indicam que os casos assintomáticos não devem ser tratados, considerando a baixa possibilidade do desenvolvimento de doença. Assim, apenas os pacientes com diagnóstico de entidades clínicas correlacionadas à infecção pelo HTLV-1, devem ser tratados especificamente. Os quadros neurológico e neoplásico, uma vez estabelecido devem ser considerados para uma abordagem terapêutica. Na atualidade, diferentes cartilhas terapêuticas permeiam a literatura na tentativa de controle e tratamento de indivíduos pós-infecção com o HTLV-1, usando medicações de ação antiviral, imunomodulatória e imunossupressora, porém, a maioria é composta de estudos não controlados e casuísticos pouco numerosos. Infelizmente, os efeitos positivos limitados e não duradouros são pontos de intersecção de quase todas as formas de tratamento hoje disponíveis.

As plantas constituem uma importante fonte de substâncias biologicamente ativas, muitas das quais podem servir de modelos para a síntese de uma variedade de fármacos, devido a sua diversidade estrutural e de propriedades físico-químicas e biológicas. O reino vegetal tem fornecido grande parte dos metabólitos secundários com grande valor agregado, utilizados na produção de medicamentos, cosméticos e alimentos. Dentre as muitas classes de metabólitos secundários utilizados destacam-se os terpenóides por sua vasta aplicação farmacêutica, para os quais já se relataram atividades antiinflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antiparasitária, hipoglicêmica, antialérgica, imunomodulatória, além de efeitos de quimioprevenção do câncer. Com relação ao HTLV-1, já é conhecido que os compostos terpênicos modulam negativamente a via NF- κ B (principal via transativadora da proteína viral Tax), e também da produção de citocinas pro-inflamatórias, com destaque para TNF- α (que tem a sua produção induzida também por Tax via NF- κ B e é comprovadamente neurotóxica). O miriadenolídeo destaca-se além do seu potencial terapêutico relatado, por sua baixa citotoxicidade *in vitro* para diferentes linhagens celulares, fator extremamente importante na Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de novos fármacos.

Considerando a gravidade do quadro clínico apresentado pelos indivíduos infectados pelo HTLV-1, especialmente no que se refere à cronificação e instalação do quadro de HAM/TSP e de outras síndromes inflamatórias, como as manifestações reumatológicas, faz-se necessário um maior entendimento dos mecanismos imunopatogênicos envolvidos no processo de evolução clínica da infecção pelo HTLV-1. Apesar de avanços após três décadas de descobrimento da infecção pelo HTLV-1 os resultados com terapêutica ainda são muito incipientes. Pesquisa de novos fármacos que possam atuar, de forma eficaz, no tratamento das síndromes desenvolvidas na cronificação da infecção, e que tenham ação antiviral e antiinflamatória específica, se faz necessária, uma vez que a intervenção terapêutica em estágios recentes de manifestação clínica pode ser crucial para a qualidade de vida e sobrevivência do infectado.

No presente estudo, com o objetivo de identificar novas substâncias bioativas com potencial terapêutico para a infecção pelo HTLV-1, foi realizada a investigação *in vitro* de propriedades antivirais e imunomodulatórias do diterpeno labdano miriadenolídeo para o vírus HTLV-1.

Capítulo 1- O HTLV-1, suas características e adoecimentos associados: potencial do composto terpênico frente a esta infecção retroviral.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 HISTÓRICO

O HTLV-1 (*Human T-lymphotropic virus 1*) foi isolado primeiramente de células T derivadas de linfonodos e linfócitos do sangue periférico de um paciente com linfoma cutâneo nos Estados Unidos, sendo classificado como retrovírus pelas suas características físico-químicas (POIESZ et al., 1980). A Leucemia de Célula T do Adulto (ATL) foi descrita em Kyoto, Japão, como entidade clínica em 1977 por Uchiyama e colaboradores e correlacionada com o HTLV-1 em 1981 por Hinuma e colaboradores, que demonstrou a presença de anticorpos contra HTLV-1 no soro de pacientes com ATL.

Em 1982 um segundo tipo de retrovírus humano foi descrito, o HTLV-2 (KALYANARAMAN et al., 1982), a partir de uma linhagem de células T imortalizadas de um paciente com leucemia de células pilosas, sendo relacionado, mas distinto do HTLV-1. Recentemente, foram descobertos o HTLV-3 e HTLV-4 no continente africano (CALATTINI et al., 2005; WOLFE et al., 2005).

1.2 CARACTERÍSTICAS DO VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS – HTLV

O HTLV pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e ao gênero *Deltaretrovirus*. A partícula viral apresenta morfologia do tipo C, estruturalmente complexa, sendo formada por um envelope e um nucleocapsídeo (figura 1.1), que no HTLV-1 possui aproximadamente 100–140 nm de diâmetro. O envelope, derivado da membrana plasmática do hospedeiro (CANN et al., 1996, POIESZ et al., 2003), possui proteínas que se projetam para o exterior, proteínas transmembrana (TM/p21), densamente dispersas em toda superfície viral, que ancoram as proteínas de superfície (SU/gp46) da partícula viral (JASSAL et al., 2001, POIESZ et al., 2003). Unida à proteína do envelope, encontra-se a proteína da matrix (p19/MA), Gag. O nucleocapsídeo de simetria icosaédrica, é composto em sua maioria de proteínas codificadas pelo gene *gag* (p24/CA) (COFFIN, 1996, POIESZ et al., 2003), essas apresentam estruturas secundária e terciária altamente conservadas e estrutura quaternária esférica na montagem do cerne

(CORNILESCU et al., 2003). Esta estrutura abriga, no seu interior, o genoma viral composto por duas fitas simples de RNA senso positivo (CANN, 1996, POIESZ et al., 2003) associadas a muitas proteínas básicas, proteínas do nucleocapsídeo, e outras como a enzima transcriptase reversa e a integrase, essenciais no processo de replicação viral (COFFIN, 1996, POIESZ et al., 2003).

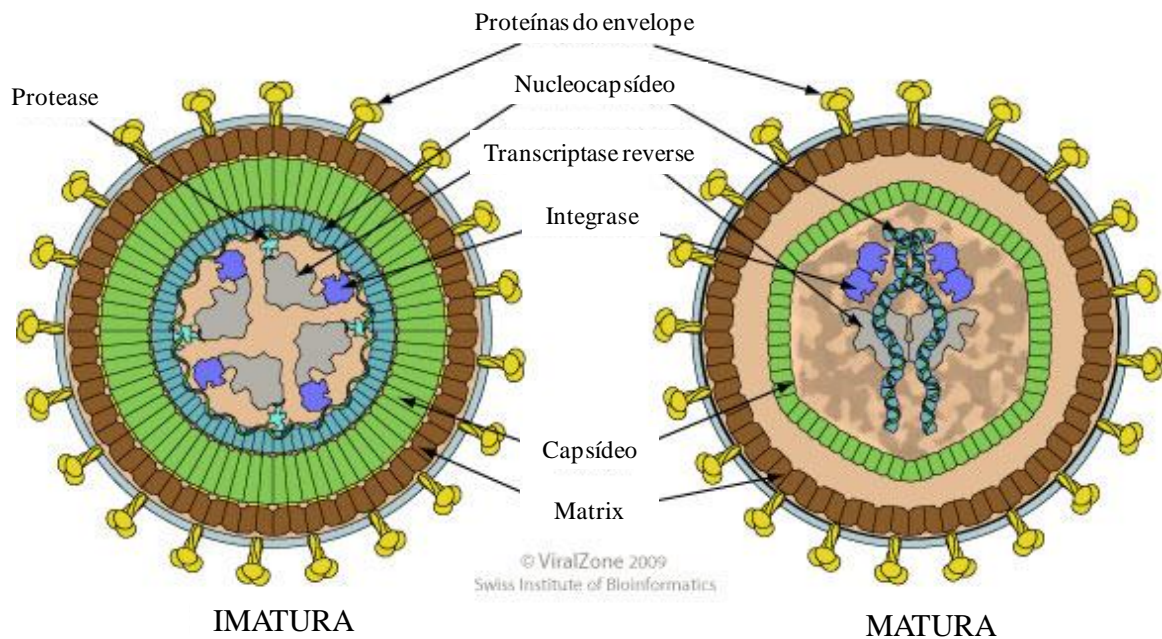


Figura 1.1 - Estrutura esquemática da partícula viral do HTLV. Fonte: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/60.html.

O genoma do HTLV é composto por um dímero de RNA fita simples, que apresenta os genes estruturais *gag*, *pol* e *env*, comuns a todos os retrovírus, a região pX, uma região distinta entre o gene *env* e a extremidade 3' que codifica proteínas regulatórias, Tax e Rex, e proteínas acessórias, HBZ, p13, p12, p30, p21 além de ser flanqueado no final de cada extremidade com Terminação Longa Repetida (LTR; figura 1.2 ; CANN et al., 1996) composta das regiões U3, R e U5. O DNA proviral do HTLV-1 possui 9032 bases (SEIKI et al., 1983) e o do HTLV-2, 8952 bases (SHIMOTOHNO et al., 1985).

molécula de protease madura) e pelo processamento dos produtos da Gag madura (NAM et al., 1988; NAM et al., 1993; OLIÈRE et al., 2011).

A transcriptase reversa possui atividade de DNA polimerase, sintetiza o DNA viral a partir do RNA genômico, sendo fundamental para a fase inicial de replicação, e atua como RNase H, removendo a fita de RNA molde após a síntese da cadeia de DNA, degradando seletivamente o RNA da molécula híbrida DNA-RNA. A integrase atua inserindo o DNA viral no genoma da célula hospedeira, através da clivagem do DNA da célula hospedeira e sua ligação com o DNA viral (OLIÈRE et al., 2011; POIESZ et al., 2003).

O gene *env* codifica as proteínas do envelope viral. A proteína precursora glicosilada de 61kD é clivada gerando a glicoproteína de superfície (gp46/SU) e a proteína transmembrana (p21/TM) (POIESZ et al., 2003; SCHNEIDER et al., 1984; SODROSKI et al., 1984; OLIÈRE et al., 2011). As proteínas de superfície e a proteína transmembrana se associam não covalentemente, de modo que a proteína TM ancora a proteína SU no envelope da partícula viral (DELAMARRE et al., 1996).

A partir da região pX é transcrito diferentes genes codificadores das proteínas regulatórias e acessórias do HTLV-1, importantes na infecção e replicação viral por influenciar a sinalização celular e a expressão gênica (GRASSMANN et al., 2005; MATSUOKA, 2005; OLIÈRE et al., 2011) (Quadro 1.1).

As proteínas regulatórias Tax e Rex regulam a expressão viral, sendo requeridas no processo de multiplicação viral (EDWARDS et al., 2011). A Tax atua como potente ativadora transcricional do genoma viral e a Rex como supressora do processamento dos transcritos virais (KASHANCHI & BRADY, 2005; YOSHIDA, 2005). As proteínas acessórias, p12, p30, p13 e HBZ são importantes para a infectividade viral, persistência da carga proviral, ativação das células do hospedeiro, regulação da transcrição gênica, além de auxiliar na disseminação *in vivo* (ALBRECHT, et al., 2000; ALBRECHT & LAIMORE, 2002). As proteínas p12 e p30 estão correlacionadas com a infectividade viral, sendo que a p12 atua ativando as células do hospedeiro, é recrutada na sinapse

imunológica, além de aumentar a transmissão do HTLV-1 por aumentar a taxa de fusão de membrana entre a célula infectada e a não infectada (MICHAEL et al, 2004, OLIÈRE et al., 2011).

Por sua vez, a p30 atua como um modulador transcricional, suprimindo a expressão gênica viral e a replicação por inibir a ativação transcricional da LTR mediada por Tax e por interagir com mRNA de *tax/rex* retendo-os no núcleo (LI et al. 2011). A proteína p13 pode desencadear mudanças na permeabilidade mitocondrial e/ou alterar processos de sinalização de cálcio, sugerindo seu papel na apoptose (NICOT et al, 2005). O HBZ (HTLV-1 fator bZIP) inibe a transativação mediada por Tax a partir da 5' LTR, através da interação com JUND e da família CREB/ATF, além de promover a proliferação de células T, o que poderia contribuir para o aumento da carga proviral (YASUNAGA, MATSUOKA, 2011).

Quadro 1.1: Proteínas produzidas pelo HTLV-1

PROTEÍNAS REGULATÓRIAS E ACESSÓRIAS DO HTLV-1			
Proteínas virais	pX - ORF	Função Biológica	Referências
Tax (p40)	IV	. Imortalização da célula; . Transativação da LTR; . Indução de vias de sinalização por NF- κ B, CREB, SFR e AP-1; Inativação de supressores de tumores; . Instabilidade cromossomal; . Indução de resposta imune por CTL.	AKAGI et al, 1995; SODROKI et al., 1994; YAO & WIGDALH, 2000; JEANG, 2001; REID et al., 1993; HANGAISHI et al, 1996; JIN et al., 1998; KANNAGI et al., 2004; KASHANCHI & BRADY, 2005; YOSHIDA, 2005.
Rex (p27)	III	. Exportação nuclear de mRNAs não processados e de processamento único.	KASHANCHI & BRADY, 2005; YOSHIDA, 2005
p30	II	. Modulação transcricional viral pela interação com CBP e p300.	NICOT et al, 2004; ZHANG et al, 2000; LI et al. 2011.
p13	II	. Efeitos na mitocôndria e na proliferação celular.	CIMINALE et al, 1999; NICOT et al, 2005.
p12	I	. Aumento do cálcio no citoplasma. . Potencia a produção de IL-2. . Ação supressora de MHC-I.	DING et al, 2001; JOHNSON et al, 2001; MICHAEL et al, 2004 OLIÈRE et al., 2011.
HBZ	Fita anti-senso	. Supressão da transativação mediada por Tax.	GAUDRAY et al, 2002; BASBOUS et al, 2003; YASUNAGA & MATSUOKA, 2011.

Adaptado de MARTINS et al, 2012.

1.2.1 Proteínas regulatórias Tax e Rex

A proteína Tax, transativadora viral, é uma fosfoproteína nuclear de 40kDa denominada p40, que abrange 353 aminoácidos (FUJISAWA, et al, 1985; FRANCHINI, 1995; BARMAK et al., 2003), sendo encontrada essencialmente no núcleo (SEMMES & JEANG, 1996; BURTON et al., 2000). Entretanto, pode se locomover entre o núcleo e o citoplasma pela presença de um sinal de exportação nuclear (NES) rico em leucina (ALEFANTIS et al., 2005 A), e permanecer em pequena

quantidade no citoplasma (SEMMES & JEANG, 1996; BURTON et al., 2000; GRASSMANN et al., 2005). No citoplasma, colocaliza-se em organelas citoplasmáticas associadas com a via secretória e em íntima associação com o centro de organização do microtúbulo (MTOC), além de interagir com proteínas citoplasmáticas, assim não se limitando ao retículo endoplasmático, complexo de Golgi e ao MTOC (ALEFANTIS et al., 2005 B; NEJMEDDINE et al., 2005). Esta proteína é ainda encontrada nas regiões de contato célula-célula que organizam a sinapse viral, formada entre as células infectadas e as células alvo (NEJMEDDINE et al, 2005; IGAKURA et al, 2003). Em PBMC derivado de indivíduos infectados com o HTLV-1, a fração de Tax presente em associação ao MTOC é intimamente associada ao compartimento *cis*-Golgi (NEJMEDDINE et al, 2009).

Recentemente, estudos demonstraram a presença da p40 no ambiente extracelular (JAIN et al., 2007), sendo detectada por análises experimentais, no sobrenadante de diferentes linhagens celulares: MT-2 (Linhagem celular linfocitária permanentemente infectada pelo HTLV-1), C8166 (Linhagem celular linfoblastóide imortalizada pelo HTLV), linfócitos CD4 + e astrócitos infectados, 293T (*Human Embryonic Kidney cells*) e BHK-21 (*baby hamster kidney*) transfectadas com Tax e no líquido cefalorraquidiano de pacientes com HAM/TSP (ALEFANTIS et al., 2005 A; FLAIG et al., 2005; JAIN et al., 2007). A proteína Tax extracelular induz a expressão de marcadores de ativação e maturação de células dendríticas (ALEFANTIS *et al.*, 2005b; JAIN *et al.*, 2007). As células apresentadoras de antígenos (APC) fagocitam Tax extracelular e a apresentam através do MHC-I, resultando na lise das células que expressam Tax pela ação dos linfócitos T CD8+ específicos (ALEFANTIS *et al.*, 2005b).

A fosfoproteína Tax é um potente ativador da expressão de genes celulares e virais, com potencial oncogênico, devido à habilidade de alterar a expressão de genes celulares envolvidos no crescimento e proliferação celular e por interagir diretamente com substâncias regulatórias do ciclo celular (MARRIOTT & SEMMES, 2005). Tax pode formar complexos com mais de 100 proteínas celulares pertencentes a vários grupos funcionais (BOXUS et al, 2008), regulando negativa e positivamente um grande número de genes celulares, e, interferindo com a estabilidade e atividade de numerosos efetores celulares.

A manutenção do ciclo viral é dependente da proteína Tax. Assim, o genoma proviral é indiretamente regulado através da interação da proteína Tax com fatores de transcrição celulares. Tax potencialmente ativa a expressão de todos os genes do HTLV-1 por interagir com membros do complexo CREB/ATF, aumentando a dimerização e afinidade das proteínas deste complexo ao TRE (Elementos de resposta a Tax) presente em 5'-LTR (revisto por LODEWICK et al, 2011).

A indução da expressão é mediada pela ligação dessas proteínas a reforçadores (“enhancers”) presentes nas regiões promotoras gênicas através de quatro vias principais: seqüência CRE (elemento de resposta ao cAMP), à qual se ligam as proteínas CREB/ATF ou CREM; o sítio de ligação para fatores NF- κ B, seqüência SRE (elemento de resposta ao soro) à qual se liga SRF (fator de resposta ao soro) e a família de fatores transcricional AP-1 (BEX et al., 1999; AZRAN et al., 2004; GRASSMANN et al., 2005; KASHANCHI AND BRADY, 2005), além de aumentar a expressão de fatores de crescimento, como os proto-oncogenes *c-fos*, *c-myc* e *egr*, de receptores como IL-1 (interleucina 1), IL-2, IL-3, IL-6, GM-CSF (fator estimulante de colônias de macrófago-granulócito), TGF- α (fator de crescimento tumoral alfa), *c-sis*, vimetina (proteína do citoesqueleto de 56 kDa), proteína relacionada ao hormônio da paratireóide (PTHrP), complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I), fator nuclear κ B (NF- κ B), influenciando não apenas na produção de citocinas, mas também na resposta celular a essas (FRANCHINI, 1995; ALEFANTIS et al., 2005 A).

Tax liga-se diretamente a proteína de ligação ao TATAbox (TBP; CARON et al., 1993) promovendo o início da transcrição e a alongação da RNA polimerase (CHING et al., 2004), sendo também capaz de aumentar a expressão de inibidores de reparo da excisão de nucleotídeos e apoptose (YOSHIDA et al., 2001 e YOSHIDA, 2005), reprime a expressão de genes celulares envolvidos no reparo da fita de DNA, na apoptose, genes relacionados com a supressão de tumores e com a atividade de prova (“checkpoint”) das células infectadas (GRASSMANN et al., 2005 e YOSHIDA, 2005).

Outra proteína que tem grande importância no ciclo viral é a proteína Rex, uma fosfoproteína nuclear de 27 kDa que atua como um regulador pós-transcricional viral, sendo essencial no ciclo de replicação viral, por controlar o processamento e transporte do mRNA, promovendo assim a

tradução de mRNAs não processados, responsáveis pela produção das proteínas Gag/Pol, e mRNAs simples processados, que codificam as proteínas Env (KASHANCHI & BRADY, 2005). Em contrapartida, possui um efeito negativo no processamento e transporte dos mRNAs de duplo processamento que codificam a própria proteína Rex, Tax e outros mRNAs com processamento alternativos (FRANCHINI, 1995).

Contudo, as proteínas regulatórias, Tax e Rex, não apenas regulam a expressão dos genes virais, mas também interferem no funcionamento celular do hospedeiro em diferentes fases, através de modificações diretas ou indiretas na transcrição e tradução de genes celulares, sendo importantes na patogênese das doenças associadas ao HTLV (FRANCHINI, 1995; YOSHIDA et al., 2001; ALEFANTIS et al., 2005 B; GRASSMANN et al., 2005; KASHANCHI AND BRADY, 2005; e YOSHIDA, 2005).

1.2.2 Tropismo celular

O HTLV-1 infecta preferencialmente células linfóides T periféricas, principalmente linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+ (GRANT et al., 2002), como também outras células hematopoéticas (linfócitos B, monócitos, macrófagos, células dendríticas, megacariócitos e Células T), células da glia (astrócitos e células da microglia; HANON et al., 2000; GRANT et al., 2002; MANEL et al., 2005) e células da linhagem sinovial (YIN et al., 2000). Hieshima e colaboradores (2008) trabalhando com ensaios de quimiotaxia e PBMC comprovaram que o sobrenatante de células T infectadas pelo HTLV-1 seletivamente atraíram células CCR4+/CD4+ e, em experimentos de cocultivos de PBMC com células infectadas pelo HTLV-1, células T CCR4+CD4+ aderiram significativamente às células infectadas expressando Tax. Neste estudo foi observada a redistribuição de CCR4 na região de contato célula-célula, o que foi acompanhado em alguns casos por uma reorganização dos microtúbulos, indicando formação de sinapse virológica e uma transmissão preferencial do HTLV-1 para células TCCR4+/CD4+.

1.2.3 Ciclo de Replicação

O ciclo de replicação do HTLV é comum aos retrovírus (figura 1.3). A penetração ocorre pela interação entre o receptor celular GLUT-1 e a porção amino-terminal da glicoproteína gp46 do envelope viral levando a uma mudança conformacional, que expõe a proteína transmembrana gp21, permitindo assim a fusão entre a membrana celular e viral e a entrada do vírus no citoplasma (MANEL et al., 2005; KIM et al, 2004). Dentro do capsídeo, ocorre a transcrição do RNA em cDNA mediada pela enzima transcriptase reversa, a partir do iniciador o tRNA_{pro}, originando uma fita simples de DNA. Logo, esta é duplicada e transportada para o núcleo celular, integrando-se ao genoma da célula pela ação da enzima integrase, formando o provírus (CANN e CHEN, 1996, MANEL et al, 2004).

O processo de integração do provírus marca o final da fase precoce do ciclo de multiplicação viral e o início da fase tardia que é mediada por enzimas do hospedeiro. A enzima celular RNA polimerase II é responsável em transcrever o genoma viral integrado, produzindo RNA viral. A partir do RNA viral produzido é transcrito uma fita primária precursora dos RNA mensageiro e RNA genômico. Os precursores das proteínas Gag e de Gag-Pol são produzidos por ribossomos livres no citoplasma, mas, as glicoproteínas do envelope são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e em seguida são transportadas para o complexo golgi sendo expostas na superfície da membrana celular. A partir do processo de montagem e brotamento, que ocorre o processamento dos precursores de Gag e Gag-Pro-Pol, sendo que estes só são clivados no processo de montagem (GOFF et al., 2001; MANEL et al., 2004). Assim, os precursores do capsídeo são transportados à membrana por interações com o citoesqueleto celular ou por exocitose, onde ocorre o processamento proteolítico das proteínas (COFFIN, 1996). O empacotamento do RNA genômico ocorre devido à presença de sequências específicas na terminação 5', denominadas sequências de empacotamento ou regiões *Psi*. No processo de montagem do nucleocapsídeo, as glicoproteínas são exportadas para a membrana plasmática da célula, interagem com o cerne viral ocorrendo o brotamento e a maturação dos virions. A maturação é um processo complexo, necessário para a formação da partícula infecciosa, sendo que ocorre um processo proteolítico das proteínas do CA, obtendo-se a partícula viral madura, capaz de infectar novas células (GOFF et al, 2001, MANEL et al, 2004; MANEL et al., 2005).

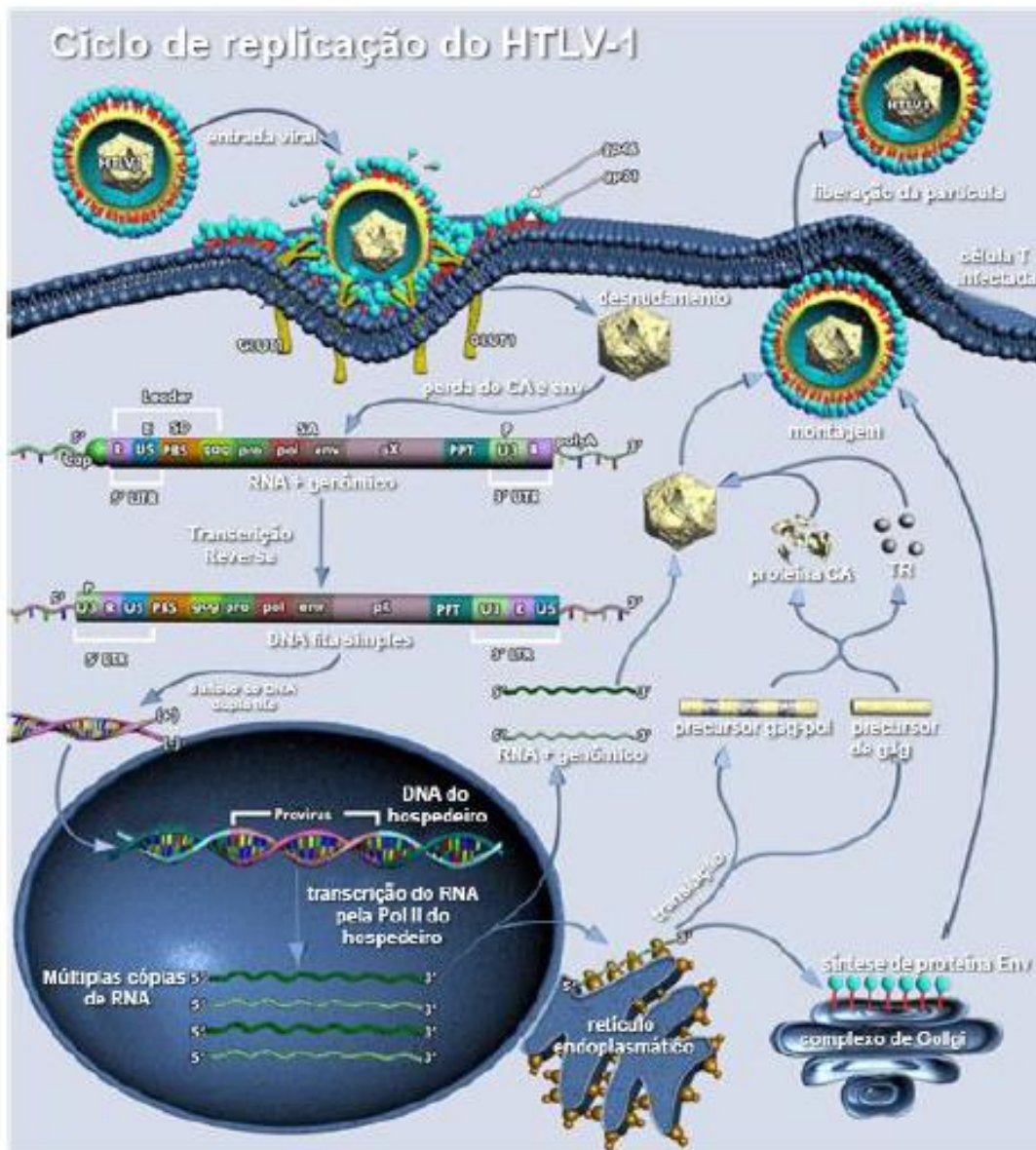


Figura 1.3 – Representação esquemática do ciclo de multiplicação de um retrovírus. O vírus interage com o receptor GLUT-1 e penetra com o capsídeo dentro da célula. Logo, ocorre a transcrição reversa e o cDNA viral é integrado randomicamente na célula, estabelecendo uma infecção permanente. O material genômico viral integrado pode dirigir a produção de proteínas virais e genoma viral para construção de novas partículas virais que sairão por brotamento. Adaptado, QIAGEN, 2009.

Embora o HTLV apresente um ciclo de replicação típico dos retrovírus observa-se a indução de sinapses viral, sendo esta a forma predominante de espalhamento viral (figura 1.4). Assim, ocorre interação das proteínas virais com receptores celulares permitindo o contato entre as células, associado à polarização do citoesqueleto transferindo o vírus de uma célula infectada para uma célula não infectada. Além do mais, concomitantemente com a divisão mitótica o DNA proviral do

HTLV sofre expansão clonal (OVERBAUGH et al., 2001; IGAKURA et al, 2003; BANGHAM et al, 2003). Desta forma, o vírus se replica em baixas taxas diminuindo a chance de erro da transcriptase, levando a elevada estabilidade genética das sequencias de HTLV dentro das populações.

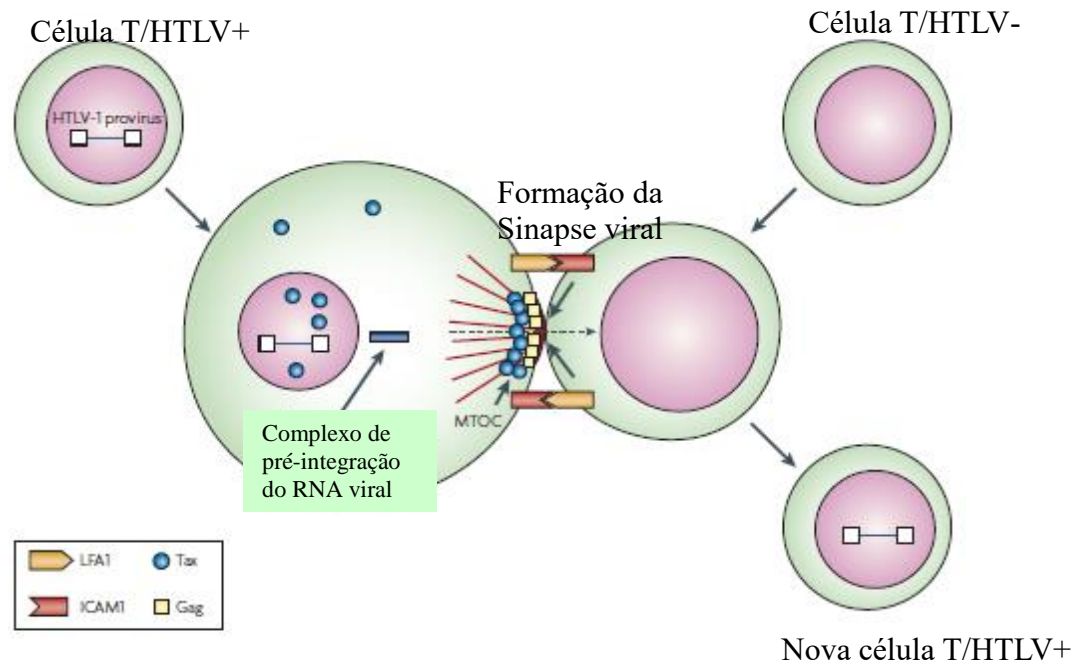


Figura 1.4: Transmissão do HTLV-1 através de sinapse virológicas. Fonte: Adaptado de IGAKURA et al, 2003.

As células infectadas pelo HTLV-1 através do contato célula a célula cria uma ponte de transmissão viral, conhecida como sinapse viral. As moléculas LFA1 (antígeno 1 de função associada ao linfócito), ICAM1 (molécula de adesão) e Tax participa do processo, sendo que Tax contribui para a formação do centro de organização de microtúbulos (MTOC). Fonte: MATSUOKA & JEANG, 2007.

1.2.4 Formas de Transmissão

O HTLV pode ser transmitido principalmente, pela via vertical, através da amamentação e intercuro sexual e pela via parenteral por transfusões sanguíneas e compartilhamento de agulhas e seringas contaminadas com o vírus (KOMURO et al., 1983; OKOCHI et al., 1983; CHEN et al., 1991; HINO et al., 1995; KAPLAN et al., 1996; FUJINO et al., 2000; ROUCOUX et al., 2005). A

mais natural rota de transmissão do HTLV-1 é através de mães infectadas que amamentam seus bebês resultando na transmissão de linfócitos infectados via leite, sendo esta transmissão influenciada pelo tempo do aleitamento. Assim, crianças de mãe soropositivas que foram amamentadas por menos de 6 meses (TAKEZAKI et al., 1997) ou que foram alimentadas com mamadeiras (HINO et al., 1996) exibem baixas taxas de soroconversão. Outra possibilidade de transmissão, menos expressiva, é por via uterina através de células provenientes do cordão sanguíneo ou placenta (FUJINO et al., 2000), esse fato é devido em parte pelo mecanismo de proteção presente na placenta, que desencadeia a apoptose ou morte programada como forma de defesa frente a uma infecção (FUJINO et al., 1999).

1.2.5 Diagnóstico da infecção pelo HTLV1/2

No Brasil, a portaria nº 1376 do Ministério da Saúde determinou a triagem obrigatória sorológica de doadores de bancos de sangue, a partir da década de 90. Recentemente, foi promulgada a lei estadual nº 17344, de 15 de Janeiro de 2008, em Minas Gerais, que garante ao cidadão ter acesso, mediante solicitação médica, a realizar gratuitamente testes sorológicos para o diagnóstico da infecção pelo HTLV-1/2, oferecidos em laboratórios de saúde pública.

O diagnóstico sorológico baseia-se na detecção de anticorpos específicos contra o HTLV, sendo realizado em duas etapas principais, a triagem e a confirmação (CONSTANTINE, 1993; ERICHSEN et al, 2009). Na primeira etapa são utilizados testes com elevada sensibilidade, como os ensaio imunoenzimáticos, incluindo o ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) e ensaios de aglutinação, onde partículas de gelatina e/ou látex sensibilizadas com antígenos virais inativados aglutinam-se devido à presença no soro ou plasma anticorpos anti-HTLV (não utilizado no Brasil; FUJINO et al., 1991). Ambos testam a presença de anticorpos contra o vírus, e os antígenos comumente utilizados para esses testes são lisados virais do HTLV-1 e HTLV-2 e proteínas recombinantes derivadas dos genes *env* e *gag* (BRASIL, 2004). Contudo, esses testes de triagem podem gerar resultados falso-positivos e não são capazes de distinguir entre HTLV-1 e HTLV-2, sendo assim necessário o teste confirmatório (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002; ERICHSEN et al, 2009).

Os testes empregados para confirmação do diagnóstico possuem elevada especificidade, sendo que o mais utilizado é o *Western Blot* (WB) (LAL et al., 1993). A amostra é considerada positiva, segundo a Organização Mundial da Saúde, pela reatividade de uma proteína da região *gag* e uma proteína do envelope viral, e quando uma amostra reage somente com uma das bandas, o resultado é “indeterminado”. A causa dos testes de WB indeterminados não está clara e, os resultados inconclusivos na testagem de HTLV constitui um desafio para os bancos de sangue e aconselhamento familiar. Na população em geral o WB indeterminado nem sempre significa infecção pelo HTLV, porém, em populações de alto-risco e áreas endêmicas, este resultado pode representar uma soroconversão em curso (ANDRADE et al, 2010; MARTINS et al, 2010). Alguns resultados indeterminados para o HTLV-1 podem ser devido à infecção com vírus defectivos, baixa carga proviral em portadores assintomáticos ou ocorrer em indivíduos infectados pelo HTLV-2 (MONTANHEIRO et al, 2005). Em áreas endêmicas resultados inconclusivos e indeterminados podem variar de 0.02 a 50% (WATERS et al, 2001). Em certos casos, a confirmação e a discriminação não são possíveis através da utilização do *Western Blot*, logo se utilizam testes moleculares (CONSTANTINE, 1993).

Os testes moleculares detectam a presença dos ácidos nucléicos virais, DNA proviral pela utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) que se baseia na amplificação exponencial do DNA alvo, sendo um teste com alta sensibilidade e especificidade que permite esclarecer estados sorológicos indeterminados por *Western Blot*, “status” de infecção, avaliação da transmissão neonatal, diferenciação entre HTLV-1 e HTLV-2 ou da definição de subtipos virais, e detecção da infecção durante o período compreendido entre a exposição e a soroconversão (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002; ANDRADE et al, 2010, COSTA et al, 2011).

Em Hemocentros do Brasil (ANVISA, resolução da Diretoria Colegiada – RDC 153, de 14 de julho de 2004), utiliza-se como teste de triagem sorológica para o HTLV-1 e HTLV-2 o teste ELISA e como teste confirmatório o WB (ERICHSEN et al., 2009).

1.3 RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO NO CONTEXTO DA INFECÇÃO PELO HTLV-1

O sistema imunológico é uma rede complexa de fatores celulares e moleculares, que buscam manter a integridade do organismo ao ataque de patógenos e substâncias estranhas ao corpo, distinguindo o próprio do não próprio e modulando as respostas dos seus agentes efetores (FLAJINIK, Du PASQUIER, 2004; JANEWAY, MEDZHITOV, 1998; MAYO et al, 2012). Classicamente, dois tipos de resposta imune têm sido definidos: a resposta imune inata e resposta imune adaptativa (JOURNO, MAHIEUX, 2011). A combinação desses dois sistemas permite ao organismo hospedeiro reconhecer e eliminar patógenos, assim como proteger contra possíveis re-infecções. A imunomodulação desse sistema é de extrema importância e funções anormais podem levar ao desenvolvimento de doenças (FLAJINIK, Du PASQUIER, 2004; JANEWAY, MEDZHITOV, 1998; MAYO et al, 2012).

No contexto da infecção pelo HTLV-1, observa-se que a infecção produtiva é capaz de ativar os linfócitos, levando ao desencadeamento de mecanismos variados de resposta imune celular e humoral. Entretanto, o sistema imune do hospedeiro não é capaz de eliminar o vírus do organismo dos indivíduos exposto, mas pode ser determinante no curso dos quadros clínicos. Neste contexto, diversos estudos vêm sendo realizados sobre o papel do sistema imunológico na proteção do indivíduo contra a infecção e/ou o seu papel na instalação da doença, buscando correlacionar os diferentes fatores envolvidos no mecanismo de imunoproteção/imunopatogênese com o desenvolvimento de formas clínicas e os mecanismos relacionados à permanência de portadores no estágio assintomático (BANGHAM et al., 2003; BANGHAM et al., 2005).

Acredita-se que o sistema de defesa do organismo contribui com eventos imunoprotetores, levando ao controle da infecção através do equilíbrio entre o vírus e o hospedeiro e assim mantendo o indivíduo infectado como portador assintomático. Em contra partida, a infecção pelo vírus pode alterar aspectos centrais da resposta imune criando um processo de autoagressão, desequilíbrio do sistema imune, através de mecanismos antivirais e imunopatológicos (BANGHAM et al., 2005; SAITO, BANGHAM, 2012).

A infecção pelo HTLV-1 é marcada por uma forte resposta imune celular, com a participação de linfócitos T citotóxicos vírus específicos, sendo que estes reconhecem principalmente a proteína Tax, seguido de epítomos das proteínas Gag, Env e outros produtos gênicos não estruturais (p30, p12 e p13; JACOBSON et al., 1996; PIQUE et al., 2000).

Os linfócitos T CD4⁺ representam o principal reservatório do vírus no organismo, sendo que, expressam epítomos virais ativando os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos, além de espontaneamente secretarem citocinas proinflamatórias e neurotóxicas (TNF- α , INF- γ , GM-CSF). Os linfócitos T CD4⁺ modulam a resposta das células T CD8⁺ antivirais, regulando a resposta imune contra si e contra as células CD8⁺ infectadas, alterando assim o papel das células CD8⁺ citotóxicas, como a otimização da ação dos CTL CD8⁺. Estudos em pacientes HAM/TSP verificaram que altos níveis destas citocinas são encontrados nas lesões do cordão espinhal e no CSF, que células T CD4⁺ são predominantes em infiltrados no SNC, sugerindo que os linfócitos CD4⁺ participam dos mecanismos de imunopatogênese relacionados às manifestações clínicas da Mielopatia conseqüente a infecção pelo vírus (HANON et al., 2000; GOON et al., 2002; GOON et al., 2004; BANGHAM et al., 2005).

Chung e colaboradores (2003), adicionalmente, relataram a presença de citocinas, como IL-9 e IL-13, que atuam como auxiliares no desenvolvimento do quadro neurológico, devido ao fato da persistente e elevada produção destas citocinas em células T. A IL-13, também, correlaciona-se diretamente com o nível de expressão da proteína Tax em células T CD4⁺ recentemente infectadas.

Quanto aos linfócitos T citotóxicos, diferentes estudos vêm sendo realizados no intuito de entender a funcionalidade destas células e até onde elas participam da patogênese e/ou da manutenção dos indivíduos como assintomático. Dados demonstram a ocorrência de altas taxas de linfócito T citotóxico (CTL) HTLV-1 específicos no líquido e no sangue, devido à expansão induzida pelo vírus (GRANT et al., 2002; JACOBSON et al., 2002), respondendo, principalmente, aos antígenos produzidos pelo gene *tax*, p27x e p40x. Embora as CTL sejam encontradas no PBMC (JACOBSON et al., 2002) de portadores assintomáticos, a magnitude e a frequência destas são aumentadas nos pacientes que desenvolvem a doença neurológica, aliados a produção de diferentes citocinas

essenciais para a manutenção da resposta inflamatória (GRANT et al., 2002; JACOBSON et al., 2002).

Nos indivíduos que desenvolvem a HAM/TSP há um aumento significativo das células T CD8⁺ efectoras e de memória específicas para a proteína Tax (YAMANO et al., 2002; GOON et al., 2004) e a diminuição de células T “naive” (NAGAI et al., 2001) em relação aos indivíduos portadores. Diferentes fatores correlacionados como a alta carga proviral, mantida pela produção de vírus persistente e por divisão mitótica (BANGHAM et al., 2005; ASQUITH et al., 2005; TAYLOR, 1998), altos títulos de anticorpos no líquido cerebrospinal e no soro, devido à proliferação de células infectadas que desencadeiam uma intensa imunidade celular anti-HTLV-1 (OSAME et al., 1986; CAVROIS et al., 2000; JACOBSON, 2002), aumento na produção de citocinas (IFN- γ e TNF- α ; TAYLOR, 1998; RIBAS et al., 2002 A) e quimiocinas pró – inflamatórias (BRITO-MELO et al., 2004), além do aumento da linfoproliferação espontânea (SANTOS et al., 2004), podem estar interligados com o desenvolvimento do processo neurodegenerativo nos indivíduos infectados. Entretanto os processos relacionados ao progresso da HAM/TSP não estão totalmente elucidado.

Na busca de entender até onde a resposta imune celular conferida pelos linfócitos citotóxicos proporciona proteção evitando o desenvolvimento da HAM/TSP e quando este começa a desencadear danos, Asquith e Bangham (2002) propuseram uma teoria conciliadora, baseando-se na carga proviral. Deste modo, através de diferentes estudos eles determinaram um limiar a partir da observação da magnitude da carga proviral, capaz de correlacionar as mudanças das respostas imunes com o dano no organismo. Assim, quando a carga proviral do indivíduo estiver abaixo do limiar, os TCR das células T CD8⁺ ainda são capazes de lisar as células infectadas, aliado com a baixa estimulação antigênica e consequente baixa produção de IFN- γ o organismo desencadeia uma resposta protetora. Já quando a carga proviral se eleva de tal forma que atravessa este determinado limiar, o estado de ativação das células citotóxicas se modifica, de tal modo que o perfil de lise não se altera, mas a produção de IFN- γ eleva-se rapidamente. Desta forma, as células T CD8⁺ são ativadas como um todo, alterando o seu papel de puramente protetora das infecções intracelulares para o papel protetor e patogênico.

Em relação à resposta humoral, os primeiros anticorpos específicos anti-HTLV-1 produzidos pelo sistema imune são parcialmente protetores, sendo eles dirigidos contra a proteína Gag, permanecendo nos dois primeiros meses, seguidos pelo aparecimento de anticorpos contra a proteína do envelope (MANNNS et al., 1991). Posteriormente, acima de 50% dos indivíduos infectados produzem anticorpos contra a proteína Tax (MUELLER et al., 1996). Estes anticorpos específicos estão correlacionados intimamente com a infecção e patogênese do HTLV-1 (LEVIN et al., 2002).

Estudos relatam a presença aumentada de anticorpos anti-HTLV-1 nos indivíduos infectados por este retrovírus, sendo que em pacientes com HAM/TSP os níveis de imunoglobulinas, principalmente para a proteína Tax são significativamente mais elevados (JACOBSON et al., 1990; KAPLAN et al., 1990; LEVIN et al., 2002; BRITO-MELO et al., 2003; LEE et al., 2006; SOUZA et al., 2010). Lee e colaboradores demonstraram, em 2006, que os anticorpos anti-Tax estão diretamente correlacionados com um componente auto-imune, contribuindo para a progressão do quadro neuroinflamatório. Eles sugeriram um modelo de mimetismo molecular, em que anticorpos anti-Tax do HTLV-1 reconhecem a ribonucleoproteína nuclear AI (hnRNP A1) expressa em neurônios do Sistema Nervoso Central (SNC), logo, esta reação cruzada impede o disparo do estímulo nervoso nas células afetadas.

1.3.1 Resposta imune inata

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa contra patógenos microbianos, sendo que os mecanismos de defesa já estão estabelecidos antes do encontro com o antígeno. Assim, a resposta gerada é rápida, mas transiente e pouco específica (JOURNO, MAHIEUX, 2011). Os principais componentes da imunidade inata são as barreiras físicas e química, como o epitélio e substâncias anti-bacterianas produzidas nas superfícies epiteliais; células fagocitárias como neutrófilos, macrófagos e células *natural killer* (NK); proteínas presentes no sangue, incluindo proteínas do sistema complemento e outros mediadores da inflamação; e citocinas que regulam e coordenam várias das atividades desempenhadas pelas células da imunidade inata (BEUTLER, 2004).

O sistema imune inata inicia pelo reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) pelos receptores de reconhecimento de padrão (PRR) sendo assim, capaz de reconhecer os patógenos microbianos, distinguir o próprio do não próprio, estimular as respostas pró-inflamatórias pela via de ativação de NF- κ B ou via MAP-kinases (JNK, p-38, ERK), ativar o sistema complemento, cascatas de coagulação, opsonização, fagocitose e indução da apoptose (JANEWAY, 1989; MEDZHITOV, JANEWAY, 1997; JANEWAY, 1989; MEDZHITOV, 2001; ZHANG et al, 2006; HARRINGTON et al, 2007). Funcionalmente os receptores, podem ser divididos em secretores, endocíticos e sinalizadores (MEDZHITOV et al, 2007). Atualmente, são descritos diferentes receptores de reconhecimento de padrão, como: receptores do tipo *Toll*, receptores do tipo RIG –I, receptores do tipo NOD (AKIRA, TAKEDA, 2004; MEDZHITOV, 2001; STROBER et al, 2006), receptores do tipo lectina (p.e. manose e b- glucanos) e receptores do tipo *scavengers* (CERDA, 2009) (quadro 1.2).

Os receptores *Toll-like* (TLRs) compreendem uma família de receptores de membrana tipo I, caracterizados pelo domínio extracelular LRR (repetições ricas em leucinas) e um domínio intracelular TIR (receptor *Toll/IL-1*) (TAKEDA, AKIRA, 2003). A ativação de vias de transdução de sinal através dos TLRs desencadeia a indução de diferentes genes de defesa do hospedeiro. Os TLR são estimulados por seus ligantes que recrutam proteínas adaptadoras específicas como: MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), MAL/TIRAP (*MyD88-adaptor like/TIR-associated protein*), TRIF (*Toll-receptor-associated activator of interferon*), TRAM (*Toll-receptor-associated molecule*) e SARM (*Sterile α - and armadillo-motif containing protein*) (DUIN et al, 2006). Essas proteínas adaptadoras transduzem o sinal do TIR, ativando quinases e fatores de transcrição como NF- κ B e IRFs (*IFN-responsive factors*). Os genes transcritos são correlacionados com a resposta pró-inflamatória, responsáveis pela produção de moléculas efetoras, citocinas pró-inflamatórias, complexo principal de histocompatibilidade (MHC), interferons do tipo I, quimiocinas, expressão de moléculas co-estimuladoras, entre outros mediadores envolvidos no controle de patógenos e na indução da resposta imune adaptativa (DUIN et al., 2006; MEDZHITOV, 2001; TAKEDA, AKIRA, 2003; THOMA-USZYNSKY et al, 2001).

Os receptores citosólicos tipo NOD-LRR ou NLR (receptores de domínio de nucleotídeos de oligomerização – repetições ricas em leucinas) são proteínas formadas essencialmente por três

domínios, sendo um domínio efetor N-terminal variável, um domínio central do tipo NOD e uma porção C-terminal com seqüências ricas em leucina (LRR). O reconhecimento de PAMPs induz uma cascata de ativação do fator de transcrição NF- κ B ou da protease caspase-1. A via NF- κ B induz a transcrição de inúmeros genes, responsáveis pela produção de diferentes moléculas efetoras e a caspase-1 é uma protease intracelular necessária para a secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 e IL-18. Sendo que, a ativação da caspase-1 induz a morte de macrófagos infectados, por um processo denominado piroptose, indicando um mecanismo de resistência e controle da disseminação de patógenos (BROZ et al., 2010; MARTINON et al, 2009). Já os receptores RLR (receptores tipo RIG – Receptor do ácido retinóico indutível) são receptores que interagem com ácidos nucléicos, como o RNA viral (MARTINON et al, 2009; PICHLMAIR et al, 2006) desencadeando a transcrição de interferon tipo I e citocinas inflamatórias (KAWAI, AKIRA, 2008).

Quadro 1.2: Receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) e seus ligantes

Receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) e seus ligantes	
Receptores	Ligantes
<i>TLR</i>	
TLR1 + TLR2	Triacil lipopeptídeos, glicofosfatidilinositol
TLR3	Zimosan
TLR4	RNA de dupla fita
TLR5	Lipopolissacarídeo
TLR6 + TLR2	Flagelina
TLR7	Diacil lipopeptídeos
TLR8	RNA de fita simples
TLR9	DNA, hemozoína – malária
TLR10	Desconhecido
TLR11	Proteína profilina
<i>NOD-like</i>	
NOD 1	Peptídeoglicano
NOD 2	Peptídeoglicano
NOD 3	RNA de bactéria, ATP, ácido úrico
<i>RIG-like</i>	
<i>RIG-I-like</i>	Ácido nucléico – RNA
<i>MBL</i>	
MBL	Carboidratos

Adaptado de DUIN et al., 2006; MEDZHITOV, 2001; TAKEDA, AKIRA, 2003; THOMA-USZYNSKY et al, 2001.

Atualmente, estudos vêm demarcando a importância do sistema imune inato na infecção pelo HTLV-1. Banerjee e colaboradores (2007) demonstraram que a atividade citolítica de células NK em pacientes com HAM/TSP foi significativamente diminuída se comparada ao grupo controle e que a infecção pelo HTLV-1 leva as células T CD4+ primárias a escapar da citotoxicidade mediada pelas células NK através da proteína p12, a qual modula negativamente a expressão de ICAM-1 e 2 na superfície das células infectadas, resultando em uma aderência reduzida das células infectadas às células NK. Em outro grupo de indivíduos HTLV+ com manifestações neurológicas e neoplásicas foi observado nas PBMCs diminuição e comprometimento funcional das células NK, células dendríticas e células iNKT, e em comparação, os portadores assintomáticos apresentaram alteração funcional celular quando comparados ao controle negativo (HTLV-) (SATO et al, 2011).

As células dendríticas mieloides e plasmocitoides vêm sendo descritas como susceptíveis à infecção pelo HTLV-1 (ALI et al, 1993; JONES et al, 2008). As células dendríticas infectadas podem rapidamente transferir o vírus para células T CD4+ autólogas e em comparação, as células CD4+CD25+, as células dendríticas são as principais células responsáveis pela geração e manutenção *in vitro* e *in vivo* de células TCD8+ Tax-específicas (MANUEL et al, 2009). Outras células hematopoiéticas do sistema imune inato também podem ser infectadas pelo HTLV-1 como os neutrófilos e os monócitos (RICHARDSON et al, 1990; KOYANAGI et al, 1993; KORALNIK et al, 1993). Os neutrófilos em portadores do HTLV-1 sofrem ativação espontânea, sendo que esta ativação é significativamente maior nesses indivíduos do que em indivíduos HTLV – (GUERREIRO et al, 2005).

Em relação aos monócitos, relatos descrevem que uma pequena quantidade destas células é infectada com HTLV-1 no sangue periférico (KOYANAGI et al, 1993). Entretanto, estudos patológicos confirmam que a presença de macrófagos/monócitos infectados ou ativados juntamente com células TCD4+ e TCD8+ no SNC possui um papel regulatório do sistema imune, além de ser importante na patogênese de HAM/TSP (UMEHARA et al, 1993; IZUMO et al, 1997; ABE et al, 1999; ENOSE-AKAHATA et al, 2012).

No contexto da infecção pelo HTLV-1 já foi demonstrado que a proteína viral p30 (codificada pela ORF II da região pX – responsável pela modulação transcricional viral e pela interação com CBP e p300) inibiu a expressão de TLR-4 na superfície celular de macrófagos, prejudicando a liberação de citocinas pró-inflamatórias MCP-1, TNF- α e IL-8, e estimulando a liberação da proteína anti-inflamatória IL-10 (DATTA et al, 2006).

1.4 DOENÇAS ASSOCIADAS AO HTLV

O HTLV foi o primeiro retrovírus reconhecido como entidade patológica humana. As principais síndromes associadas ao HTLV-1 são a ATL (POIESZ et al., 1980; HINUMA et al., 1981; YOSHIDA et al., 1984; TAKATSUKI et al., 1985) e a HAM/TSP (GESSAIN et al., 1985; RODGERS-JOHNSON et al., 1985; OSAME et al., 1986). Outras entidades clínicas, associadas

ao vírus já foram descritas, são elas: uveíte, tireoidite, dermatites, polimiosite, pneumonia bronco-alveolar, artropatias e Síndrome de *Sjögren* (VERDONCK et al., 2007).

1.4.1 Leucemia/Linfoma das Células T de Adulto (ATL)

A ATL foi a primeira neoplasia humana relacionada a um retrovírus (UCHIYAMA et al., 1977), sendo reconhecida mundialmente como uma patologia clínica (TAKATSUKI et al., 1977). A ATL acomete 2-4% dos portadores do HTLV-1 (KHABBAZ, 1993; ABOULAFIA, 1995; HÖLLSBERG, 1995), apresenta progressão lenta, entre 20-30 anos após a infecção, afetando principalmente adultos, sendo que, indivíduos infectados por transmissão vertical, apresentam maiores riscos de desenvolverem essa patologia (PAWSON et al., 1998). Os determinantes para a progressão da patogênese podem estar relacionados com variantes genéticas virais, características do hospedeiro ou do ambiente (PROIETTI et al., 2005), altos títulos de anticorpos anti-HTLV e baixa reatividade anti-Tax (HISADA et al., 1998) além de um co-fator apontado como facilitador do desenvolvimento do ATL, a co-infecção com *Strongyloides stercoralis*, (POMBO DE OLIVEIRA et al., 1995).

Essa patogênese engloba um amplo espectro de sintomas que compreende linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, aumento dos linfonodos, febre, indisposição, icterícia, sonolência, perda de peso, lesões de pele (nódulos, placas ou uma erupção papular generalizada), ausência de massa mediastinal, células leucêmicas com pleomorfismo, núcleo lobulado (*flower cell*) e leucocitose (UCHIYAMA et al., 1977; BANGHAM et al., 2005).

O espectro de doenças do ATL é classificado em quatro subtipos clínicos: indolente (*smouldering*), crônica, aguda e linfomatosa, de acordo com o número de células T anormais no sangue periférico, nos níveis de desidrogenase láctica, nas lesões tumorais em diversos órgãos e no curso clínico do paciente (TAKATSUKI et al., 1992; YAMAGUCHI et al., 1993). A forma aguda compreende 55-75% dos casos de ATL e a forma crônica e cutânea cerca de 25% (HANCHARD et al., 1990; YAMAGUCHI et al., 1990).

1.4.2 Mielopatia Associada ao HTLV-1/ Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP)

Em um centro de neurologia da Jamaica e Martinica, foram feitas observações clínicas que revelaram a prevalência incomum de paraplegia espástica ou esclerose lateral primária, processos debilitantes de curso lento, disfunção sensorial e esfinteriana e relação de agrupamento entre os casos (CRUIKSHANK, 1956; RODGERS, 1965), sendo que estes aspectos foram posteriormente associados com um processo patológico desencadeado pelo HTLV-1. No ano de 1985, foram contatados pacientes na Jamaica, Colômbia (RODGERS-JOHNSON et al, 1985) e na Martinica (GESSAIN et al, 1985), que apresentavam Paraparesia Espástica Tropical (TSP) e anticorpos anti-HTLV-1. Em 1986 no Japão, um quadro clínico semelhante à TSP foi descrito, os pacientes apresentavam anticorpos anti-HTLV-1, o qual foi chamado de Mielopatia Associada ao HTLV-1 (HAM; OSAME et al., 1986). Em 1988, essas distintas patologias foram reconhecidas como uma única, e então denominada como HAM/TSP.

A prevalência de HAM/TSP entre os indivíduos infectados pelo HTLV-1 é em torno de 4%, existindo uma predominância nas mulheres (ORLAND et al, 2003). Após a infecção, o tempo da manifestação da sintomatologia é variável, podendo ser de poucos meses como na infecção via transfusional (OSAME et al., 1986; BUCHER et al., 1990), ou principalmente de décadas, entre 40 a 50 anos depois do contágio (PROIETTI et al., 2005).

A patologia de HAM/TSP caracteriza-se clinicamente por distúrbios na marcha, fraqueza muscular, enrijecimento dos membros inferiores, comprometimento do equilíbrio dinâmico, hiperreflexia, espasticidade nas extremidades inferiores, bexiga neuropática, impotência e diminuição da libido, distúrbios sensoriais (formigamentos, agulhadas e queimação) e esfinterianos e constipação intestinal (RIBAS & MELO, 2002).

Histologicamente observa-se um processo inflamatório devido à infiltração linfocitária, sendo que, os elementos inflamatórios ao longo do processo são substituídos por degeneração da substância branca e reação glio-mesenquimal, acarretando acometimento do neuro-eixo, principalmente da

medula torácica baixa. Evidências demonstram que os linfócitos infectados migram de maneira mais efetiva para o Sistema Nervoso Central (SNC), onde liberam citocinas e fatores neurotóxicos capazes de lesar as células do parênquima, assim induzindo injúrias de forma indireta do tecido nervoso. Os linfócitos T infectados atravessam a barreira hematoencefálica e penetram no SNC devido à sua maior capacidade de adesão (maior expressão de ICAM-1), migração ao endotélio e a permeabilidade paracelular no endotélio, associados com a produção aumentada de TNF- α (GRANT et al., 2002).

O mecanismo patológico que desencadeia a HAM/TSP não está totalmente elucidado, sendo sugeridas três hipóteses: citotóxica, autoimune e processo auto-agressivo. A proposta citotóxica propõe que células da glia podem ser infectadas pelo HTLV-1 e expressar antígenos na superfície celular que irão interagir com linfócitos T citotóxicos CD8⁺ que atravessam a barreira hematoencefálica e liberam citocinas que provocam a morte celular (TAYLOR, 1998; OSAME et al, 1998; OSAME et al, 2002).

Na proposta do processo autoimune argumenta-se que os antígenos próprios das células da glia são semelhantes aos virais e que os linfócitos ao reconhecer os antígenos virais periféricos e migrarem para o SNC desencadeiam uma resposta autoimune que pode levar a morte de células vizinhas. As células “helper” T CD4⁺ reconhecem os antígenos próprios e estimulam a proliferação das células infectadas, contudo as células T específicas destroem peptídeos próprios no SNC por reação cruzada (TAYLOR, 1998; OSAME et al, 1998; OSAME et al, 2002). A terceira teoria, processo auto-agressivo faz alusão aos linfócitos T CD4⁺ infectados e linfócitos T CD8⁺ específicos anti-HTLV-1 que migram através da barreira hematoencefálica para o SNC e liberam citocinas contra os linfócitos infectados danificando as células vizinhas, tais como as células da glia e neuronais (TAYLOR, 1998; OSAME et al, 1998; OSAME et al, 2002).

1.5 TRATAMENTO NO ÂMBITO DA INFECÇÃO PELO HTLV-1

Atualmente, diferentes experimentos estão sendo realizados na busca de drogas e medidas terapêuticas para as manifestações clínicas da infecção pelo HTLV-1. Entretanto, não existe um consenso quanto à terapia específica devido a resultados incipientes e pela falta de um padrão metodológico no desenvolvimento dos ensaios clínicos.

1.5.1 Tratamento de HAM/TSP

Até o momento, não existe terapia específica e com eficácia comprovada para o tratamento do complexo neurológico desencadeado pelo HTLV-1. Diferentes estudos têm correlacionado a patogenia HAM/TSP com eventos imunomediados (ASQUITH e BANGHAM, 2002), assim algumas abordagens terapêuticas utilizam fármacos desenvolvidas para outras doenças imunológicas do sistema nervoso, com o objetivo de diminuir o processo inflamatório (TAYLOR, 1998; SHIMAMOTO et al, 2003; BARRETT et al, 2008).

Neste intuito, diversas abordagens terapêuticas têm sido utilizadas tais como: uso de corticosteróides e plasmaferese (NARUKAWA et al., 2001), gamaglobulinas e interferon (SAITO et al., 2006), azatioprina, danazol, pentoxifilina, vitamina C, heparina e anticorpo monoclonal contra o receptor da IL-2 (MORA et al., 2003). Dentre estas, os corticosteróides que, são os medicamentos anti-inflamatórios mais prescritos, agem tanto na inibição da produção de prostaglandinas quanto na imunoregulação, o que faz diminuir a resposta imune do hospedeiro, com redução da celularidade líquórica, que reflete na diminuição da carga proviral no líquido (ARAÚJO et al., 2006).

Em outra abordagem, a terapia antiretroviral já amplamente testada com sucesso para o HIV-1, como a azidotimidina e a lamivudina, tem sido testada por alguns pesquisadores em pacientes com HAM/TSP (OSAME et al, 2002). Os fármacos antiretrovirais mais utilizados são os análogos de nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa, devido ao grande espectro de ação em diferentes retrovírus (ARAÚJO et al., 2006). Em um estudo no qual foi utilizado a zidovudina em altas doses observou-se melhora no quadro motor de sete entre dez pacientes com HAM/TSP, sendo que o

tratamento foi bem tolerado pelos pacientes (SHEREMATA et al., 1993). Outro estudo no qual foi empregada a combinação de IFN- α e lamivudina, foi observado uma diminuição de dez vezes na carga proviral de pacientes portadores de HAM/TSP (BAZARBACHI, HERMINE, 2001). Taylor e colaboradores (2006) observaram que o emprego monoterápico de análogos de nucleosídeos leva a diminuição da carga proviral e a utilização de combinações destes fármacos pode ser mais efetiva na inibição da transcriptase reversa e conseqüente diminuição da carga proviral.

Os interferons (α e β 1) têm sido também utilizados como terapia medicamentosa no intuito de diminuir os distúrbios motores e esfinterianos dos indivíduos com HAM/TSP (IZUMO et al., 1996). Estas moléculas caracterizam-se como citocinas com ação antiinflamatória, antiviral e de modulação do sistema imunológico, sendo consideradas as citocinas mais importantes no estudo da resposta imune no contexto das infecções virais (TAKAOKA et al., 2006). Nos indivíduos submetidos a esta terapia observa-se boa resposta ao fim do tratamento, tolerância ao fármaco, além de poucos efeitos colaterais em relação ao grupo placebo (IZUMO et al., 1996; NAKAGAWA et al., 1996). Em 2005, Oh e colaboradores avaliaram o uso de interferon- β 1a em pacientes com HAM/TSP, tendo sido observada a melhora dos parâmetros imunológicos, redução na frequência de linfócitos citotóxicos específicos para Tax e dos parâmetros virológicos, além da redução da carga de RNA para a proteína Tax.

Nos pacientes acometidos pela HAM/TSP as repercussões motoras são tratadas de maneira pontual. Assim, o tratamento da espasticidade inclui o baclofeno. O baclofeno é um derivado do ácido gama-aminobutírico (GABA) e atua como agonista de receptores GABA- β pré-sinápticos através da inibição das vias aferentes polissinápticas e monossinápticas dos neurônios motores, sendo amplamente utilizado (BLATTNER, 1990 apud RIBAS; MELO, 2002; GOODMAN & GILMAN et al., 2006). A administração oral necessita de elevadas doses para o efeito terapêutico, em contrapartida a administração intratecal que é realizada com doses menores e com alta eficiência. No entanto, a utilização do medicamento oral é mais difundida (VEIROS et al., 2006). Os derivados de benzodiazepínicos induzem o relaxamento muscular ao ponteciarem os efeitos da GABA sobre os receptores GABA- α , sendo que o diazepam é o mais utilizado.

A dor neuropática tem sido tratada utilizando combinações de fármacos, devido à ineficiência da monoterapia no alívio da dor. Assim, fármacos analgésicos são utilizados juntamente com antidepressivos tricíclicos (amitriptilina, nortriptilina ou imipramina), sendo capazes de potencializar o efeito dos medicamentos analgésicos. Os anticonvulsivantes são alternativas medicamentosas para auxiliar o tratamento de casos com dor persistente (SILVA, 1998 apud RIBAS, MELO, 2002). Além de intervenções medicamentosas, os pacientes são orientados para a realização do tratamento fisioterápico no intuito de auxiliar na reabilitação, aumentando a qualidade de vida e conseqüentemente diminuindo a morbidade da doença (RIBAS e MELO, 2002).

O tratamento sintomático busca a prevenção de contraturas, manutenção da capacidade funcional e o controle das complicações mais comuns associados ao quadro clínico da HAM/TSP. No quadro 1.3 está representado o esquema terapêutico utilizado para o tratamento dos sinais e sintomas presentes nos indivíduos com HAM/TSP do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/ (IPEC-FIOCRUZ).

Atualmente, estratégias adicionais estão sendo empregado para o tratamento da HT, como a utilização da minociclina, um antibiótico que atua inibindo a ativação de monócitos e macrófagos, e, por conseguinte, a ativação de fagócitos mononucleares, células infectadas pelo HTLV-1, linfoproliferação e produção de citocinas inflamatórias por células T CD8+ (ENOSE-AKAHATA et al, 2012). O ácido valpróico (VPA), um inibidor de histonas desacetilases também esta sendo administrado juntamente com AZT, inibidor da transcriptase reversa, utilizados em tratamento anti-HIV (SANTOS et al, 2009; OLINDO et al, 2011). Matsuzaki e colaboradores (2005) em um estudo com probióticos ofereceram aos pacientes HT iorgute contendo *Lactobacillus casei* linhagem Shipora, e observaram uma melhora da espasticidade e dos distúrbios urinários.

Quadro 1.3 – Esquema terapêutico utilizado em pacientes que desenvolvem a HAM/TSP – Tratamento geral.

TRATAMENTO GERAL		
Sintomas	Droga/tratamento/ dose/frequência	Efeitos colaterais comuns
Paresia	Fisioterapia	-----
Espasticidade	Baclofeno* (10-80mg/dia) Diazepan*(5-40 mg/dia) Tizanidina (4-16 mg/dia) Toxina botulínica intramuscular (Individual)	Sonolência Sonolência Sonolência Fraqueza/Hipotonia
Bexiga neurogênica	Oxibutinina (5-15 mg/dia) Imipramina (10-75 mg/dia) Cateterização intermitente (4/4h) (6/6h)	Boca seca/constipação Boca seca/constipação ITU ITU
Constipação intestinal	Orientação nutricional <i>Muciloide psyllium</i> (5,8-17,4 mg/dia) Óleo mineral (7,5 -30 mL/dia) Lactulose (10-30 mL/dia)	Dieta rica em fibras, hidratação, atividade física. Cólica, diarreia Cólica, diarreia Cólica, diarreia
Dor neuropática	Amitriptilina (25-150 mg/dia) Nortriptilina (25-150 mg/dia) Imipramina (25-150 mg/dia) Gabapentina (900-1800 mg/dia) Carbamazepina (400-1200 mg/dia) Oxcarbamazepina (600-1800 mg/dia) Fenitoína (200-300 mg/dia) Duloxetina (60-120 mg/dia) Pregabalina (150-300 mg/dia)	Sonolência/Constipação Constipação/Boca seca Constipação/Boca seca Sonolência Ataxia, apraxia Hiponatremia Ataxia Náuseas Tontura/Sonolência

Adaptado de Araújo et al., 2006; Romanelli et al., 2012.

Contudo, novos estudos longitudinais, controlados e com uma coorte maior são necessários para avaliar o verdadeiro potencial das diferentes classes de fármacos no tratamento do quadro neurológico desencadeado pela infecção do HTLV-1.

1.5.2 Tratamento para ATL

O quadro hematológico desenvolvido pelos indivíduos acometidos pelo HTLV-1 é uma manifestação clínica grave, com prognóstico ruim, tendo uma mediana de vida inferior a 1 ano, mesmo com os avanços terapêuticos. Atualmente, diferentes abordagens terapêuticas têm sido utilizadas na tentativa de aumentar a expectativa e a qualidade de vida dos pacientes com ATL, tais como quimioterápicos, análogos de nucleosídeos, inibidores de topoisomerase, interferons, bloqueadores da via de NF- κ B, antiretrovirais, ácido trans-retinóico, anticorpos monoclonais e transplantes, isoladamente ou combinações (DIAMANTOPOULOS et al, 2012; MAHIEUX, 2006; TAYLOR, MATSUOKA, 2005).

O paciente antes de iniciar a terapia deve ser submetido a uma avaliação que inclui: avaliação da função renal e hepática, cálcio, DHL, albumina, ácido úrico, Linfócito CD4, CD8, CD25, aspiração da medula óssea, exames de imagem (tomografia computadorizada contrastada) para avaliação da extensão do comprometimento, endoscopia digestiva alta (KWEEN et al, 2008).

A quimioterapia utilizando agentes quimioterapêuticos citotóxicos ou citostáticos como ciclofosfamida, adriamicina, vincristina e prednisona é o tratamento padrão para os indivíduos acometidos pela ATL, sendo conhecido como terapia CHOP. Entretanto, a mediana de sobrevivência do paciente é variável (5,5 a 13 meses), dependendo da coorte estudada (YAMADA, TOMONAGA, 2003; TAYLOR, MATSUOKA, 2005; TSUKASAKI et al, 2007).

Assim, a suplementação da quimioterapia padrão com a citocina GM-CSF tem trazido efeitos benéficos ao tratamento, mas estas abordagens não oferecem chance de cura para o quadro hematológico (TAYLOR, MATSUOKA, 2005). Mesmo depois de 30 anos de estudo, não há um padrão ouro proposto para o tratamento da ATL, mas a quimioterapia é importante, pois atua reduzindo a massa tumoral inicial (LOUREIRO & LOPES et al, 2012).

Para o tratamento alternativo da ATL estão sendo utilizados análogos de nucleosídeos e inibidores de topoisomerase, mas com limitada melhora na sobrevida do paciente (TOBINAI, 2004). Em contrapartida, a combinação de análogos de nucleosídeos com interferon- α (IFN- α) resultada em efeitos mais satisfatórios (BAZARBACHI, HERMINE, 1996).

O uso de IFN- α tem sido vastamente empregado em combinações com outros fármacos, especialmente a zidovudina para o tratamento da ATL (TAYLOR e MATSUOKA, 2005). O uso concomitante de IFN- α e zidovudina aumentou a perspectiva de vida dos pacientes para cerca de 18 meses (MATUTES et al., 2001 apud TAYLOR, MATSUOKA, 2005). A associação do IFN- α com trióxido de arsênio trouxe resultados animadores, sendo capaz de inibir a indução da via NF- κ B pela proteína Tax, além de induzir a apoptose nas células ATL (NASR et al., 2003 apud TAYLOR, MATSUOKA, 2005). Chadesris e colaboradores (2009) descreveram em um estudo de caso a remissão completa da ATL após tratamento com citarabina, antraciclina, ácido transretinoico e trióxido de arsênio.

Outra abordagem terapêutica, o uso de anticorpos monoclonais direcionados para marcadores de diferenciação celular de células malignas, possibilita encontrar o alvo e eliminá-lo. Essa terapia permite selecionar moléculas específicas da superfície das células ATL, tais como CD25 e CD52, tendo potencial terapêutico (ZHANG et al., 2003 apud TAYLOR, MATSUOKA, 2005; ISHITSUKA, TAMURA, 2008). Esta modalidade é utilizada no Reino Unido desde a década de 80 por Waldmann, sendo hoje empregada como terapia suplementar associada à quimioterapia CHOP (WALDMANN et al., 1988 apud TAYLOR, MATSUOKA, 2005).

No quadro 1.4 estão representadas as abordagens terapêuticas que foram utilizadas por diferentes pesquisadores, ao longo das três décadas de descobrimento do HTLV, com o objetivo de aumentar o tempo e qualidade de vida do paciente em ATL. Contudo, até o momento, não existe uma terapia que garanta o sucesso no tratamento desta enfermidade, sendo necessárias mais pesquisas de novos fármacos baseados nos mecanismo de leucemogênese.

No contexto do desenvolvimento da ATL, o transplante de medula óssea apresentou-se como uma opção de tratamento apesar da sua alta agressividade (SOBUE et al, 1987). As alternativas de transplantes podem ser: o transplante de medula óssea com regime de condicionamento mieloablativo intensivo, o transplante de medula óssea não aparentado: medula óssea e cordão umbilical, e o transplante de medula óssea alogeneico com regime acondicionamento reduzido para pacientes entre 50 a 70 anos (FUKUSHIMA, 2005).

O fármaco antiretroviral 5-azacitidina, também, esta sendo utilizado no tratamento da ATL. Após tratamento do paciente com o fármaco é observado a remissão de doença hematológica e manifestações auto-imunes (DIAMANTOPOULOS et al, 2012).

Quadro 1.4 – Abordagens terapêuticas utilizadas no tratamento da ATL por diferentes estudiosos.

TRATAMENTO DA ATL			
Terapia	Ano da terapia	Mediana de sobrevivência	Autor
CHOP - ciclofosfamida, adriamicina, vincristina e predinisona.	1982	6 meses	Grupo de estudo Linfoma
Transplante de medula	1987	7 meses	Sobue
CHOP e methotrexate.	1988	6 meses	Shimoyada
Anticorpos monoclonal	1988	-----	Waldmann
Combinações de quimioterápicos	1993	-----	Tsukasaki
Inibidor de Toposoimerase I	1994	-----	Tsuda
Interferon- α e zidovudine	1995	3 meses	Gill
Interferon- α e zidovudine	1995	10 meses	Hermine
Anticorpos monoclonais marcados	1995	-----	Waldmann
CHOP e etoposide, vindesine, ranimustine e mitoxantrone.	1996	8,5 meses	Taguchi
CHOP, interferon- α e zidovudine.	2001	18 meses	Mateus
Vincristina, ciclofosfamida, doxorubicina, predinisona, vindesine, etoposídeos, carboplatina.	2001	13 meses	Yamada
CHOP, interferon- α , zidovudine e etoposide.	2002	17 meses	Besson
Transplante	2005	9,6 meses	Fukushima

Adaptado de TAYLOR, MATSUOKA, 2005.

1.6 COMPOSTO VEGETAL TERPÊNICO E SEU POTENCIAL ANTI-VIRAL E IMUNOMODULADOR.

No contexto do tratamento da infecção pelo HTLV-1, diferentes experimentos estão sendo realizados na busca de fármacos e outras medidas terapêuticas para as manifestações clínicas relacionadas com este retrovírus. Nesse sentido, o estudo de substâncias, provenientes dos vegetais, pode ser considerado um campo amplo e promissor.

Desde a antiguidade, os recursos naturais são utilizados para intervenções terapêuticas, sendo esta prática tão antiga quanto a espécie humana, representando em muitas comunidades e grupos étnicos o único recurso terapêutico (DI STASI, 1996). Atualmente, a prática da fitoterapia tornou-se difundida pelo mundo, sendo reconhecida, em parte, a importância da medicina tradicional e da identificação de plantas medicinais, que possuem potencial de cura no seu estado natural ou como fonte de outros agentes farmacológicos. Desta forma, as plantas medicinais tornaram-se alvo das indústrias farmacêuticas e institutos de pesquisa na busca de novos compostos com atividade terapêutica (ELVIN-LEWIS, 2001; BALUNAS, KINGHORN, 2005).

1.6.1 Terpenos

Os compostos terpenóides (ou terpênicos, ou terpenos, ou isoprenóides) constituem a maior e mais diversa classe de produtos naturais, presentes em diferentes partes dos vegetais (PADUCH et al., 2007). Caracterizam-se como hidrocarbonetos biossintetizados a partir de unidades de isopreno (C_5H_8), sendo que a fórmula básica de todos os terpenos é $(C_5H_8)_n$, onde o “n” é o número de unidades isoprénicas (figura 1.5- A; GAO, SINGH, 1998; PADUCH et al., 2007). Assim, conforme o número de átomos de carbonos os terpenóides podem ser subdivididos em várias classes: hemiterpenóides (C_5), monoterpenóides (C_{10}), sesquiterpenóides (C_{15}), diterpenóides (C_{20}), sestertepenóides (C_{25}), triterpenóides (C_{30}), tetraternóides (C_{40}), poli-isoprenóides (C_n , $n > 45$), entre outras. As unidades de isopreno podem se ligar na ordem “cabeça – cauda”, formando cadeias

lineares (figura 1.5- B) ou podem estruturar formando anéis (cadeia cíclica; figura 1.5 – C; PADUCH et al., 2007).

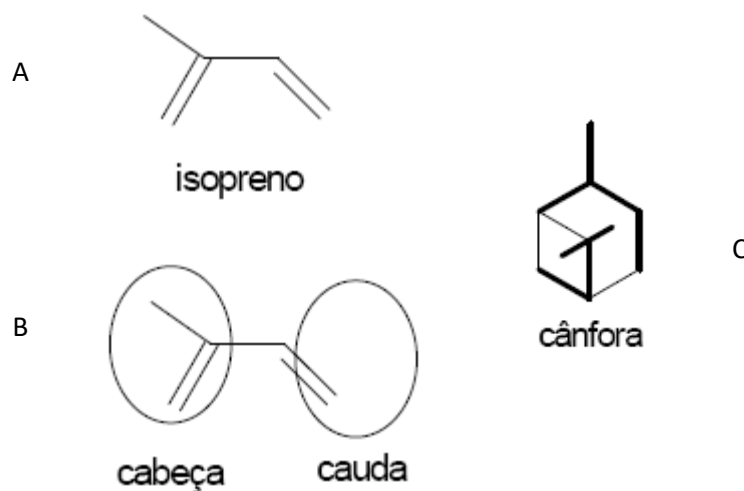


Figura 1.5 – Representação esquemática do isopreno, unidade estrutural dos compostos terpenóides (A), ligação entre as unidades isoprenos na ordem “cabeça-cauda” formando cadeias lineares (B) e exemplo da cadeia cíclica (C).

Os isoprenóides representam uma classe antiga de produtos naturais de baixo peso molecular, provenientes do metabolismo secundário das plantas sintetizados em diferentes organelas citoplasmáticas, como plastos, mitocôndrias e retículos endoplasmáticos, pela atividade enzimática da terpeno-sintase, por exemplo. Sua produção está correlacionada com a função, estado de diferenciação e organização do compartimento celular ao qual está associada (BOUVIER et al., 2005). Nos vegetais, apresentam funções fisiológicas e ecológicas diversificadas, relacionadas com a defesa química, contra insetos e estresse ambiental, atraente e repelente de polinizadores, atividade antimicrobiana, constituinte de hormônios do crescimento, repara de injúrias, aromatizante, entre outras (BOUVIER et al., 2005; SALMINEN et al., 2008).

Os seres humanos ingerem os compostos terpenóides através de diferentes frutas e vegetais, sendo que estes representam o principal constituinte nutricional destes alimentos (WAGNER, ELMADFA, 2003). No organismo, diferentes estudos descrevem que os terpenóides apresentam atividades biológicas variadas, sendo metabolizados e capazes de interagir com diferentes proteínas, como as proteínas regulatórias. Assim, o efeito benéfico destes compostos está sendo

utilizado como ferramenta terapêutica em diferentes doenças humanas (PADUCH et al., 2007; SALMINEN et al., 2008).

Atualmente, os terpenos são reconhecidos por apresentarem atividades antiinflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antiparasitária, hipoglicêmica, antialérgica, imunomodulatória, além de possuir efeitos de quimioprevenção do câncer (BOUVIER et al., 2005; PADUCH et al., 2007; SALMINEN et al., 2008).

Em relação aos mecanismos da atividade antiinflamatória dos compostos terpenóides, existem diferentes possibilidades, tais como a inibição de enzimas pró-inflamatórias (ciclooxigenase - COX-2, lipoxigenase -LOX, óxido nítrico sintase indutível -iNOS), inibição da via de NFκB , inibição da produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) e da produção de citocinas pró-inflamatórias, TNF-α, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, além da inibição da expressão de reguladores do ciclo celular e genes ciclinas, D1, B1, A1, cdc-25, bcl-x e c-jun (ZHAO et al., 2000; PADUCH et al., 2007).

A atividade antiviral tem sido descrita como uma interferência na replicação viral de maneira indireta, alterando mecanismos bioquímicos envolvidos na atividade e ciclo celular, na apoptose, na DNA polimerase viral, bem como na inativação direta do vírus (HARADA, 2005; KHAN et al., 2005; IKEDA et al., 2005). Atualmente, diferentes estudos demonstraram o efeito antiviral dos terpenos sobre o HIV (HARADA, 2005; OHYOSHI et al, 2012; PAN et al, 2011), coronavirus associado à Síndrome Respiratória Aguda Severa (SARS, IKEDA et al., 2005), vírus Epstein-Barr (AKIHISA et al, 2009) e vírus Chikungunya (ALLARD et al, 2011).

Dentre o grupo dos terpenos, os diterpenos estão sendo amplamente estudadas pelo potencial terapêutico em várias patologias, tendo sido observadas atividades imunomodulatória, antiinflamatória, antiviral e anti-neoplásica, com baixa toxicidade sistêmica (LEE et al., 1995; SOUZA-FAGUNDES et al., 2003 A e B; CHAO et al., 2005; HUANG et al., 2005; BONITA et al., 2007). Estes compostos apresentam quatro unidades de isopreno (C₂₀H₃₂) podendo ser acíclicos, mas geralmente apresentam-se como compostos mono-, bi-, tri-, tetra-, ou macrocíclicos (Figura 1.6, SALMINEN et al., 2008). Entre os diterpenos, a classe do tipo labdano é conhecida

por suas atividades citotóxica, pro-apoptótica e imunomoduladora (LEE et al., 1995; ZANI et al., 2000; DIMAS et al., 2001).

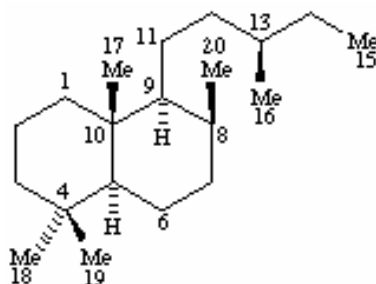


Figura 1.6 – Estrutura esquemática do esqueleto básico dos diterpenos classe labdano. Fonte: SALMINEN et al., 2008.

Em 2000, pesquisadores brasileiros identificaram um diterpeno labdano a partir do extrato etanólico das partes aéreas de *Alomia myriadenia* Schultz-Bip. Ex Baker (*Asteraceae*), denominado miriadenolídeo [(12S, 16-dihydroxy-entlabda-7, 13-dien-15, 16-olídeo; figura 1.7, ZANI et al., 2000], sendo que este diterpeno parece ocorrer em *A. myriadenia* e *Acritopappus hagei*, também da família *Asteraceae* (BOHLMANN et al., 1980; ZANI et al., 2000).

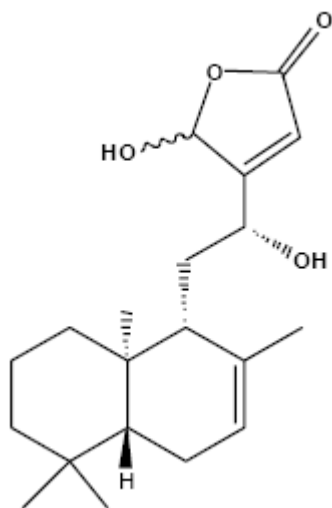


Figura 1.7 – Estrutura química do miriadenolídeo. Fonte: SOUZA-FAGUNDES et al., 2003 A.

O miriadenolídeo apresentou importante atividade imunomodulatória (ZANI et al., 2000, SOUZA-FAGUNDES et al., 2003 A, B) e efeitos citotóxicos significativos em algumas linhagens de células tumorais (ZANI et al., 2000). O miriadenolídeo é responsável pela atividade antiproliferativa observada na presença do extrato bruto de *A. myriadenia* em células não transformadas. Esta atividade foi demonstrada utilizando ensaios de proliferação de PBMC humanas induzidas por fitohemaglutinina (PHA). Neste ensaio, observou-se que o miriadenolídeo reduziu significativamente o percentual de células CD14+, sem alterar as proporções relativas de subpopulações de linfócitos T CD3⁺CD4⁻CD8⁺ e CD3⁺CD4⁺ CD8⁻ e a viabilidade ou competência proliferativa dos linfócitos T. Assim, ficou demonstrado que o efeito imunossupressor nestas células está relacionado com a indução de apoptose em monócitos, explicando em parte, a atividade inibitória observada nas células linfocitárias induzida por PHA (SOUZA-FAGUNDES et al., 2003 A).

Em outro estudo, foi demonstrado que o miriadenolídeo é capaz de ativar mecanismos relacionados com a morte programada, ativando a via dependente de caspases, em linhagem leucêmica humana, tanto linfocíticas (Jurkat) como monocíticas (THP-1). Este processo foi confirmado pela externalização de resíduos de fosfatidilserina, perda do potencial de membrana mitocondrial, ativação das caspases 3, 9 e 8, com subsequente formação de poros, e pela clivagem de Bid (SOUZA-FAGUNDES et al., 2003 B). Também foi demonstrada a atividade antitumoral deste composto, no modelo do tumor de *Ehrlich* em camundongos (JÚNIOR et al., 2006).

Em relação ao efeito antiinflamatório deste diterpeno, Souza-Fagundes (2002) demonstrou a inibição de citocinas pro-inflamatórias em sistema murino estimulados por LPS, após 48 horas de incubação. Assim, foi observada uma inibição dose-dependente significativa da secreção de IL-12, importante mediadora da resposta imune aos microrganismos intracelulares (GAZZINELLI, 1996), do óxido nítrico (NO), e redução da secreção de TNF- α pelos macrófagos, sendo que a modulação destas citocinas pelo miriadenolídeo ocorreu em doses nanomolares (SOUZA-FAGUNDES, 2002).

Capítulo 2 – Avaliação da regulação de macromoléculas virais e celulares em células HTLV-1 positivas após-tratamento com o composto terpenóide.

“... Jesus respondeu: Tende fé em Deus. Em verdade vos digo, se alguém disser a este monte: ergue-te e lança-te ao mar, e não duvidar no coração, mas crer que o que diz se realiza, assim lhe acontecerá...”

Marcos 11:12-14 e 11: 20-26.

2.1 INTRODUÇÃO

As retrovíroses são importantes causas de morbidade e mortalidade humana, tornando-se pandemias nas últimas décadas. Entre os retrovírus, o HTLV-1 pode apresentar um caráter de persistência viral e existir no hospedeiro, na forma silenciosa, durante várias décadas. Dados epidemiológicos apontam que atualmente o Brasil apresenta cerca de dois milhões de pessoas infectadas, correspondendo a cerca de 2% da infecção na população mundial (PROETTI et al, 2005). Na história natural da infecção, 95% dos indivíduos permanecem como portadores assintomáticos, sendo que 2-5% podem iniciar após, aproximadamente, 30 a 40 anos de infecção, doenças crônicas e progressivas, como a HAM/TSP e a ATL (POIESZ et al, 1980; HINUMA et al, 1981; YOSHIDA et al, 1984).

O HTLV-1 inicia uma infecção persistente de células T CD4+, resultando no desenvolvimento da HAM/TSP, uma doença inflamatória crônica caracterizada por uma forte resposta humoral e celular. As investigações da relação HTLV-1/hospedeiro e mecanismos que conduzem o indivíduo infectado a uma desregulação imune e subsequente instalação da patogênese deverão resultar na identificação de novas vias moleculares que levarão à elucidação e entendimento de outras doenças imuno-mediadas (ARAYA et al, 2011). Acredita-se que a resposta celular desencadeada pelas células T CD8+, além de fatores como produção de citocinas e quimiocinas, citotoxicidade, reações cruzadas, carga viral e fatores genéticos são iniciadores da patogênese da HAM/TSP (OSAME, 2002; OLINDO et al, 2005).

Na atualidade, não há qualquer terapêutica específica e comprovadamente eficaz para HAM/TSP. As pesquisas desenvolvidas até o momento são consideradas inconclusivas e metodologicamente inadequadas, não havendo um consenso quanto ao melhor medicamento ou procedimento terapêutico a ser adotado.

Desde a antiguidade, faz-se o uso de espécimes vegetais para o tratamento e a cura de diversas enfermidades. O Brasil possui cerca de trinta por cento das espécies de plantas e de animais conhecidas no mundo, que estão distribuídas em seus diferentes ecossistemas. É o país detentor da maior diversidade biológica do planeta. A região dos cerrados – segundo maior ecossistema

Brasileiro, superado apenas pela Amazônia apresentam grande diversificação faunística e florística em suas diferentes fisionomias vegetais (AVIDOS e FERREIRA, 2005; AQUINO e AGUIAR, 2007). A partir das partes aéreas da *Alomia miriadenia* uma planta do cerrado foi isolado o miriadenolídeo um diterpeno que apresentou destacada atividades imunomodulatórias e antiinflamatória (SOUZA-FAGUNDES, 2002; 2003), além de possuir efeitos antivirais e de quimioprevenção do câncer (BOUVIER et al., 2005; PADUCH et al., 2007; SALMINEN et al., 2008). Este composto torna-se então, por suas propriedades, de grande interesse na avaliação de uma possível atividade anti-HTLV-1.

2.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antiviral e antiinflamatória do composto terpenóide miriadenolídeo em linhagens linfocíticas permanentemente infectadas pelo HTLV-1.

2.2.1 *Objetivos Específicos*

- Avaliar a citotoxicidade e determinar a diluição-trabalho para a verificação da atividade antiviral e imunomodulatória do composto terpenóide miriadenolídeo em:

- Linhagens celulares humanas - células MT-2 e células C91-PL (células linfocitárias CD4+/CD25+ permanentemente infectadas com o HTLV-1) e Jurkat (linhagem imortalizada de células T, originada de sangue periférico de um garoto com leucemia);
- PBMC de doadores negativos para HTLV-1 (análises *ex-vivo*).

- Avaliar por transcrição reversa seguida de PCR em tempo real (qPCR) a expressão de RNA's mensageiros virais codificadores da proteína estrutural Gag e das enzimas virais (*gag-pol*) e das principais proteínas modulatórias virais (*tax-rex*) em células MT-2 e C91-PL tratadas com diferentes concentrações do miriadenolídeo.

- Avaliar em ensaio de Western o perfil de expressão da proteína Tax em células MT-2 tratadas com diferentes concentrações do miriadenolídeo, por 24 e 48 horas, utilizando na detecção anticorpo monoclonal anti-Tax.

- Avaliar em ensaio de Western o perfil de expressão de proteínas do HTLV-1 em células MT-2 e C91-PL, tratadas com o miriadenolídeo, utilizando anticorpos monoclonais específicos anti-gp21 e gp46 (proteínas do envelope) e anti-p19 e p24 (proteínas Gag).

- Avaliar por qPCR em um arranjo de 84 genes celulares (PCR array - *Human antiviral response*) a atividade antiviral do miriadenolídeo em células MT-2 e C91-PL, antes e depois do tratamento com o composto terpenóide miriadenolídeo.

2.3 METODOLOGIA

2.3.1 Composto testado - miriadenolídeo

O miriadenolídeo (AMY) foi isolado das partes aéreas de *Alomia myriadenia* e cedido ao nosso grupo pelo Dr^o Carlos Leomar Zani (Fundação Oswaldo Cruz – Centro de Pesquisas René Rachou). O AMY apresenta PM: 334,2134 g/Mol e foi diluído em DMSO (Merck, >99%) para obtenção da solução estoque a 0,1M, que foi armazenada a -20°C, e diluída extemporaneamente em meio de cultura (RPMI). O DMSO foi utilizado nas culturas controle na concentração final 0,005%, sendo este tratamento utilizado na análise dos resultados, sendo denominado controle do diluente.

2.3.2 Amostra de sangue

Foram avaliadas células mononucleares do sangue periférico de indivíduos submetidos à avaliação clínico-laboratorial, realizada na Fundação HEMOMINAS. Todos os indivíduos foram triados e avaliados para a presença de anticorpos para Hepatite B e C, HIV, sífilis, doença de Chagas e HTLV-1/2, por diferentes metodologias. Os indivíduos que apresentarem sorologia positiva para qualquer um dos micro-organismos citados, bem como mulheres grávidas e indivíduos utilizando corticoterápicos, não foram incluídos no estudo.

Este trabalho foi submetido à avaliação dos Comitês de Ética em Pesquisa UFMG (anexo 2) e da Fundação HEMOMINAS (anexo 3). Todos os indivíduos que preencheram os critérios acima foram convidados para participar desta pesquisa, assinando necessariamente o Termo de Consentimento Livre Esclarecido – TCLE (anexo 1). Os indivíduos que assinaram o TCLE tiveram o direito de retirar sua participação da pesquisa em qualquer fase de desenvolvimento do trabalho.

2.3.2.1 Obtenção de PBMC

A obtenção de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC, do inglês “*peripheral blood mononuclear cells*”) foi realizada utilizando-se o método descrito por Gazzinelli e colaboradores (1983). Assim, o sangue heparinizado foi transferido para tubos de polipropileno 50 mL tipo Falcon, contendo uma mistura de Ficoll-diatrozoato (LMS – *Lymphocyte Separation Medium, Organon Teknika Corporation, Durhan*) na razão de uma parte de Ficoll para duas partes de sangue. Essa preparação foi centrifugada (18° C, 40 minutos a 400 g) para formação de um anel de células mononucleares na interface Ficoll/plasma. O anel de células foi removido e transferido para tubos de polipropileno 50 mL tipo Falcon com fundo cônico. Posteriormente, foram adicionados 50 mL de meio de cultura RPMI (SIGMA) às células e este conjunto foi centrifugado por 10 minutos a 400 g a 4° C, sendo este processo repetido por mais duas vezes utilizando-se 20 mL de RPMI para a lavagem das células. As PBMCs foram então ressuspendidas em 1 mL de meio RPMI (SIGMA) e contadas na câmara de Neubauer, testando-se sua viabilidade com solução isotônica de azul de tripano 0,02%, com auxílio de um microscópico óptico (OLYMPUS). A densidade celular foi ajustada para $2,0 \times 10^6$ células/mL.

2.3.3 Linhagens celulares

2.3.3.1 Cultura de células MT-2 e C91-PL

A linhagem celular MT-2 representa uma população de linfócitos T CD4+CD25+ derivadas de linfócitos humanos do sangue circulante co-cultivados com células de um indivíduo adulto que apresentava ATL (OHTSUKI et al., 1983). A C91-PL também é uma população linfocitária CD4+ derivada de um paciente com ATL infectado com HTLV-1 (HARAKEH et al, 2006). A manutenção das células MT-2 e C91-PL (gentilmente cedidas pela FIOCRUZ/RJ) foram realizadas através de subculturas semanais. Resumidamente, as células foram semeadas em frascos de cultura no meio RPMI suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino (SFB – GIBCO), 2 mM de L-glutamina, 100 µg/mL penicilina e 50 µg/mL de gentamicina. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C, 5% de CO₂, 95% de umidade, por 72H. Após esse tempo, a suspensão celular foi homogeneizada e centrifugada, por 7 minutos, a 400 g, para a eliminação dos detritos celulares.

Então, as células eram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI e contadas na câmara de Neubauer para avaliar sua viabilidade com solução isotônica de azul de tripano 0,02%, com auxílio de um microscópio óptico (OLYMPUS). A densidade celular foi ajustada para $2,0 \times 10^6$ células/mL.

2.3.3.2 Cultura de células Jurkat

As células Jurkat representam uma linhagem celular leucêmica de células T CD4+. A manutenção das células Jurkat foi realizada com subculturas semanais, semelhantemente às células MT-2, diferindo apenas na concentração do SFB usada, que foi de 10%. Estas células foram utilizadas como controle comparativo não infectado pelo HTLV-1 dos experimentos realizados com C91-PL e MT-2.

2.3.4 Ensaios de citotoxicidade

2.3.4.1 Análise da viabilidade celular pelo método de Exclusão de azul de tripan

A viabilidade, inicialmente, foi determinada pelo método azul de tripan, composto de um corante, o qual penetra no interior das células que perderam a integridade da membrana plasmática. Para tal, células MT-2 e Jurkat foram plaqueadas em microplacas de 96 poços (TPP) na densidade de $2,0 \times 10^5$ células/100µl poço. As células foram incubadas com diferentes concentrações do composto miriadanolídeo, a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, durante 24 horas. Foram adicionados controles do diluente (DMSO 0,0001%) e do branco (meio RPMI). Após o cultivo das células, foram coletados dez microlitos da suspensão celular e, juntamente com dez microlitos do corante Azul de Tripan, esta solução foi dispensada na câmara de Neubauer. No quadrante central foi realizada a contagem das células coradas e das células não-coradas em azul. A porcentagem de células tratadas viáveis foi calculada em relação à média do controle do diluente.

2.3.4.2 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico do MTT

Este ensaio baseou-se na metodologia de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2-5-difeniltetrazólio], inicialmente descrita por Mosmann (1983) com modificações. Células MT-2

Jurkat e PBMC foram plaqueadas em microplacas de 96 poços (TPP) na densidade de $2,0 \times 10^5$ células/100µl poço. As células foram incubadas com diferentes concentrações das amostras, a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, durante 24H. Foram adicionados controles do diluente (DMSO 0,0001%) e do branco (meio RPMI). Após o cultivo das células foram adicionados 20µl/poço da solução de MTT (5mg/mL). A placa foi, então, re-incubada por 4 horas em estufa de CO₂ (5%) a 37°C, ao abrigo da luz. Após o tempo de incubação com o MTT, a placa foi centrifugada a 800 g, por 5 minutos a 18°C e todo o sobrenadante da cultura foi retirado. Logo, foram adicionados 200µl/poço da solução de MTT (5mg/mL) preparado em PBS e diluído em meio. As placas foram, então, incubadas novamente por mais 4H. Após este período, as placas foram centrifugadas a 400 g, por 5 minutos, a 18°C, e os sobrenadantes foram retirados. Logo, foram adicionados 200 µl da solução de isopropanol/0,04N HCl e os cristais intracitoplasmáticos de formazan foram solubilizados por pipetagem exaustiva. A densidade ótica (OD₅₄₀) foi determinada por espectrofotometria (*ASYS Expert plus*). A porcentagem de células tratadas viáveis foi calculada em relação à média do controle do diluente: %viabilidade = $\frac{A-B}{A} \times 100$ (A = absorvância amostra e B= absorvância do controle).

2.3.4.3 Determinação do conteúdo de DNA subdiploide por citometria de fluxo

Depois do cultivo de 24H, as células MT-2, C91-PL, Jurkat e PBMC, tratadas com diferentes concentrações das amostras, foram centrifugadas a 400 g por 5 minutos a 4°C. Após centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e adicionou-se 300 µl de solução fluorocrômica hipotônica (HFS), contendo 50µg/ml de Iodeto de Propídio - PI (Sigma) e 0,1% de triton X-100 (Sigma) em citrato de sódio a 0,1% (SIGMA). Os tubos foram incubados por 4H a 8°C. Posteriormente, as amostras foram submetidas à análise por citometria de fluxo. Após delimitação da população celular em gráficos pontuais de tamanho X granulosidade, os núcleos foram analisados em histogramas e o conteúdo de DNA subdiploide foi determinado pelo programa CellQuest (Becton Dickinson). Os resultados foram expressos como índice de DNA subdiploide (DNA fragmentado, células em apoptose ou necrose tardia) por comparação dos diferentes tratamentos com as culturas controle e com as culturas tratadas somente com o diluente (DMSO, 0,0001%). Os valores foram expressos como gráficos de barra, apresentando a média dos valores do índice referente a cada poço das replicatas, adicionados ao erro padrão (SEM).

2.3.5 Extração de macromoléculas

2.3.5.1 Preparação das culturas celulares para extração de macromoléculas

A partir da cultura de MT-2 e C91-PL foram preparadas placas de 6 poços (TPP) com 1×10^6 células/mL e procedeu-se à incubação com a molécula AMY – 5- 0,0005 μ M/ 1- 0,0001 μ M, bem como controle celular e controle de diluente (DMSO). Após 24, 48, 72, 96H realizou-se a extração de macromoléculas (DNA, RNA e proteínas) com o reagente Trizol (INVITROGEN), sendo que o RNA também foi extraído utilizando-se o Kit RNeasy (QIAGEN), ambas extrações foram realizadas de acordo com as especificações do fabricante.

2.3.5.2 Extração de macromoléculas utilizando o Trizol

Após o período de incubação, as células foram lavadas duas vezes em PBS 1X e entre as lavagens realizou-se a centrifugação 400 g, 10 minutos a 4°C. Brevemente, para cada 5×10^6 células foi adicionado 1 ml de Trizol, com posterior homogeneização e incubação a temperatura ambiente por 5 minutos. Após a incubação, foi adicionado clorofórmio 100% (0,2 mL) e procedeu-se agitação vigorosa por 15 segundos e incubou-se a 25°C por 3 minutos. As amostras foram submetidas à centrifugação (12.000 g, 15 minutos a 4°C), e obtiveram-se misturas trifásicas contendo em cada uma delas RNA, DNA ou proteínas. As misturas foram isoladas cuidadosamente, e cada fase reservada para posterior isolamento e purificação das macromoléculas.

A) Isolamento e purificação de RNA

Às fases aquosas transparentes, adicionou-se 500 μ L de isopropanol e incubou-se por 10 minutos a 25°C. Logo, as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 15 minutos, 4 °C e descartou-se os sobrenadantes. Os precipitados foram lavados adicionando-se 1 mL 75% etanol e procedeu-se a centrifugação a 7.500 g por 5 minutos, 4 °C. Posteriormente, os tubos foram vertidos sob papel toalha para retirada do excesso de etanol e os RNAs solubilizado em 20 μ l de água *RNase free*. As amostras foram quantificadas utilizando o espectrofotômetro Nanodrop (*Thermo Scientific 1000*).

B) Isolamento e purificação de DNA

Aos materiais resultantes da retirada da fase aquosa anterior, adicionou-se 300 µl de 100% etanol, e a mistura foi homogeneizada por inversão. Logo, incubou-se a 25°C por 3 minutos e submeteu-se à centrifugação de 2.000g por 5 minutos a 4 °C. Os precipitados obtidos foram lavados 2X com 1 mL solução a 10% de etanol/0,1M de citrato de sódio. Entre cada lavagem, incubou-se os precipitados de DNA por 30 minutos a 25 °C, com ocasionais homogeneizações. Logo, centrifugou-se a 2.000 g por 5 minutos a 4 °C e os precipitados foram ressuspensos em 2,0 mL 75% etanol e incubados a 25°C por 20 minutos. Posteriormente, os tubos foram vertidos sob papel toalha por 10 minutos para retirada do excesso da solução de lavagem e os precipitados foram dissolvidos em 8mM NaOH, lentamente, com repetidas pipetações e centrifugou-se a mistura a 12.000g por 10 minutos a 25 °C. Os sobrenadantes foram colocados em tubos novos e os lotes de DNA foram quantificados utilizando-se o espectrofotômetro Nanodrop (*Thermo Scientific 1000*).

C) Isolamento e purificação de proteínas

Às fases vermelho-claro (fenol-clorofórmio), adicionou-se 1,5 mL álcool isopropílico com posterior incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. Após este tempo, a amostra foi centrifugada a 10.000 g por 10 minutos a 7°C. Os precipitados ricos em proteínas foram lavados três vezes com 2 mL de solução de lavagem contendo 0,3M guanidina/HCl em 95% de etanol e entre as lavagens foram realizadas centrifugações a 8.500 g por 5 minutos a 4°C. A lavagem final foi realizada com 2 mL de etanol. Os precipitados protéicos foram dissolvidos em solução de SDS a 1%, e incubados a 56°C por 18H.

A quantificação das proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando-se soro albumina bovina (BSA) como padrão, através do “Kit Bio-Rad Assay” (Bio-Rad). As proteínas foram alíquotadas e mantidas a -70°C, até o momento do uso.

2.3.5.3 Extração de macromoléculas utilizando o Kit RNeasy

Para as análises da atividade antiviral do composto miriadenolídeo utilizando o arranjo PCR *array Human antiviral response* (QIAGEN) os RNAs das células MT-2 e C91-PL foram extraídos utilizando-se o Kit comercial *QIAamp RNeasy* (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante. Ao processo de extração foi acrescentado um passo para o tratamento com DNase (*RNase-Free DNase Set*, QIAGEN), também utilizando-se as especificações do fabricante.

Brevemente, às culturas celulares tratadas com o miriadenolídeo e os controles, foi acrescentada uma mistura do tampão RLT e β -mercaptoetanol. Os tubos foram levados ao vortex para eliminação de qualquer precipitado. As misturas foram transferidas para as colunas *QIAshredder*, que foram centrifugadas a 15.000 g por 2 minutos. Aos eluatos foram adicionados etanol 70% (v/v) e as misturas foram transferidas para as colunas *QIAamp*. Foi realizado um passo de lavagem com centrifugação a 8000 g e em seguida, feito o tratamento com DNase com incubação a 30°C por 15 minutos. Outros passos de lavagem foram realizados e os RNAs foram eluídos com água RNase-free. Uma alíquota foi retirada para leitura da concentração do RNA em espectrofotômetro, e ao restante foi imediatamente adicionado RNAsin (inibidor de RNase) (PROMEGA, Madison, USA). Os RNAs foram estocados em freezer -70°C até o momento do uso.

2.3.6 Integridade do RNA

A qualidade dos RNAs totais extraídos foi avaliada pela medida da absorbância em espectrofotômetro (*NanoVue Plus*, GE Healthcare, Suécia) e pela visualização das bandas 18S e 28S em gel desnaturante de agarose à 1%.

2.3.7 Produção de cDNA

A partir dos RNAs das amostras testes e controles extraídos e purificados anteriormente pelo método Trizol procedeu-se a produção dos cDNAs utilizando-se o kit RT-PCR Impron II (Promega). Para tal, foi preparada uma mistura de: RNA (até 1 μ g), 1,0 μ l de *Primer Oligo-DT* (0,5 μ g) e água *nuclease free*, com volume final de 5-7 μ l. Logo, esta foi incubada a 70°C por 5

minutos e, após este período, os tubos foram imersos rapidamente em gelo por 5 minutos. Para a etapa de transcrição reversa, preparou-se uma mistura contendo água *nuclease free*, MgCl₂ 25mM, 5X RT tampão (Improl II), DNTPmix 10mM, RNAsin (20UI), Transcriptase reversa (Impron II), com volume final de 15-13 µl, seguida da incubação por 25°C por 5 minutos, 42° C por 1 hora, 70° C por 15 minutos e 4° C infinito. As amostras de cDNA, foram quantificadas no espectrofotômetro Nanodrop (*Thermo Scientific 1000*) e armazenadas a -20° C.

Já para as reações de PCR *array*, os cDNAs foram sintetizados a partir de 1 µg de RNA total, utilizando-se o kit RT2 *First strand* (SABiosciences, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Às amostras de RNAs foi adicionado o tampão GE (*Genomic DNA Elimination*) até atingir um volume final de 10µL. As misturas foram incubadas a 42° C por 5 minutos e deixadas no gelo por 2 minutos. Foram adicionados 10 µL do mix RT de acordo com as instruções e reagentes fornecidos pelo fabricante. As misturas foram novamente incubadas à 42° C por 15 minutos, sendo posteriormente aquecido a 95°C por 5 minutos. Foram adicionados 15 µL de H₂O e as mistura foram mantida no gelo até o uso na PCR.

2.3.8 Avaliação da modulação da expressão de genes virais por PCR cinética

A avaliação da expressão dos genes *gag-pol* e *tax-rex* do HTLV-1 foram realizadas, separadamente, utilizando a reação de PCR cinética a partir de um protocolo padronizado *in house*. O gene GAPDH humano foi utilizado como normalizador da reação (Quadro 2.1). Brevemente, 200ng cDNA foram utilizados como molde numa reação de 25µl, contendo 2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 5 pmol/µl de cada iniciador. A reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho *Applied Biosystems, 7300 Real Time PCR System*, com as seguintes condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguida por 45 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Foi adicionada a curva de *melting* de 60°C a 95°C, com aumento de 0,5°C a cada ciclo (total 80 ciclos), para avaliação da especificidade dos produtos amplificados.

As amostras de cDNA do controle de diluente de MT-2 e C91-PL foram utilizadas para a construção de uma curva padrão de 1000,100, 10 e 1 ng. Todas as amostras e controles foram feitos em triplicatas e a quantificação aceita quando os *slopes* das curvas padrão estavam entre -3.10 e -3.74 e o $r^2 > 0.99$. A expressão gênica foi analisada pelo método da quantificação relativa a partir da curva padrão, sendo calculada pela razão entre o gene alvo e o gene de referência.

Quadro 2.1 – Iniciadores usados na PCR em tempo real para os genes *gag-pol*, *tax-rex*, e GAPDH.

Iniciador	Sequência	Amplicon
tax-rex-F	5'- ACCAACACCATGGCCCA – 3'	220 pb
tax-rex-R	5'- GAGTCGAGGGGATAAGGAAC – 3'	
<i>gag/pol</i> F	5'- GAGGGAGGAGCAAAGGTACTG-3	129 pb
<i>gag/pol</i> R	5-'AGCCCCCAGTTCATGCAGACC-3	
hGAPDH-F	5'- ACAGTCAGCCGCATCTTCTT – 3'	94 pb
hGAPDH-R	5'- GAGTCAACGGATTTGGTCGT – 3'	

2.3.9 Análise da expressão dos genes envolvidos na resposta imune

Para a análise da expressão dos genes celulares envolvidos na resposta imune inata antiviral foram realizados ensaios de PCR em tempo real a partir do RNAs obtidos das amostras testes. Para tal, utilizaram-se placas *Human Antiviral Response RT² Profiler™ PCR Array* (QIAGEN GmbH,

Hilden, Alemanha) através da metodologia de PCR em tempo real pelo sistema *SYBR Green* para detecção dos 84 transcritos gênicos selecionados para este estudo (tabela 2.1), além de cinco outros genes *house keeping* (B2M, HPRT1, RPL13A, GAPDH, ACTB). A metodologia foi feita de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se 1500ng do cDNA e 1X SYBR Green qPCR Master Mix (SuperArray Biosciences, USA) para a realização da RT-PCR. As PCRs foram realizadas no equipamento de PCR em tempo real da Applied Biosystems (modelo 7300), com os seguintes ciclos de temperatura: uma fase inicial de 95°C por 10 min, seguida por 40 ciclos à 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min. Curva de *melting* de 60°C a 95°C, com aumento de 0,5°C a cada ciclo (total 80 ciclos) foi realizada após todos os PCR para avaliação da especificidade dos produtos amplificados. O valor de *threshold* e de *baseline* foram selecionados e mantidos os mesmos em todos os ensaios de amplificação.

Foi utilizado o método delta Ct para a análise da expressão gênica relativa, usando-se o *software* da SABioscience disponível *on line* (<http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>). O cálculo da diferença de expressão do gene (*fold change*) das amostras testes em relação ao controle de diluente foi:

- 1º: $\Delta Ct = \text{média Ct do gene alvo} - \text{média Ct dos genes normalizadores}$;
- 2º: Cálculo do $2^{-\Delta Ct}$ do gene em cada grupo;
- 3º: Quantidade relativa = $2^{-\Delta Ct} (\text{grupo de estudo}) / 2^{-\Delta Ct} (\text{grupo de comparação})$.

O resultado final foi dado como diferença de regulação gênica (*fold regulation*), que é igual ao *fold change* quando o valor é < 1 , e o inverso do *fold change* quando o valor é > 1 . Foi considerado como relevante uma diferença mínima de duas vezes entre dois grupos, seja de inibição ou de estimulação da expressão gênica. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando o valor de $p \leq 0,05$ calculado pelo *software*.

Tabela 2.1: Genes envolvidos na resposta imune inata antiviral avaliada neste estudo.

Símbolo	Descrição
AIM2	<i>Absent in melanoma 2</i>
APOBEC3G	<i>Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G</i>
ATG5	<i>ATG5 autophagy related 5 homolog (S. cerevisiae)</i>
AZI2	<i>5-azacytidine induced 2</i>
CARD8	<i>Caspase recruitment domain family, member 8</i>
CASP1	<i>Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)</i>
CASP10	<i>Caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase</i>
CASP8	<i>Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase</i>
CCL3	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 3</i>
CCL5	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 5</i>
CD40	<i>CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5</i>
CD80	<i>CD80 molecule</i>
CD86	<i>CD86 molecule</i>
CHUK	<i>Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase</i>
CTSB	<i>Cathepsin B</i>
CTSL1	<i>Cathepsin L1</i>
CTSS	<i>Cathepsin S</i>
CXCL10	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 10</i>
CXCL11	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 11</i>
CXCL9	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 9</i>
CYLD	<i>Cylindromatosis (turban tumor syndrome)</i>
DAK	<i>Dihydroxyacetone kinase 2 homolog (S. cerevisiae)</i>
DDX3X	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked</i>
DDX58	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58</i>
DHX58	<i>DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58</i>
FADD	<i>Fas (TNFRSF6)-associated via death domain</i>

FOS	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
HSP90AA1	<i>Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1</i>
IFIH1	<i>Interferon induced with helicase C domain 1</i>
IFNA1	<i>Interferon, alpha 1</i>
IFNA2	<i>Interferon, alpha 2</i>
IFNAR1	<i>Interferon (alpha, beta and omega) receptor 1</i>
IFNB1	<i>Interferon, beta 1, fibroblast</i>
IKBKB	<i>Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta</i>
IL12A	<i>Interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)</i>
IL12B	<i>Interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)</i>
IL15	<i>Interleukin 15</i>
IL18	<i>Interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)</i>
IL1B	<i>Interleukin 1, beta</i>
IL6	<i>Interleukin 6 (interferon, beta 2)</i>
IL8	<i>Interleukin 8</i>
IRAK1	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 1</i>
IRF3	<i>Interferon regulatory factor 3</i>
IRF5	<i>Interferon regulatory factor 5</i>
IRF7	<i>Interferon regulatory factor 7</i>
ISG15	<i>ISG15 ubiquitin-like modifier</i>
JUN	<i>Jun proto-oncogene</i>
MAP2K1	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>
MAP2K3	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 3</i>
MAP3K1	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1</i>
MAP3K7	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7</i>
MAPK1	<i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>
MAPK14	<i>Mitogen-activated protein kinase 14</i>

MAPK3	<i>Mitogen-activated protein kinase 3</i>
MAPK8	<i>Mitogen-activated protein kinase 8</i>
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral signaling protein</i>
MEFV	<i>Mediterranean fever</i>
MX1	<i>Myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)</i>
MYD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene (88)</i>
NFKB1	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1</i>
NFKBIA	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>
NLRP3	<i>NLR family, pyrin domain containing 3</i>
NOD2	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2</i>
OAS2	<i>2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa</i>
PIN1	<i>Peptidylprolyl cis/trans isomerase, NIMA-interacting 1</i>
PSTPIP1	<i>Proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 1</i>
PYCARD	<i>PYD and CARD domain containing</i>
PYDC1	<i>PYD (pyrin domain) containing 1</i>
RELA	<i>V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)</i>
RIPK1	<i>Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1</i>
SPP1	<i>Secreted phosphoprotein 1</i>
STAT1	<i>Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa</i>
SUGT1	<i>SGT1, suppressor of G2 allele of SKP1 (S. cerevisiae)</i>
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TICAM1	<i>Toll-like receptor adaptor molecule 1</i>
TLR3	<i>Toll-like receptor 3</i>
TLR7	<i>Toll-like receptor 7</i>
TLR8	<i>Toll-like receptor 8</i>
TLR9	<i>Toll-like receptor 9</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRADD	<i>TNFRSF1A-associated via death domain</i>
TRAF3	<i>TNF receptor-associated factor 3</i>

TRAF6	<i>TNF receptor-associated factor 6</i>
TRIM25	<i>Tripartite motif containing 25</i>

2.3.10 Avaliação da expressão de proteínas por ensaios de *Western*

Amostras de proteínas totais foram aplicadas em gel de SDS-PAGE – 12%, o qual foi submetido a uma corrente de 100V por 1 H para o fracionamento destas. O gel foi transferido para membrana de nitrocelulose, conforme protocolo do “*Kit Bio-Rad transference*” (Bio-Rad laboratories, USA). A membrana foi bloqueada por 18 a 20 horas a 4° C, utilizando TBS 1X contendo 5% de leite em pó desnatado.

Os anticorpos primários utilizados foram o anticorpo monoclonal anti-Tax (gentilmente cedido pelo Dr. Kuan Teh Jeang, NIAID, NIH, Bethesda, USA) e anticorpos monoclonais anti-p19, anti-p24, anti-gp21, anti-gp46 e anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). A membrana foi primeiramente lavada três vezes em solução de lavagem [TBS 1X contendo 0,05% de Tween-20 e 1% de leite em pó desnatado (LPD, Molico, Brasil)]. A incubação com os anticorpos primários diluídos 1/200 anti-p19, anti-p24, anti-gp21, anti-gp46, anti-GAPDH e 1/20 para anticorpo anti-Tax foi realizada a 4° C por 18-20 horas em solução de lavagem. Imediatamente, a membrana foi lavada três vezes e incubada durante 60 minutos à temperatura ambiente com anticorpos secundários marcados com peroxidase sob agitação (SIGMA) (tabela 2.2). Posterior à incubação, as membranas foram lavadas três vezes e procedeu-se a revelação. Para a revelação foi utilizada a solução reveladora “ECL-Plus” (Amersham, UK) e as membranas expostas contra filme de raio X em intervalos de 30 segundos a 5 minutos e posteriormente fixadas. Após a revelação procedeu-se análise densitométrica das bandas utilizando-se o programa *ImageJ*.

Tabela 2.2: Anticorpos e diluições utilizadas nos ensaios de *Western*

Anticorpos e diluições		
Anticorpo Primário	Anticorpo secundário	Sítio enzimático
anti-Tax - 1/20	anti-coelho - 1/20.000	Peroxidase
anti-p19 - 1/200	anti-mouse - 1/3.000	Peroxidase
anti-p24 - 1/200	anti-mouse - 1/3.000	Peroxidase
anti-gp21 - 1/200	anti-cabra - 1/3.000	Peroxidase
anti-gp46 - 1/200	anti-mouse - 1/3.000	Peroxidase
anti-GAPDH - 1/200	anti-cabra - 1/3.000	Peroxidase

2.3.11 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos dados foram realizadas com o programa Graph Prisma 3.0, através de métodos de análises paramétricas (teste de Tukey ou teste de T pareado) e análises não paramétricas (teste de Kruskal-Wallis), no intervalo de confiança de 95%.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Avaliação da viabilidade de células MT-2, células Jurkat e PBMC tratadas com o miriadenólídeo

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados inicialmente para determinação da concentração não citotóxica do miriadenolideo a ser utilizada para a avaliação da sua atividade anti-viral. Em estudos prévios, o nosso grupo demonstrou que em concentrações elevadas de 30 μ M o miriadenolideo apresenta atividade antitumoral e pro-apoptótica, sendo que a 7 μ M este produto natural não altera a viabilidade e função de linfócitos T e B (SOUZA-FAGUNDES, 2003 A, 2003B). Desta forma, para a avaliação do potencial anti-viral deste diterpeno labdano, inicialmente foram realizados experimentos para a avaliação da viabilidade celular frente a concentrações de baixa molaridade ou nanomolaridade (1-0,0001 μ M).

Neste contexto, a avaliação da citotoxicidade do composto miriadenólídeo foi realizada por três metodologias diferentes: avaliação da integridade de membrana pelo método de exclusão do azul de tripan, avaliação da viabilidade celular pelo método de redução do sal de tetrazólio (MTT) e análise do conteúdo de DNA subdiplóide.

Os ensaios com azul de tripan demonstraram que para células Jurkat houve uma redução de cerca de 10% na viabilidade, comparando-se o controle de células cultivadas somente com meio (CC) com o controle de diluente (CD) frente às diferentes concentrações do miriadenólídeo, após 24 horas de incubação. Dados semelhantes foram observados para células MT-2, onde foi possível observar cerca de 5% de redução da viabilidade frente às diferentes concentrações do miriadenólídeo. Portanto, a maioria das células apresentou-se viáveis (tabela 2.3).

Tabela 2.3: Análise da viabilidade celular (%) de células MT-2 e Jurkat tratadas com diferentes concentrações do miriadenolídeo por 24 horas pelo método de Exclusão de azul de tripan

Tratamento	MT-2	Jurkat
CC	100	100
CD (DMSO)	100	99
1 μM	95	91
0,01 μM	97	89
0,0001 μM	95	90

As células foram tratadas e submetidas à contagem celular em microscópio ótico. O controle de diluente (CD) foi utilizado para comparação dos diferentes tratamentos. Dados representativos de dois experimentos independentes, realizados em quadruplicata.

A avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT, cujos resultados estão apresentados na figura 2.1, demonstrou que o tratamento de células MT-2 com o miriadenolídeo, reduziu significativamente a viabilidade celular nas concentrações testadas 1 -0,0001 μM . Esta redução foi de cerca de 20%. Apesar da diferença estatística quanto à viabilidade celular entre as concentrações do AMY e a cultura controle (CD), a viabilidade celular ficou superior a 80%, aceitável para os ensaios *in vitro*.

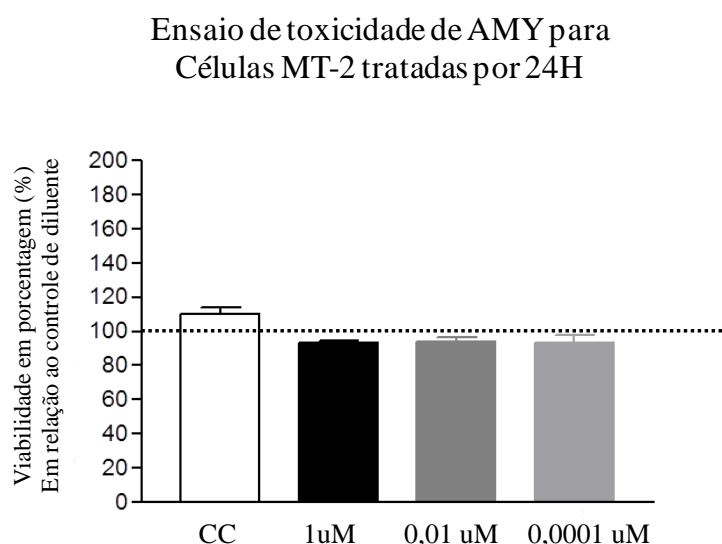


Figura 2.1 - Avaliação da citotoxicidade do miriadenolídeo (AMY) em células MT-2. As células MT-2 foram tratadas com diferentes concentrações de AMY e incubadas por 24H. Viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. O resultado é apresentado em percentual em relação à média do controle de diluente e os dados representam valores de 2 experimentos independentes com 5 replicatas. CC – Controle celular; 1 - 0,0001 μM – Concentração da droga AMY.

Em relação às células Jurkat (uma linhagem linfocítica humana CD4+ imortalizada), após tratamento com as diferentes concentrações do miriadenolídeo por 24 horas, não foi observada diferença estatística significativa ($p > 0,05$) (figura 2.2), demonstrando que o mesmo não é citotóxico para esta linhagem.

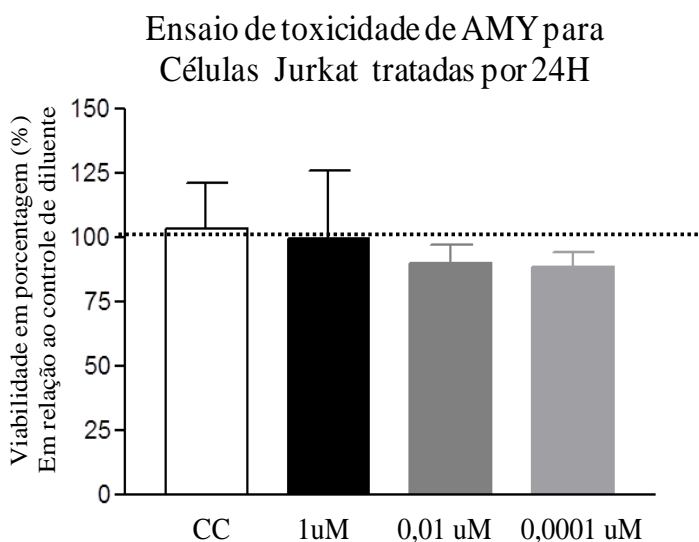


Figura 2.2 - Avaliação da citotoxicidade do miriadenolídeo (AMY) em células Jurkat. As células Jurkat foram tratadas com diferentes concentrações de AMY e incubadas por 24H e a viabilidade celular avaliada pelo ensaio de MTT. A concentração final de DMSO nos poços foi de 0,0001%. A análise foi realizada utilizando a média do controle de diluente. Os dados representam valores de 2 experimentos independentes com 5 replicatas. CC – Controle celular; 1 – 0,0001 μ M – Concentração da droga AMY.

A citotoxicidade do diterpeno igualmente foi avaliada em PBMCs de candidatos à doação de sangue soronegativa para o HTLV-1 (figura 2.3), pelo ensaio de MTT. Os dados revelaram que as concentrações diferentes concentrações do miriadenolideo (1-0,0001 μ M) não apresentaram toxicidade, quando comparado à média do controle de diluente, após 24H de incubação (figura 2.3). Como o ensaio é realizado com amostras de sangues obtidas de diferentes doadores, foi possível observar toxicidade do produto natural para células de um doador, como por exemplo, para o doador nº1, onde os dados são estatisticamente diferentes quando comparados à média do controle de diluente (0,005%) entre a cultura controle e aquela tratada com 1 μ M e entre a concentração 1 μ M e 0,0001 μ M ($p < 0,05$). Estes resultados são atribuídos à variabilidade individual. Já para a maioria das células mononucleares do sangue periférico obtidas dos outros sete doadores analisados não foram observados toxicidade após tratamento com as diferentes concentrações do miriadenolídeo.

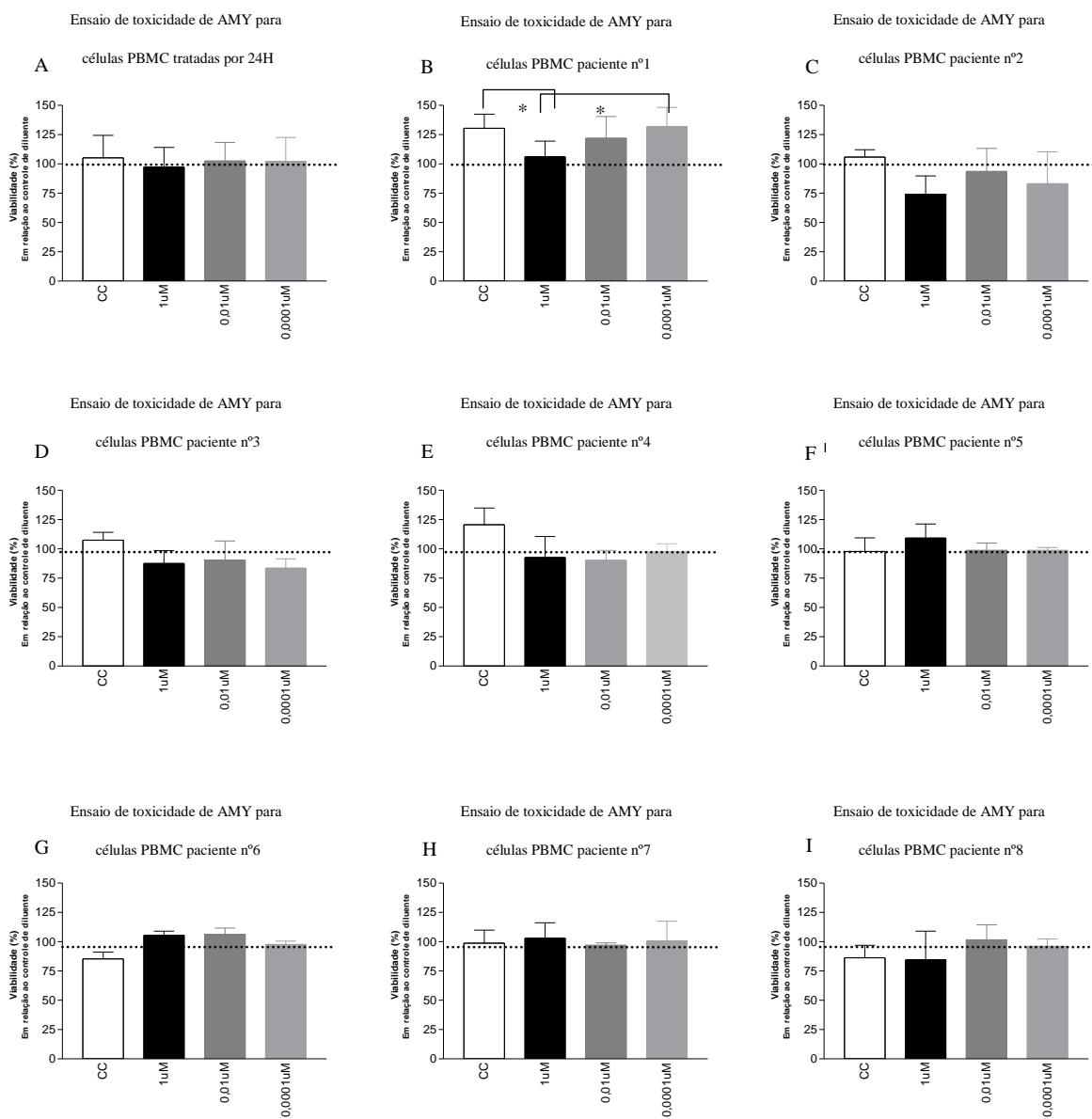


Figura 2.3 - Avaliação da citotoxicidade do composto miriadanolídeo (AMY) para PBMC de 8 doadores da Fundação HEMOMINAS pela técnica colorimétrica MTT. Viabilidade celular avaliada pelo método de MTT. Resultado expressos em percentual em relação à média do controle de diluente (DMSO 0,0001%). A – Análise da PBMC de todos doadores (1-8); B-I – Análise da PBMC de cada doador; CC – Controle celular; 1 – 0,0001μM – Concentração da droga AMY; * - $p < 0,05$.

A viabilidade celular também foi verificada pela quantificação do conteúdo de DNA por citometria. Estes experimentos foram realizados não somente para células MT-2, Jurkat, PBMC e ainda a linhagem em C91-PL.

Nestes ensaios foram demonstrados que em todas as concentrações testadas (1-0,0001 μM) em comparação ao controle de diluente (DMSO 0,0001%) o composto miriadenolídeo não apresentou citotoxicidade significativa para células MT-2 entre os diferentes tratamentos (figura 2.4).

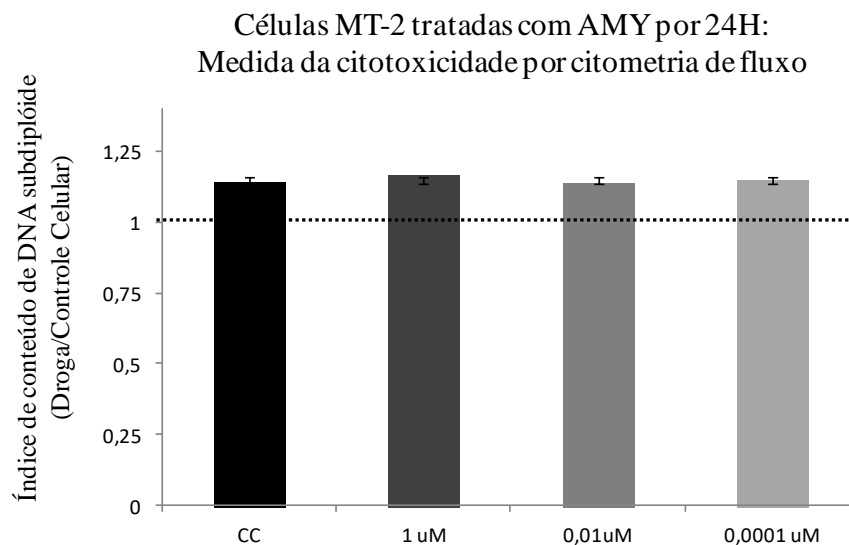


Figura 2.4 - Análise da citotoxicidade do composto miriadenolídeo (AMY) em células MT-2 por quantificação do DNA subdiploide. As células MT-2 foram tratadas com diferentes concentrações de AMY e incubadas por 24H e o conteúdo de DNA subdiploide (fragmentado) foi avaliado por citometria de fluxo. A análise foi realizada utilizando à média do controle de diluente. CC – Controle celular; 1 – 0,0001 μM – Concentração da droga AMY.

Os resultados da análise por citometria de fluxo apresentados na figura 2.5 demonstram também que o composto miriadenolídeo não induziu o aumento significativo do conteúdo de DNA subdiploide em células C91-PL, nas mesmas condições. Igualmente para células Jurkat (figura 2.6), este produto natural não induziu aumento significativo do conteúdo de DNA subdiploide. Estes resultados demonstram que o miriadenolídeo não apresentou citotoxicidade nas concentrações de 1 a 0,001 μM .

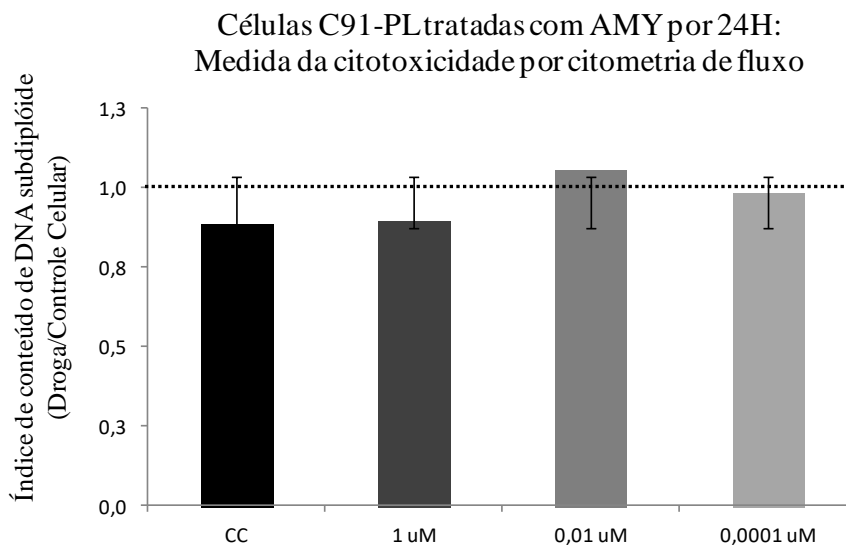


Figura 2.5 - Avaliação da citotoxicidade do composto miriadenolídeo (AMY) em células C91-PL por quantificação do DNA subdiploide. As células C91-PL foram tratadas com diferentes concentrações de AMY e incubadas por 24H e o conteúdo de DNA subdiploide (fragmentado) foi avaliado por citometria de fluxo. A análise foi realizada utilizando à média do controle de diluente. CC – Controle celular; 1 – 0,0001 μ M – Concentração da droga AMY.

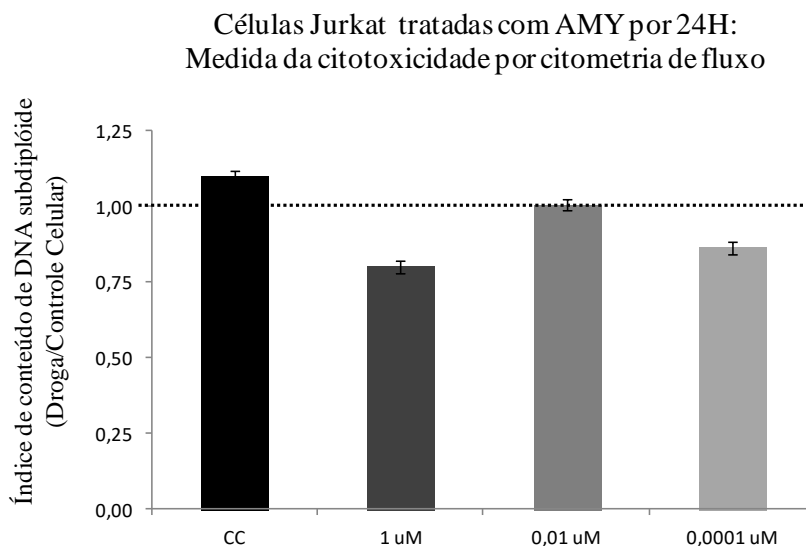


Figura 2.6 - Avaliação da citotoxicidade do composto miriadenolídeo (AMY) em células Jurkat pela técnica de HFS. As células Jurkat foram tratadas com diferentes concentrações de AMY e incubadas por 24H. A análise foi realizada utilizando à média do controle de diluente. CC – Controle celular; 1 – 0,0001 μ M – Concentração da droga AMY.

Em relação às PBMCs, também, não foi observado efeito tóxico do AMY na concentração de 1 μ M, quando incubadas por 24H, em relação à média do controle de diluente, já que não foi observado um aumento no conteúdo de DNA subdiploide nas células (figura 2.7).

Células PBMC tratadas com AMY por 24H:
Medida da citotoxicidade por citometria de fluxo

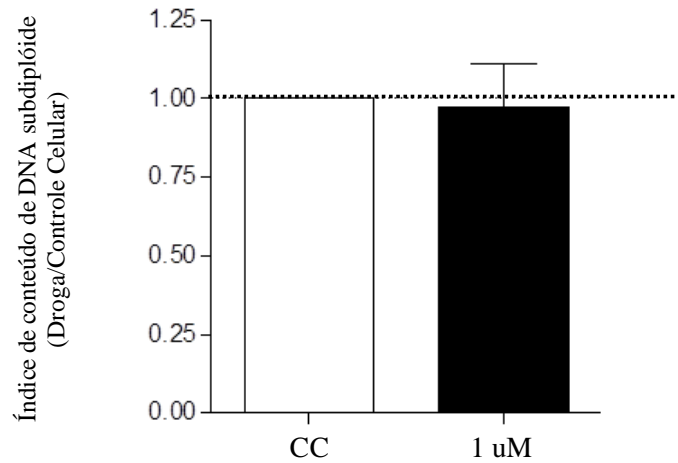


Figura 2.7 - Avaliação do conteúdo de DNA subdiploide de PBMCs tratadas com o miradenolídeo. As PBMC de doadores saudáveis foram tratadas com 1 μ M AMY (n=8), incubadas por 24H e o conteúdo de DNA subdiploide avaliado por citometria de fluxo. A análise foi realizada com o resultado em percentagem em relação à média do controle de diluente (CD).

2.4.2 Acumulação de mRNA de genes virais (qPCR), após o tratamento de células MT-2 e C91-PL com o miradenolídeo

2.4.2.1 Integridade do RNA e curva padrão

Para a realização das PCR quantitativas a qualidade do RNA total foi avaliada pela medida da absorbância em espectrofotômetro (NanoVue Plus, GE Healthcare, Suécia) e pela visualização das bandas 18S e 28S em gel desnaturante de agarose. As amostras utilizadas no estudo tinham uma taxa de absorbância 260 nm/280nm \geq 1.8; 260 nm/230 nm \geq 2.0 e mostraram um perfil com bandas nítidas (figura 2.8) em gel desnaturante de agarose à 1%, evidenciando RNAs íntegros.

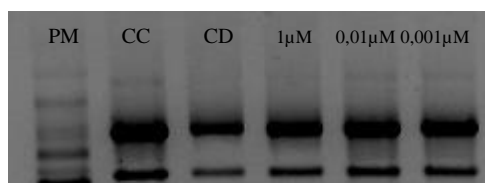




Figura 2.8 - Eletroforese de gel desnaturante de agarose à 1% corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta. Amostras de RNA total (canaletas 1 a 5), mostrando a presença das bandas de RNA ribossomal 18S e 28S.

A análise da atividade antiviral do miriadenolídeo e a avaliação da expressão gênica de *gag-pol*, *tax-rex* e GAPDH foi realizada em duplicata e triplicata, respectivamente, e a quantificação foi aceita quando os *slopes* das curvas padrão estavam entre -3.10 e -3.54 e o $r^2 > 0.98$ (figura 2.9).

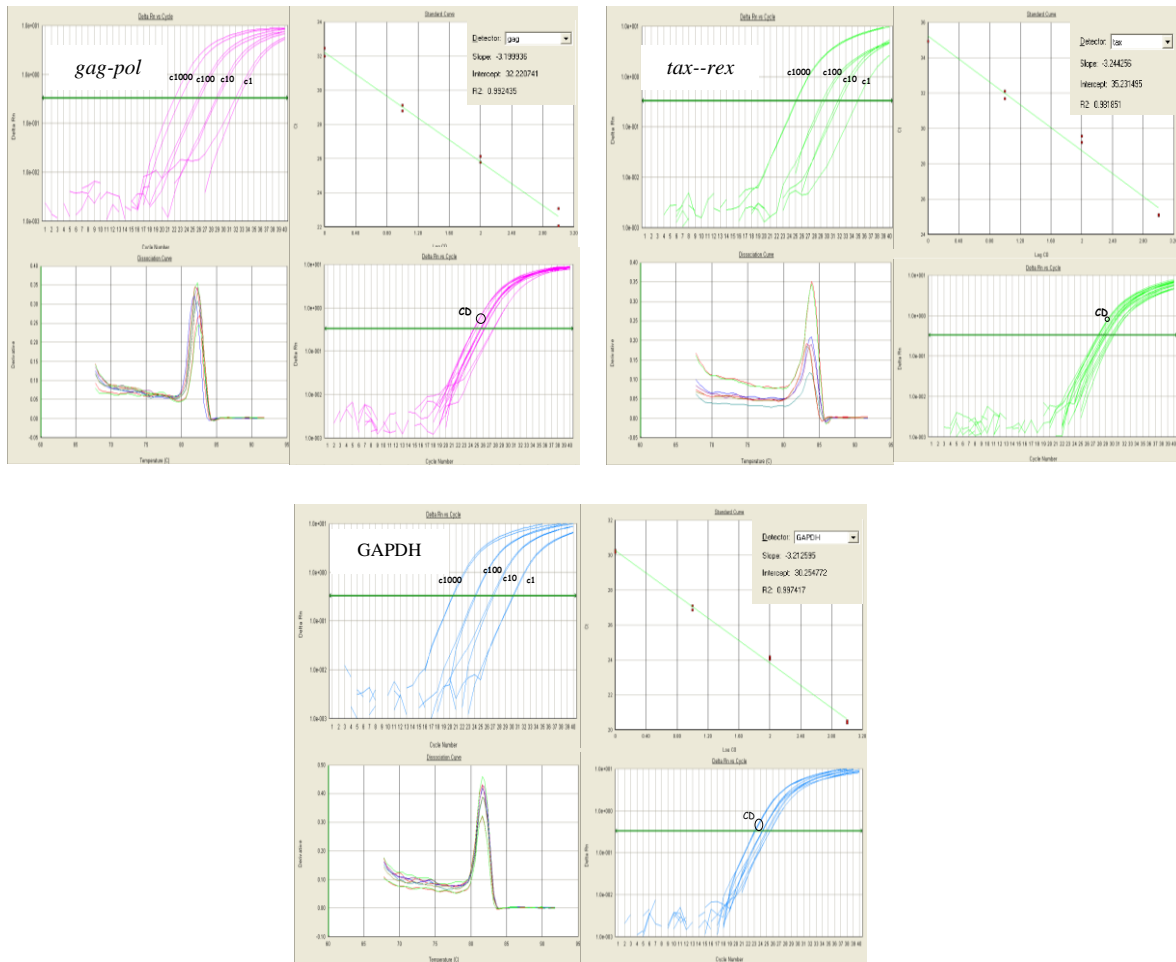


Figura 2.9 - Curva de dissociação das PCR em tempo real para os mRNA de *gag-pol*, *tax--rex* e *GAPDH*. Um único pico é observado na curva de dissociação, o que evidencia a ausência de dímeros de iniciadores ou de produtos inespecíficos.

A análise da acumulação de mensageiros virais por PCR cinética foi realizada utilizando-se RNA total da linhagem MT-2 ou C91-PL incubada com diferentes concentrações de AMY 5; 0,05 e 0,0005 μ M ou 1; 0,01 e 0,0001 μ M por 24H. Foram avaliados os genes *gag-pol*, *rex-tax*, utilizando como normalizador o *GAPDH*.

2.4.2.2 Regulação de mensageiros virais em células MT-2 pós-tratamento com AMY

Na figura 2.10 estão ilustrados os resultados de acumulação dos mRNAs de *gag-pol* e *tax-rex* em relação à acumulação do gene normalizador GAPDH. Os dados foram expressos em valores relativos em relação ao controle de diluente. As análises demonstram que houve inibição na expressão dos genes estudados. O miriadenolídeo foi capaz inibir a expressão dos mRNAs de *gag-pol* em todas as concentrações avaliadas, sendo que a redução foi mais expressiva na concentração de 1 μM , em cerca de 3,33X (figura 2.10 A). Em relação à acumulação dos mRNAs de *tax-rex*, verificou-se uma redução na concentração de 1 μM , expressa em 2,08X (figura 2.10B).

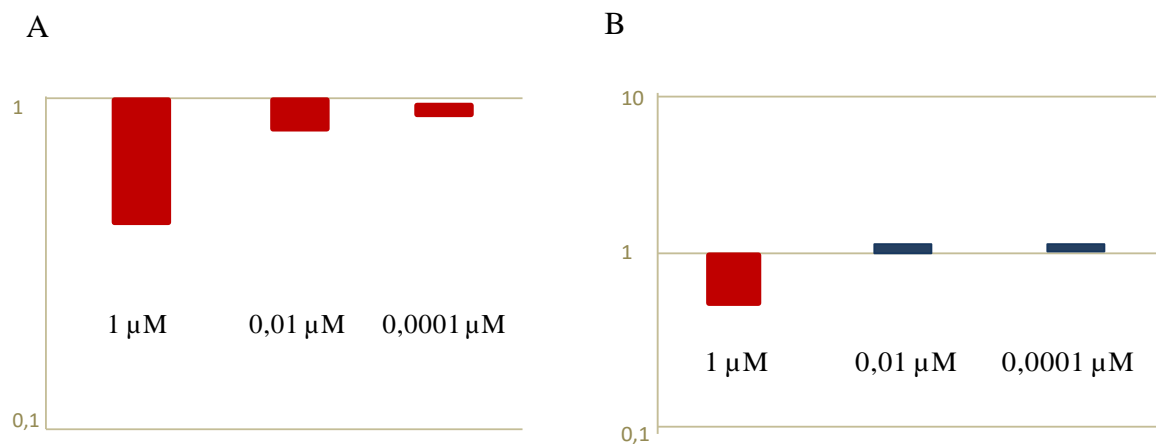
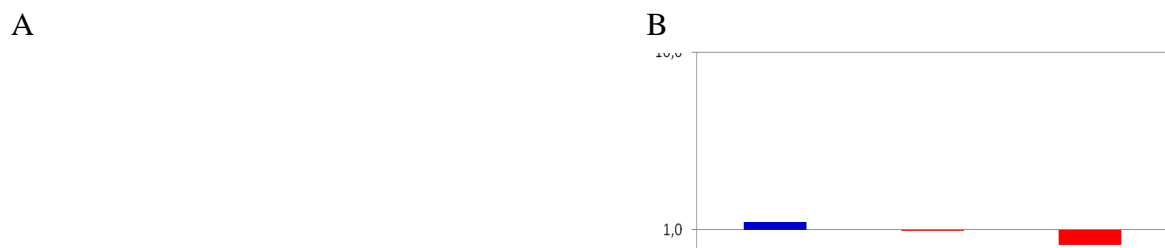


Figura 2.10 - Acumulação de mRNA de *gag-pol* (A) e *tax-rex* (B) em células MT-2 após tratamento por 24H com diferentes concentrações do miriadenolídeo (1-0,0001 μM) por PCR cinética. Os dados representam o valor relativo calculado pela quantificação relativa, baseando-se no controle de diluente (DMSO).

2.4.2.3 Regulação de mensageiros virais em células C91-PL pós-tratamento com AMY

A análise da acumulação dos mRNAs de *gag-pol* e *tax-rex* em células C91-PL tratadas com diferentes concentrações de AMY (1; 0,01; 0,0001 μM) por 24H mostrou um perfil muito distinto quando o mesmo tratamento foi avaliado em MT-2, embora sejam ambas linhagens linfocíticas de perfil fenotípico assemelhado, e revelou que nas concentrações trabalhadas houve uma pequena inibição da expressão gênica viral quando comparou-se quanto ao controle de diluente (Figura 2.11 A, B). A atuação da droga foi um pouco mais efetiva na concentração de 0,0001 μM em relação à diminuição dos genes que codificam proteínas estruturais e regulatórias.



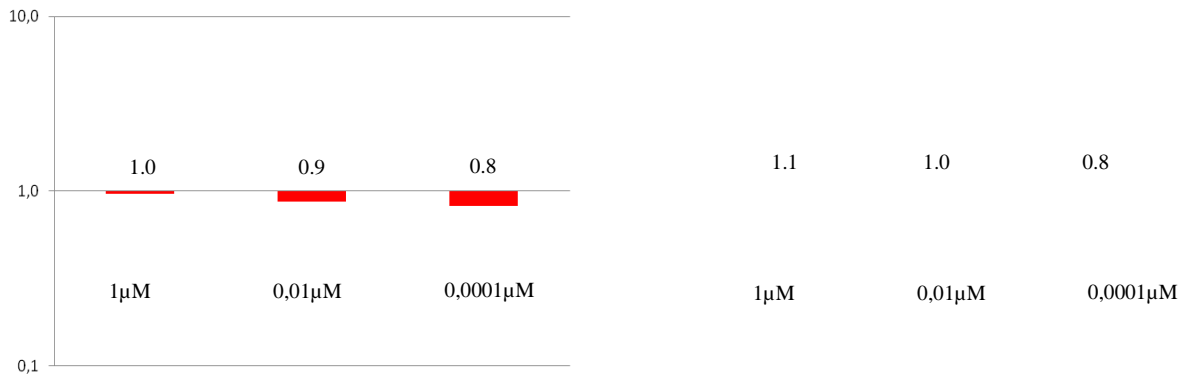


Figura 2.11 - Acumulação de mRNA de (A) *gag-pol* e (B) *tax-rex* em C91-PL após tratamento por 24H com diferentes concentrações de miradenolídeo medida por PCR cinética. Os dados representam os valores relativos calculados pelo método de quantificação relativa a partir da curva padrão, baseando-se no controle de diluente (DMSO).

2.4.2.4 Avaliação do perfil protéico total das células MT-2 a partir de anticorpos monoclonais

Foram realizados ensaios de *Western* para verificar a interferência do composto testado no nível de expressão das proteínas estruturais, p19, p24 e gp46 e da proteína regulatória Tax do HTLV-1, utilizando-se anticorpos monoclonais. As figuras 2.12 A e B mostram que o miradenolídeo é capaz de modular negativamente a expressão protéica das proteínas de Gag. A expressão da proteína de matriz, p19, foi inibida de maneira expressiva em todas as concentrações testadas. Já para proteína do capsídeo, p24, observou-se redução da expressão especialmente nas concentrações de 1 μM e 0,0001 μM. A expressão da proteína de envelope, gp46, foi também regulada negativamente em todas as concentrações testadas, e, de maneira interessante a maior inibição foi observada para a menor concentração testada - 0,0001 μM (figura 2.12 C). A proteína endógena GAPDH utilizada como um normalizador do ensaio foi expresso em todos os experimentos. Em relação à expressão de Tax, esta foi regulada negativamente nas concentrações de 5 μM e 0,05 μM quando se incubou as células com o AMY por 48H (figura 2.12 D).

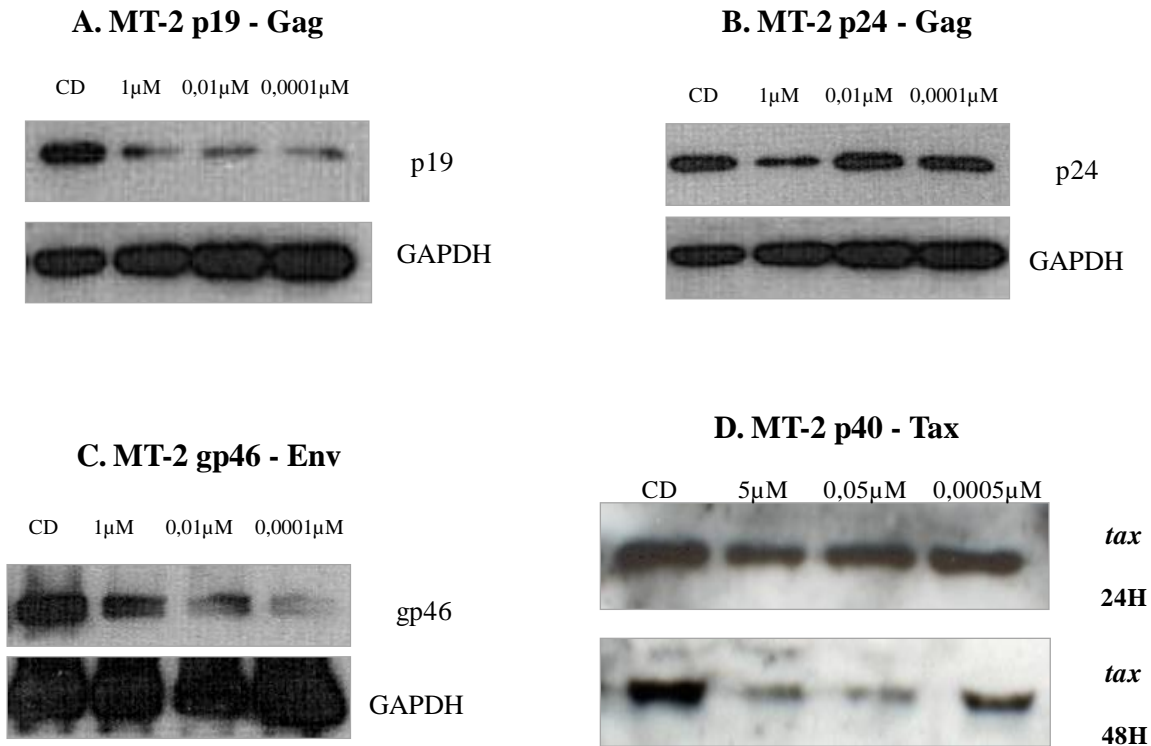


Figura 2.12 - Avaliação da expressão de proteínas virais em células MT-2 tratadas com miradenolídeo. Extrato total protéico de MT-2 tratada com diferentes concentrações do miradenolídeo (5-0,0005µM/1-0,0001µM) foi submetido ao fracionamento eletroforético em gel de SDS-PAGE 12% e posteriormente transferido para membrana de nitrocelulose. Anticorpos primários monoclonais utilizados: A. anti-p19 e anti-GAPDH, B. anti-p24 e anti-GAPDH, C. anti-gp46 e anti-GAPDH e D. anti-Tax.

2.4.2.5 Quantificação densitométrica da expressão protéica em células MT-2 tratadas com o miradenolídeo

As análises densitométricas dos ensaios de Western demonstraram quantitativamente que o miradenolídeo inibiu a expressão das proteínas estruturais e regulatórias do HLTV-1. A proteína de matriz, p19, foi inibida mais de 4X em todas as concentrações analisadas, sendo observada uma inibição de 7,9X concentração de 1µM (figura 2.13 A), ou seja, 87,3% de redução na expressão proteica (figura 2.13 B). A proteína do capsídeo, p24, foi inibida principalmente na concentração de 1µM onde se pode observar 58% de inibição (figura 2.13 B). Em relação à proteína de envelope, gp46, também foi observada uma modulação do miradenolídeo em todas as concentrações testes, sendo que na concentração de 0,0001µM houve uma redução de 7,9X que representa 87,4% de inibição da expressão protéica. (figura 2.13 A e B).

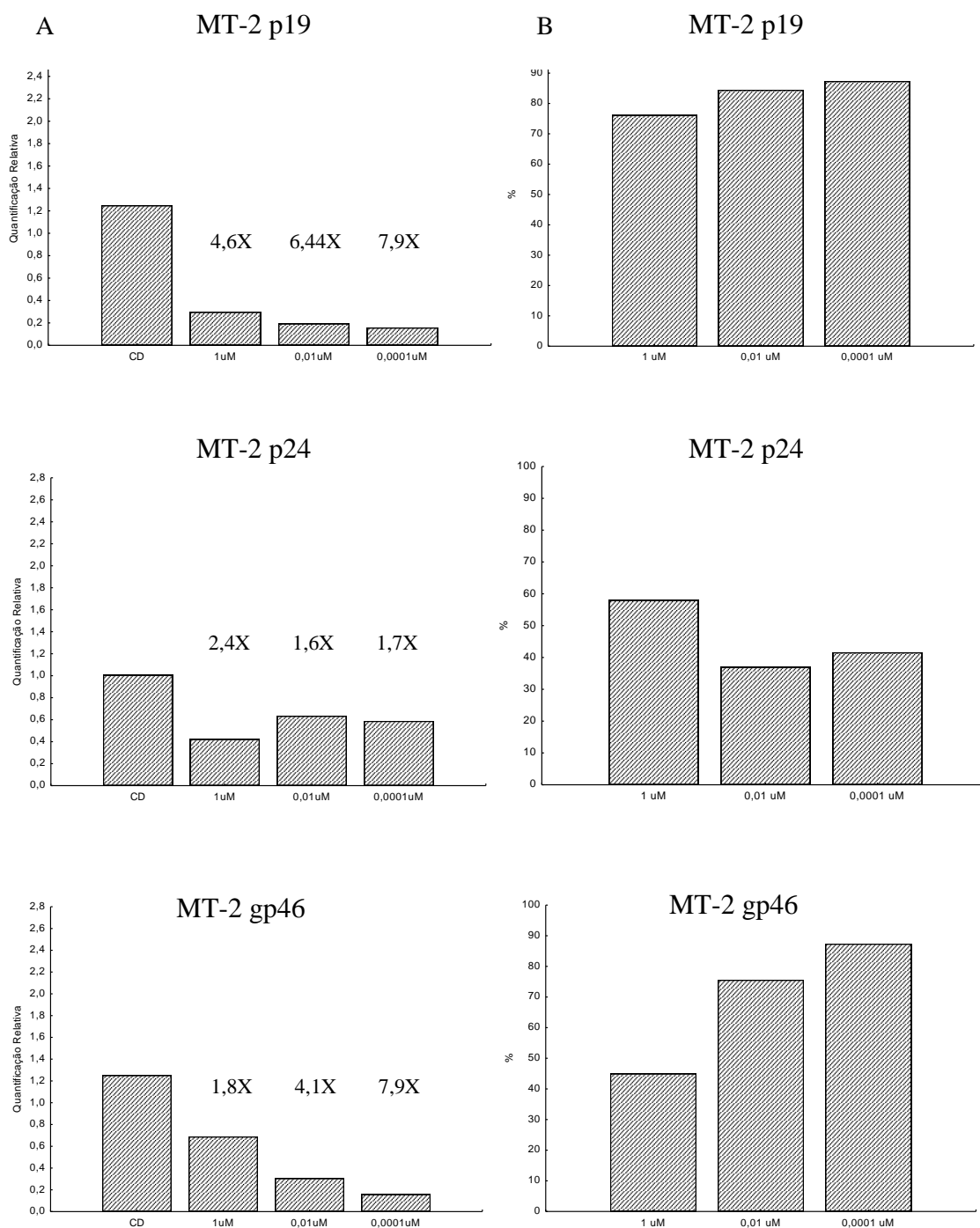


Figura 2.13 - Quantificação da expressão protéica em células MT-2 tratadas com miradenolídeo em ensaio de Western. A análise densitométrica foi realizada no *ImageJ software*. Para avaliação da inibição das proteínas do HTLV-1 o gene GAPDH foi utilizado como normalizador para efeito de comparação das concentrações do composto testado. A. Quantificação relativa da inibição das proteínas estruturais do HTLV-1 em relação ao normalizador GAPDH. B. Porcentagem de inibição das proteínas estruturais do HTLV-1 em relação ao normalizador GAPDH.

2.4.3 Avaliação da regulação de genes envolvidos na imunidade antiviral inata pelo miriadenolídeo em células MT-2 e C91-PL

2.4.3.1 Avaliação da regulação de genes da resposta antiviral inata em células permanentemente infectadas pelo HTLV-1 tratadas com AMY – MT-2 e C91-PL

A avaliação da atividade antiviral do miriadenolídeo em células MT-2 e C91-PL foram realizadas utilizando-se um sistema de PCR em tempo real em arranjo de 84 genes da via da resposta imune inata (PAHS-122A – *Human antiviral response RT² Profiler PCR array - Sabioscience*). O ponto de corte empregado neste trabalho foi uma diferença maior ou igual a 2,0 vezes na regulação positiva ou negativa, utilizando-se a média geométrica de dois experimentos independentes. Utilizando-se os padrões de controle de qualidade do arranjo gênico trabalhado à partir dos normalizadores do ensaio, dos 84 genes testados 50 (60%) foram passíveis de serem analisados nas condições trabalhadas, considerando-se ambas as concentrações trabalhadas. As figuras 2.14 (células MT-2) e 2.15 (células C91-PL) mostram gráficos do tipo *scatter plotter*, onde pode ser visualizado que o tratamento com AMY nas concentrações de 1 μ M e 0,01 μ M modularam a expressão de diferentes genes da resposta imune inata de maneira concentração-dependente, tanto nas células MT-2 quanto na linhagem C91-PL. De acordo com o quadro 2.2 de maneira interessante, observa-se que, embora as duas linhagens utilizadas tenham um fenótipo assemelhado e ambas são infectadas pelo HTLV-1, o número de genes regulados dentre os 84 analisados foi muito distinto entre as mesmas. Porém, ao longo deste trabalho em cada uma das metodologias avaliadas, os eventos biológicos observados nas duas distintas linhagens sempre mostraram diferenças. Foi observado que a maioria dos genes estudados foi regulada positivamente pela ação do miriadenolídeo nas células MT-2, e, embora alguns tenham sido regulados também positivamente nas células C91-PL, somente o CXCL-11 foi regulado positivamente na menor concentração, e, na maior concentração somente três genes foram regulados positivamente, enquanto 11 o foram negativamente.

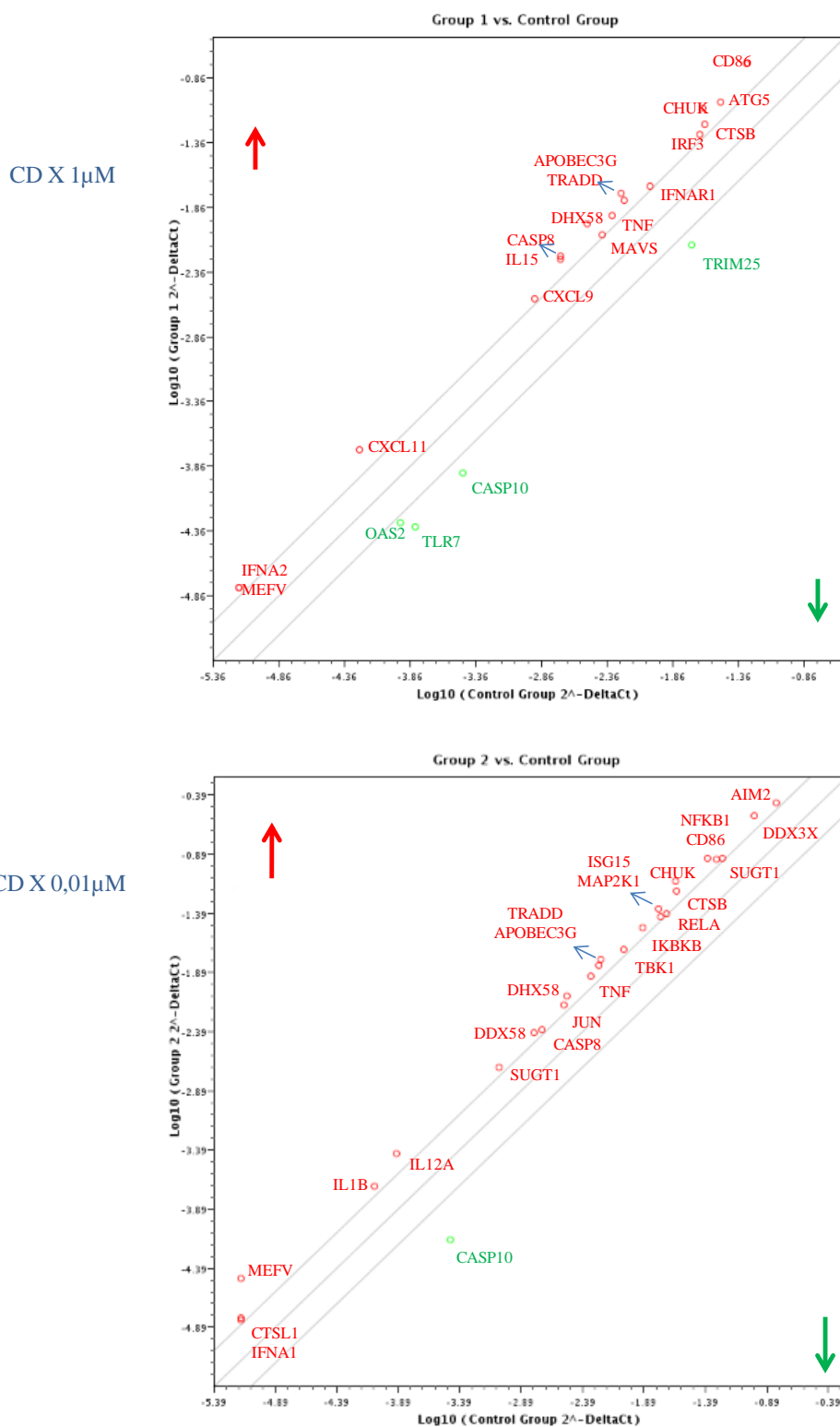
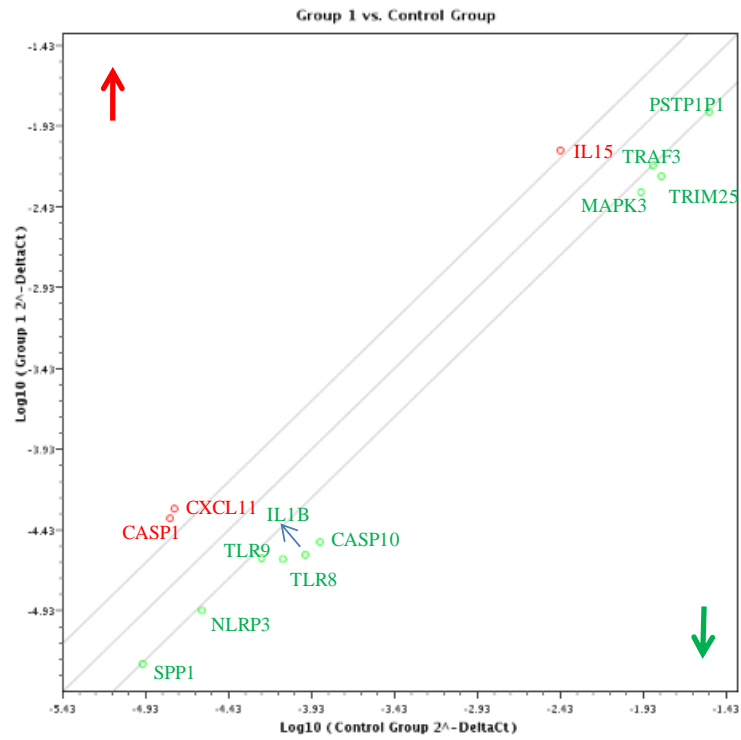


Figura 2.14- Análise da expressão de genes envolvidos na atividade antiviral em células MT-2/HTLV-1+ tratadas com o miriadanolídeo. A e B - Tratamento com 1 μ M e 0,01 μ M de miriadanolídeo, respectivamente em relação ao controle de diluente. Pontos em vermelho indicam genes com regulação positiva de pelo menos duas vezes em relação ao controle de diluente. Pontos em verde indicam genes com regulação negativa da expressão em pelo menos duas vezes em relação ao controle de diluente. Gráficos *scatter-plot* gerados no *software Sabioscience*:

<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>, utilizando média geométrica e ponto de corte de regulação gênica de 2x.

CD X 1 μ M



CD X 0,01 μ M

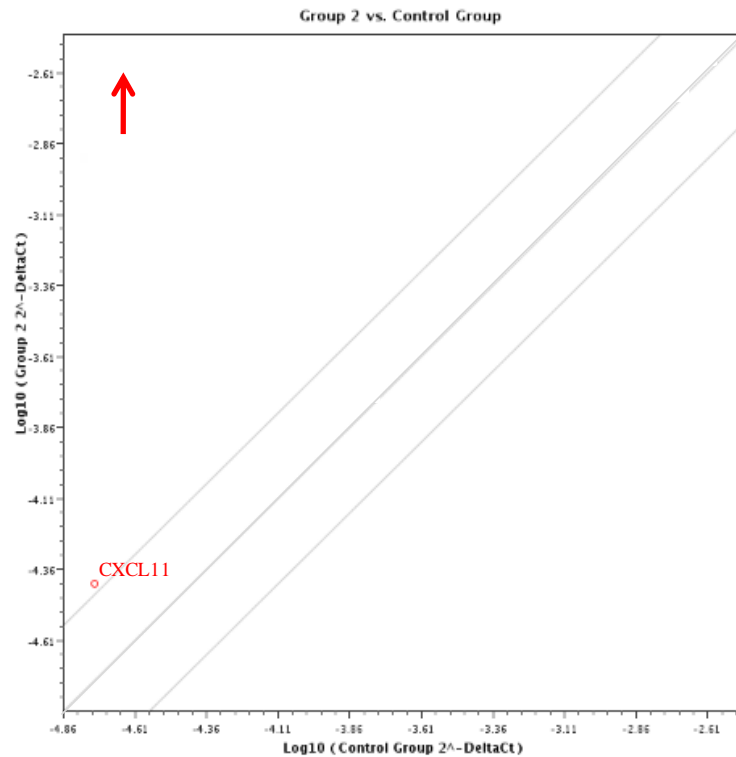


Figura 2.15: Avaliação da expressão de genes envolvidos na atividade antiviral em células C91-PL/HTLV-1+ tratadas com o miriadenolídeo. A e B - Tratamento com $1\mu\text{M}$ e $0,01\mu\text{M}$ de miriadenolídeo, respectivamente em relação ao controle de diluente. Pontos em vermelho indicam genes com expressão aumentada de pelo menos duas vezes em relação ao controle de diluente. Pontos em verde indicam genes que apresentaram inibição da expressão em pelo menos duas vezes em relação ao controle de diluente. Gráficos *scatter-plot* gerados no *software Sabioscience*: <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>, utilizando média geométrica e ponto de corte de regulação gênica de 2x.

Quadro 2.2: Quantificação da regulação de mensageiros para genes antivirais da resposta imune inata

Receptores toll-like	Células trabalhadas				Descrição
	MT-2 1µM	MT-2 0,01µM	C91-PL 1µM	C91-PL 0,01µM	
	<i>Fold regulation</i>	<i>Fold regulation</i>	<i>Fold regulation</i>	<i>Fold regulation</i>	
Genes responsivos: IL15	3	NR	NR	NR	<i>Interleukin 15</i>
Genes responsivos: CD86	4	2	NR	NR	<i>CD86 molecule</i>
Genes responsivos: CXCL11	3	NR	3	2	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 11</i>
Genes responsivos: CXCL9 (MIG)	2	NR	NR	NR	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 9</i>
Genes responsivos: IFNA2	2	NR	NR	NR	<i>Interferon, alpha 2</i>
Genes responsivos: IFNA1	NR	2	NR	NR	<i>Interferon, alpha 1</i>
Genes responsivos: IL12A	NR	3	NR	NR	<i>Interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)</i>
Genes responsivos: IL1B	NR	2	-4	NR	<i>Interleukin 1, beta</i>
Receptores e chaperonas: CTSB	2	3	NR	NR	<i>Cathepsin B</i>
Receptores e chaperonas: TLR7	-3	NR	NR	NR	<i>Toll-like receptor 7</i>
Sinalização à montante: IRF3	2	NR	2	NR	<i>Interferon regulatory factor 3</i>
Receptores e chaperonas: CTSL1	NR	2	NR	NR	<i>Cathepsin L1</i>
Receptores e chaperonas: TLR8	NR	NR	-3	NR	<i>Toll-like receptor 8</i>
Receptores e chaperonas: TLR9	NR	NR	-2	NR	<i>Toll-like receptor 9</i>
Sinalização à montante: CHUK (IKKα)	3	3	NR	NR	<i>Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase</i>
Sinalização à montante: TNF	2	3	NR	NR	<i>Tumor necrosis factor</i>
Sinalização à montante: JUN	NR	2	NR	NR	<i>Jun proto-oncogene</i>
Sinalização à montante: MAP2K1 (MEK1)	NR	2	NR	NR	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>
Sinalização à montante: NFKB1	NR	3	NR	NR	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1</i>

Sinalização à montante: RELA	NR	2	NR	NR	<i>V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)</i>
Sinalização à montante: TBK1	NR	2	NR	NR	<i>TANK-binding kinase 1</i>
Sinalização à montante: MAPK3 (ERK1)	NR	NR	-2	NR	<i>Mitogen-activated protein kinase 3</i>
Sinalização à montante: SPP1	NR	NR	-2	NR	<i>Secreted phosphoprotein 1</i>
Sinalização à montante: TRAF3	NR	NR	-2	NR	<i>TNF receptor-associated factor 3</i>
Receptores NOD-like					
Genes responsivos: IL1B	NR	2	-4	NR	<i>Interleukin 1, beta</i>
Sinalização e receptores: MEFV	2	5	NR	NR	<i>Mediterranean fever</i>
Sinalização e receptores: OAS2	-2	NR	NR	NR	<i>2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa</i>
Sinalização e receptores: AIM2	NR	2	NR	NR	<i>Absent in melanoma 2</i>
Sinalização e receptores: SUGT1	NR	2	NR	NR	<i>SGT1, suppressor of G2 allele of SKP1 (S. cerevisiae)</i>
Sinalização e receptores: CASP1	NR	NR	3	NR	<i>Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)</i>
Sinalização e receptores: NLRP3	NR	NR	-2	NR	<i>NLR family, pyrin domain containing 3</i>
Sinalização e receptores: PSTPIP1	NR	NR	-2	NR	<i>Proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 1</i>
Receptores RIG-I-Like					
Receptores e chaperonas: TRIM25	-3	NR	-3	NR	<i>Tripartite motif containing 25</i>
Receptores e chaperonas: DAK	NR	2	NR	NR	<i>Dihydroxyacetone kinase 2 homolog (S. cerevisiae)</i>
Receptores e chaperonas: DDX58 (RIG-I)	2	NR	NR	NR	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58</i>
Receptores e chaperonas: DHX58	3	3	NR	NR	<i>DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58</i>
Sinalização à montante: ATG5	3	NR	NR	NR	<i>ATG5 autophagy related 5 homolog (S. cerevisiae)</i>
Sinalização à montante: CASP8 (FLICE)	3	2	NR	NR	<i>Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase</i>
Sinalização à montante: CHUK (IKK α)	3	3	NR	NR	<i>Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase</i>
Sinalização à montante: TRADD	3	3	NR	NR	<i>TNFRSF1A-associated via death domain</i>
Sinalização à montante: CASP10 (MCH4)	-3	-5	-4	NR	<i>Caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase</i>
Sinalização à montante: MAVS	2	NR	NR	NR	<i>Mitochondrial antiviral signaling protein</i>
Sinalização à montante: DDX3X	NR	3	NR	NR	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked</i>
Sinalização à montante: IKKB	NR	2	NR	NR	<i>Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta</i>
Via de sinalização do Interferon tipo I					

Genes estimulados por interferon (ISGs): APOBEC3G	3	3	NR	NR	<i>Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G</i>
Genes estimulados por interferon (ISGs): ISG15	NR	3	NR	NR	<i>ISG15 ubiquitin-like modifier</i>
Genes estimulados por interferon (ISGs): IL15	3	NR	NR	NR	<i>Interleukin 15</i>
Via de sinalização: IFNAR1	2	NR	NR	NR	<i>Interferon (alpha, beta and omega) receptor 1</i>
Via de sinalização: IFNA2	2	NR	NR	NR	<i>Interferon, alpha 2</i>
Via de sinalização: IFNA1	NR	2	NR	NR	<i>Interferon, alpha 1</i>
Em vermelho : regulação positiva; em azul : regulação negativa. NR = não regulado (abaixo do ponto de corte utilizado = 2,0)					

De acordo com os dados do quadro 2.2, e, considerando-se os resultados com uma ou outra concentração utilizada, os genes envolvidos nas vias da imunidade inata foram divididos neste arranjo em: **A. genes ligados à via dos receptores do tipo Toll**, onde se observou 19/23 (83%) e 8/9 (89%) de genes regulados para MT-2 e C91-PL, respectivamente; **B. genes ligados à via dos receptores do tipo NOD**, onde observou-se 5/6 (83%) e 4/4 (100%) de genes regulados para MT-2 e C91-PL, respectivamente; **C. genes ligados à via dos receptores do tipo RIG-I**, onde observou-se 12/17 (71%) e 2/2 (100%) de genes regulados para MT-2 e C91-PL, respectivamente; **D. genes ligados à sinalização via IFN do tipo I**, onde observou-se 6/7 (86%), 0/0 (0%) de genes regulados para MT-2 e C91-PL, respectivamente. Assim, considerando-se a metodologia empregada e a linhagem contínua permanentemente infectada com o HTLV-1, MT-2 (onde realmente se observou uma regulação mais expressiva) o tratamento com AMY regulou genes da imunidade antiviral inata em maior escala pelo disparo da via do IFN-I, seguida pela via dos receptores do tipo *Toll* e pela via dos receptores do tipo NOD e receptores do tipo RIG-I. Como mostrado acima, para grande parte dos genes regulados em MT-2, o efeito foi concentração-dependente, porém, cabe destacar que para genes muito importantes no contexto da infecção pelo HTLV-1, CHUK (IKK α), DHX58, TRADD e APOBE3CG a regulação foi igual (3x e positiva) para as duas concentrações do miriadenolídeo utilizadas.

Embora a diferença marcante para os resultados observados entre os dois modelos biológicos infectados pelo HTLV-1 – células MT-2 e C91-PL, de maneira interessante, para os poucos genes que foram negativamente regulados pós-tratamento nas células MT-2, a regulação foi também direcionada no mesmo sentido nas células C91-PL: CASP10, TRIM25, OAS e TLR7.

2.5 DISCUSSÃO

Diferentes estudos sobre a constituição química e as atividades biológicas de espécies vegetais, há muito tempo ocupa espaço relevante em pesquisas científicas, seja pelo simples conhecimento das estruturas moleculares envolvidas na ação medicamentosa das plantas, ou com a intenção de fazer modificações nas estruturas moleculares para adequar as atividades biológicas aos interesses da pesquisa. O emprego de plantas na cura das enfermidades vem sendo descrito desde a origem da humanidade e foi associado a práticas rituais ou mágicas, das quais se reconhecem vestígios até hoje (SCHMIDT *et al.*, 2008).

Segundo Itokawa e colaboradores muitos compostos bioativos foram descobertos e isolados a partir de fontes naturais e são hoje utilizados nas formulações alopáticas. Dos medicamentos utilizados na clínica médica, 25% têm sua origem nas plantas (PHILLIPSON *et al.*, 2007). Embora a descoberta de muitas moléculas com propriedades curativas tenha se originado de investigações com produtos naturais de origem vegetal, a produção em larga escala de muitos desses fármacos requer processos de obtenção de princípios ativos além de modelagem molecular e síntese química (HARVEY, 2008; NEWMAN, GRAGG, 2007). Assim, para o uso correto das plantas como medicamento fitoterápico, se faz necessário o conhecimento das estruturas dos compostos envolvidos na atividade que elas possuem e o descobrimento da substância bioativa que podem levar ao substituto sintético. Ainda, merecem destaque, neste tipo de pesquisa, as modificações estruturais que podem ser feitas nas substâncias isoladas para a quantificação e melhoramento dessa atividade (KNIGHT *et al.*, 2003).

A avaliação do potencial terapêutico das plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas, diterpenos, dentre outros, tem sido objeto de estudos, que comprovaram suas ações farmacológicas através de testes pré-clínicos como cultivos celulares e animais. Muitas destas plantas têm grande possibilidade de virem a ser aproveitadas como agente medicinal (CECHINEL, YUNES, 1998).

Neste estudo foi avaliada a atividade antiretroviral e imunomodulatória do composto miriadenolídeo em células infectadas pelo HTLV-1.

As células permanentemente infectadas pelo HTLV-1 utilizadas neste estudo são células linfocitárias transformadas pelo HTLV-1, e segundo Popovic e colaboradores (1982) estão

intimamente correlacionados. Estudos de caracterização genômica da célula MT-2 demonstraram que esta linhagem apresenta oito provírus do HTLV-1 integrados individualmente, sendo que sete destes são provírus defectivos (NOBUYUKI et al, 1984). Diferentes estudos sobre o HTLV empregam igualmente a MT-2 e a C91-PL para entender os mecanismos de desenvolvimento da infecção (PAIS-CORREIA et al, 2010, MACCHI et al, 2011; WATERS et al, 2011; ROMANOS et al, 2002). Ao longo do desenvolvimento deste trabalho, pode ser observado que, embora mundialmente utilizadas pelos grandes grupos que trabalham com a pesquisa do HTLV, estas duas linhagens celulares linfocíticas humanas permanentemente infectadas pelo vírus, não podem ser utilizadas de maneira comparativa, pois, disparam respostas biológicas diversas em diferentes sistemas.

Para a investigação do potencial antiviral do diterpeno labdano, a primeira estratégia escolhida foi determinar a citotoxicidade do miriadenolideo para as linhagens utilizadas nestes estudos.

A avaliação da citotoxicidade do composto miriadenolídeo foi avaliada por três metodologias diferentes de avaliação de viabilidade celular: avaliação da integridade de membrana pelo método de exclusão do azul de tripan, avaliação da viabilidade celular pelo método colorimétrico de redução do sal de tetrazólio (MTT) e método de análise do conteúdo de DNA subdiplóide, que permite uma medida acurada do conteúdo de DNA.

O método de exclusão de corantes como o azul de tripan é uma metodologia amplamente utilizada para determinar o número de células viáveis presentes em uma suspensão. Este é baseado no princípio de que células viáveis, que possuem a membrana celular intacta excluem certos corantes, como o azul de tripan, eosina, ou iodeto de propídeo, enquanto células mortas, não (STROBER, 2001). Neste estudo, foi possível observar que após o tratamento das células com diferentes concentrações do miriadenolideo ($1\mu\text{M}$ - $0.0001\mu\text{M}$) as células apresentaram-se viáveis em mais de 85%. Estes resultados foram confirmados pelo ensaio de MTT. Este metodologia (MOSSMAN, 1983; DENIZOT, LANG, 1986) avalia a capacidade da enzima succinato desidrogenase de reduzir o substrato MTT a cristais de formazan na mitocôndria da célula e vem sendo empregada em diversos ensaios biológicos como localização subcelular de oxiredutases (FABER et al, 1996), estimativa do crescimento de cultura celular (SCUDIERO et al., 1988), para prever a resposta de fármacos em citotóxicos (ULUKAYA et al., 2004), para avaliar a viabilidade celular (SATO et al., 1996, SHEARMAN, 1996, JIYANG et al.,

2008), entre outros, sendo que a redução do MTT está diretamente correlacionada com o número de células metabolicamente ativas (DENIZOT, LANG, 1986).

Já o método de análise do conteúdo de DNA subdiploide baseia-se na quantificação do DNA celular em células normais e apoptóticas. As células normais apresentam conteúdo de DNA igual a $2n$ ou $4n$, dependendo da fase do ciclo celular em que se encontram, já as células em morte celular por apoptose e/ou necrose tardia apresentará o conteúdo de DNA menor que $2n$, uma vez que os fragmentos de pequeno peso molecular irão deixar o interior do núcleo (NICOLETTI et al., 1991). A escolha desta metodologia foi fundamentada no fato de que células viáveis apresentam a distribuição do conteúdo de DNA normal, podendo-se distinguir suas diferentes fases do ciclo celular (G0/G1, S, G2/M). Células em processo de morte por apoptose apresentam um aumento no conteúdo de DNA subdiploide (sub G0/G1) que esta associada a um aumento na fragmentação do DNA. Os dados demonstraram que não houve aumento do conteúdo de DNA subdiploide e nem alteração do ciclo celular, após tratamento com as diferentes concentrações do miriadenolídeo.

A partir dos resultados obtidos pelas três metodologias, foi possível observar que o miriadenolídeo apresenta baixa citotoxicidade para as células MT-2, C91-PL, Jurkat e PBMCs humanas, nas concentrações estudadas ($1-0,0001\mu\text{M}$). Estes resultados corroboram os relatos de Souza-Fagundes e colaboradores (2003 C) onde foi demonstrado que este diterpeno na concentração de até $7,5\mu\text{M}$ não é citotóxico para linfócitos CD4+ e CD8+ e nem altera a funcionabilidade destas células, como citado anteriormente.

Com os avanços tecnológicos nas últimas décadas, possibilitou-se o aparecimento de um novo ramo da ciência, a biotecnologia, que transformou e revolucionou a investigação científica. Métodos engenhosos de isolamento, análise e manipulação dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) e de proteínas permitiram avanços no conhecimento dos processos biológicos de inúmeras doenças humanas e de metodologias terapêuticas (FREEMAN, GIOIA, 1999).

Após a análise da viabilidade celular das células infectadas e não infectadas pelo HTLV-1, foi realizada a análise da expressão gênica do mRNA *tax-rex* e *gag-pol* por PCR cinética, nas células MT-2 e C91-PL. Segundo Pfaffl (2001) a transcrição reversa seguida de PCR é a metodologia de escolha para a análise da expressão de mRNA. A PCR cinética por sua vez é uma técnica altamente sensível e específica (PFAFFL, 2001; NIESTERS, 2001; MACKAY et

al., 2002; WONG, MEDRANO, 2005) para a quantificação de ácido nucléico viral, sendo atualmente utilizada para a medida da carga proviral em amostras clínicas, indicadora da infecção ativa e interação vírus-hospedeiro e para a avaliação de terapias antiviral (NIESTERS, 2001; MACKAY et al., 2002). Nas linhagens celulares estudadas observou-se uma modulação diferenciada da transcrição gênica, sendo que em ambas as linhagens observou-se um inibição da transcrição do mRNA de *gag-pol* e *tax-rex*. Entretanto, nas células MT-2 foi observado que o tratamento de 24 horas nas distintas concentrações reduziu a expressão dos mensageiros analisados, especialmente na concentração de 1 μ M, sendo na ordem de 3,33X para os genes *gag-pol* e 2,08X para os genes *tax-rex*. Estes resultados apontam que, no modelo estudado, o composto miriadenoilídeo é capaz de interferir com a transcrição de genes virais, especialmente os codificadores de proteínas estruturais e enzimas, certamente influenciando na produção de partículas virais.

Seguindo a modulação no nível transcricional, verificou-se a sua comprovação no nível traducional, onde, em ensaios de *Western* utilizando anticorpos monoclonais anti-HTLV-1, observou-se uma redução expressiva, pós-tratamento de 24H, das proteínas estruturais p19 e gp46 e, em menor escala a p24, sendo que todos os ensaios foram realizados com experimentos independentes, onde foi observado o mesmo efeito biológico. No caso da proteína regulatória Tax nas células MT-2, a redução no tempo de 48 horas para duas das concentrações utilizadas do AMY é muito evidente, embora o cálculo efetivo da redução não possa ser efetivado por ausência da checagem de um gene normalizador.

A expressão citoplasmática de mRNAs não processados e um complexo de mRNAs processados alternativamente de maneira mono ou bicistrônica do HTLV-1 resulta na produção das proteínas do vírion, proteínas regulatórias e acessórias (LI, GREEN, 2007; OLIÈRE et al., 2011). Assim, as proteínas virais são expressas a partir de diferentes processamentos do mRNA (PRINCHER et al., 2003). As proteínas estruturais e enzimáticas Gag, Pol e Pro são expressas como um mRNA não processado (LEE et al., 1984, NAM et al., 1988), sendo que a proteína estrutural Env é expressa a partir de um mRNA processado (PAINE et al., 1994). As proteínas regulatórias, por sua vez, são traduzidas por processamentos alternativos da região pX do genoma viral. A Tax é traduzida a partir da janela de leitura (ORF) IV e a Rex pela sobreposição parcial da ORF III (CERESETO et al., 1997; LI & GREEN, 2007). No curso da infecção pelo HTLV-1, segundo Li & Green (2007) os mRNAs transcritos mais abundantes são os

codificadores das proteínas Gag/Pol/Pro, seguido pelo mRNA das proteínas Tax-Rex e pelo mRNA da proteínas Env.

A principal proteína estrutural do HTLV-1 é a poliproteína Gag, sendo que a sua expressão, na ausência de outras proteínas virais, pode levar a produção e liberação de partículas tipo vírus imaturos (*virus-like particles* – VLPs) (GHEYSEN et al, 1989). Nos retrovírus, as proteínas de Gag apresentam-se como unidades auto-montáveis que são suficientes para a formação e a liberação de partículas virais (BOUARMR et al, 2003; LE BLANC et al, 1999). A poliproteína Gag (p55) é composta por três domínios funcionais: matriz (MA/p19), capsídeo (CA/p24), e nucleocapsídeo (NC/p15), que funcionalmente promovem a montagem e liberação das partículas virais (LAIRMORE et al, 2011; OLIÈRI et al, 2011). Normalmente, após o brotamento ou a liberação de partículas imaturas ocorre a clivagem proteolítica das poliproteínas Gag, desencadeando a maturação do cerne viral. As poliproteínas Gag clivadas pela ação de proteases são responsáveis pela estruturação do núcleo-capsídeo viral. A proteína de matriz, MA, permanece associada ao envelope viral; a proteína do capsídeo, CA, após modificações conformacionais forma o nucleocapsídeo que carrea internamente a proteína NC, como outras proteínas virais e o RNA genômico (BENJAMIN et al, 2004; BRIGGS et al, 2004; LAIRMORE et al, 2011; OLIÈRI et al, 2011).

A partir da tradução do gene *env* é produzido um precursor poliproteico (61 kDa) o qual é glicosilado e clivado pela ação das proteases em duas proteínas: proteína de superfície, SU/gp46 e proteína transmembrana, TM/gp21 (OLIÈRI et al, 2011). A proteína de superfície e transmembrana formam heterodímeros na superfície dos vírions, sendo responsáveis por iniciar a ligação e a penetração na célula hospedeira. A proteína de SU interage especificamente com o receptor da célula hospedeira, e a proteína TM suporta a fusão entre o envelope viral e membrana celular hospedeira permitindo a penetração viral (LAIRMORE et al, 2011).

O HTLV-1 é um vírus complexo, sendo assim, apresenta genes regulatórios, como o gene *tax*. A proteína regulatória Tax apresenta atividade pleiotrópica pela habilidade de interagir com diferentes vias transcricionais e de sinalização (LAIRMORE et al, 2011). A estrutura desta proteína contém importantes domínios de ativação funcionais, através dos quais sofre modificações pós-traducionais como acetilação, ubiquitinação e sumoilação, favorecendo a sua perfeita interação e uso da maquinaria celular e suas vias de disparo de sinalização (LODEWICK et al., 2011). Assim, Tax é capaz de recrutar variados fatores celulares do

hospedeiro para promover a ativação transcricional do promotor da LTR viral, além de promover nas células hospedeiras a ativação permanente da via NFkB, controlando a apoptose, produção de citocinas anti e pró-inflamatórias e regulando o MTOC (MAJOROVITIS et al, 2008, NEJMEDDINE et al, 2009, BERTAZZONI et al, 2011).

No contexto da infecção, os genes e proteínas estruturais e regulatórias são essenciais para o ciclo de multiplicação viral. Visto que miriadenolídeo foi capaz de modular significativamente a transcrição e a tradução de genes virais, estes dados indicam que o composto provavelmente poderá atuar reduzindo a carga proviral do indivíduo infectado pelo HTLV-1.

No organismo, após a infecção viral, os vírus são rapidamente reconhecidos pelo sistema imune inato através dos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs). Diferentes classes dos PRRs reconhecem os componentes virais e diretamente ativam as células imunitárias (CASTANIER et al, 2012). Sendo assim, através da técnica de PCR cinética foi avaliada a expressão de 84 genes responsivos às vias de sinalização de diferentes PRRs: receptores do tipo *toll*, receptores do tipo NOD, receptores do tipo RIG-I e a via de sinalização do interferon tipo I. Esses receptores quando ativados desencadeiam uma cascata de sinalização integrada que leva a desrepressão de genes tais como o fator nuclear kB (NF-kB) dependentes de resposta de citocinas, fator regulador de interferon (IRF) dependentes de resposta INF- α/β , e inflamassoma/caspase-1-dependente de IL-1 (AKIRA, TAKEDA, 2004; MEDZHITOV, 2001; STROBER et al, 2006).

Dentre os 50 genes (quadro 2.2) que apresentaram regulação diferencial nas células permanentemente infectadas pelo HTLV-1, vinte e três (23) são componentes da via de receptores do tipo *toll*, seis (6) são componentes da via de receptores do tipo NOD; dezessete (17) são componentes da via de receptores do tipo-RIG-I e sete (7) da via de sinalização do interferon tipo I. Como dito anteriormente, e, avaliando os diferentes genes de cada via, o tratamento com AMY nas condições trabalhadas regulou os genes da imunidade antiviral inata em células MT-2, em maior escala pelo disparo da via do IFN-I (86%), seguida pela via dos receptores do tipo *Toll* (83%) e pela via dos receptores do tipo NOD (83%), e, menor escala, receptores do tipo RIG-I (71%), mas não menos importante. Neste estudo, destacaremos alguns, para os quais a literatura já aponta algum direcionamento de regulação na infecção viral e/ou regulação do sistema imune.

No presente estudo, em relação ao tratamento das células **MT-2** com o AMY, observou-se, principalmente de maneira concentração-dependente, um aumento da expressão dos genes responsivos aos PRRs. Da via de sinalização ativada pelos receptores do tipo NOD (NLR-*NOD like receptors*) foram estimulados (dose de 1 μ M; dose de 0,01 μ M) os mensageiros de AIM2 (NR; 2), SUGT1(NR; 2), MEFV (2; 5) e IL1B (NR; 2). Como observado, para os genes da via de ativação de NOD, a menor concentração de AMY foi mais efetiva. Os NLRs são proteínas citoplasmáticas que apresentam diferentes funções na regulação da inflamação e vias apoptóticas. Ao reconhecer moléculas endógenas, formam oligômeros que ativam caspases inflamatórias que atuam clivando e ativando importantes citocinas inflamatórias e a via de sinalização de TING et al, 2005; HARTON et al, 2002). Os AIM2s representam sensores citoplasmáticos que reconhecem o DNA viral das células infectadas desencadeando a ativação de complexos pró-inflamatório multiproteico chamados de inflamassomas, que estimulam a liberação das caspases-1 capazes por sua vez, de maturar as citocinas pró-inflamatórias IL-1B e IL-18 (AOSHI et al, 2011; FRANCHINI et al, 2009). O SUGT-1 (*suppressor of G2 allele of SKPI*) é o gene codificador de uma proteína adaptadora altamente conservada encontrada no núcleo e no citoplasma que apresenta diferentes funções biológicas em plantas, leveduras e em mamíferos. Evidências apontam que atua como regulador positivo da via de ativação de NOD1 (CORREIA et al, 2007). Por sua vez, MEFV (o único gene deste grupo regulado positivamente nas duas concentrações de AMY) é um gene humano codificador da proteína pirina que apresenta importante papel na regulação da inflamação. O seu papel regulador é exercido pela interação dos seus cinco domínios com diferentes proteínas regulatórias da via de inflamação que atuam na morte celular, na secreção de citocinas e na sinalização do citoesqueleto (CHAE et al, 2009), vias de grande importância especialmente no contexto da cronificação da infecção pelo HTLV-1.

Os receptores do tipo RIG-I (RLRs) são moléculas de helicases citoplasmáticas sensíveis ao RNA viral, que apresentam em sua estrutura dois CARDS (domínios de recrutamento e ativação de caspases). Os RLRs ativam a transcrição de genes inflamatórios, dependentes do fator transcricional incluindo o fator nuclear kB (NF-kB). O CARD do RIG-1 apresenta uma molécula adaptadora do fator de regulação IPS-1 (IPS-1 ou MAVS), que ativa as vias de sinalização que conduzem a respostas do IFN tipo I dependentes de IRF3/7, e para a expressão dos genes inflamatórios dependente da via NF-kB (YONEYAMA et al., 2005;

ROTHENFUSSER et al., 2005). O tratamento com o AMY estimulou a expressão (dose de 1 μ M; dose de 0,01 μ M) de diferentes elementos de sinalização à montante, ATG5 (3; NR), CASP8 (3; 2), CHUK/IKK α (3; 3), TRADD (3; 3), MAVS (2; NR) DDX3X (NR; 3) e IKBKB (NR; 2); e de receptores e chaperonas dos RLRs, DAK (NR; 2), DDX58/RIG-1 (2; NR) e DHX58 (3; 3). A ligação de proteínas celulares e Tax, leva a uma ativação persistente da via NF κ B, contribuindo tanto para a iniciação e manutenção da malignização em ATL quanto para a manutenção do estado crônico pro-inflamatório em indivíduos com HAM/TSP (LODEWICK et al, 2011). Foi observada a estimulação da molécula IKK α (CHUK) importante no contexto da estimulação das via canônica e não canônica de NF- κ B, bem como do gene codificador da enzima IKK- β (IKBKB) que quando ativada fosforila uma outra proteína inibidora de NF- κ B, I κ B, que liga-se ao NF- κ B para inibir a sua função. As moléculas da família NF κ B, p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50 (NF κ B1) e p52 (NF κ B2), se encontram sob a forma de dímeros ligada à proteína inibitória I κ B no citoplasma (GHOSH, HAYDEN, 2008; SUN, ZHANG, 2007).

Na presença de estímulo, ativa-se um complexo específico de quinases (IKK) que fosforilam I κ B, sinalizando para a sua ubiquitinação e degradação por proteossomas, permitindo assim o transporte dos elementos do NF- κ B para o núcleo, com conseqüente ligação desses nos genes que apresentam a seqüência regulatória GGGACTTTCC junto à região promotora, levando a um aumento na expressão dos genes alvo, os quais agem em elementos envolvidos na resposta inflamatória e imune, estimulando a transcrição (GLEZER et al, 2000, HAYDEN, GHOSH, 2008).

As moléculas ATG-5, CASP-8 e TRADD são importantes no contexto da morte celular (KIM et al, 2011; HE et al, 2012). A molécula ATG-5 é um importante elemento para a formação de vacúolos autofágicos necessários no processo de morte celular autofágica. Está interage com o domínio de morte FADD como um passo necessário para o desencadeando da morte celular (PYO et al, 2005). A CASP-8 pertence à família das caspases que representam os componentes centrais da resposta apoptótica celular. Estas moléculas são recrutadas pelo receptor ativado, juntamente com outras moléculas sinalizadoras e por proteínas adaptadoras tais como TRADD e FADD (POBEZINSKAYA et al, 2008).

A caspase-8 é uma caspase iniciadora ou reguladora, igualmente a caspase 10, que atua na sinalização de moléculas, traduzindo sinais de estresse capazes de ativar as caspases efetoras (CASP-3,6 e 7) (AMARANTE-MENDES, GREEN, 1999; JIN, EL-DEIRY, 2005). A caspase-8 e o seu adaptador FADD são necessários para que a apoptose se realize através dos receptores de morte (STRASSER et al., 2000; ASHKENAZI, 2002). Uma vez ativada, a CASP-8 pode iniciar uma forte proteólise em muitos tipos de células (linfócitos) através da ativação direta da caspase-3. A manutenção do crescimento e ativação celular, com bloqueio da apoptose, garante ao HTLV-1 a proliferação e sobrevivência das células hospedeiras. O tratamento com AMY regulou positivamente de 2 a 3 vezes as moléculas ativadoras de apoptose descritas acima. Hipoteticamente, a partir dos dados aqui analisados *in vitro*, pode ser sugerido que AMY agiria benéficamente no contexto da cronificação em indivíduos infectados.

Por sua vez, o DHX58 é uma molécula chave do sistema imune inato contra a infecção viral, sendo capaz de interagir através do domínio repressor com DDX58, disparando sinais regulatórios negativos após reconhecer a molécula de RNA fita duplos produzidos durante a replicação viral. A proteína DDX3X pertence à família das helicases DEAD, sendo classificadas com RNA helicases por interagir com o RNA (LINDER, 2006). Atua em diferentes passos do metabolismo do RNA, incluindo iniciação, transcrição e processamento, exportação nuclear, controle de tradução do mRNA e regulação da estabilização (SOULAT et al., 2008). Diferentemente de RIG-1 (DDX58), DDX3X não exerce efeito nos PRRs, mas atua à montante na cascata de sinalização da produção do IFN- β . A molécula TBK1 é essencial para a indução do IFN-1 em resposta a patógenos. Logo, DDX3X interage com TBK1 atuando sinergicamente na estimulação da produção do IFN (SOULAT et al, 2008).

Os PRRs dos receptores do tipo *toll* (TLR) estão intimamente envolvidos no sensoriamento de micro-organismos invasores ou em seus componentes estruturais. Os TLRs pertencem à família dos receptores transmembrana do tipo I, caracterizados por um domínio extracelular e um domínio intracelular. O domínio extracelular é composto por uma cadeia rica em leucina (domínio LRR) que está relacionada ao reconhecimento do micro-organismo e com a transdução do sinal, além de ser também necessária para a dimerização do receptor (KOBE, KAJAVA, 2001). Já o domínio intracelular, denominado Toll/receptor IL-1 (TIR), tem a função de mediar interações entre o TLR e proteínas intracelulares envolvidas na transdução do sinal (ARMANT, FENTON, 2002). A ativação das vias de transdução de sinal pelos TLRs induz a

expressão de genes envolvidos na resposta imune do organismo, como citocinas inflamatórias, quimiocinas e moléculas co-estimulatórias (MEDZHITOV, 2001).

No contexto da modulação dos elementos responsivos à via de sinalização dos receptores do tipo *toll* verificou-se a estimulação de diferentes genes associados à via NF- κ B: NFKB1 (3; NR), RELA (NR; 2), IKBKB (NR; 2), IKK α (3; 3) e TBK1(NR; 2). Interessantemente, genes correlacionados com a proliferação e a ativação celular também foram modulados positivamente e de maneira concentração-dependente, como CD86 (4; 2), JUN (NR; 2), MAP2K1 (NR; 2) , IL-15 (3; NR). Destaca-se a IL-15, que atua na regulação da ativação e a proliferação das células NK e células T, além de retroalimentar as células T de memória na ausência do antígeno (BUDAGIAN et al., 2006). Observou-se que o tratamento das células MT-2 com AMY também regulou positivamente na maior concentração a expressão das quimiocinas CXCL9/MIG (2; NR) e CXCL11 (3; NR). Estas quimiocinas normalmente apresentam um padrão de expressão constitutivo e atuam em linfócitos e células do compartimento hematopoiético. A quimiocina CXCL9/MIG apresenta atividade angiostática, além de atuar como potente quimioatratante para células do tipo Th1 e induzir a infiltração de tumores com linfócitos T CD8+. CXCL9/MIG e CXCL10 são responsáveis em parte, pelo efeito antitumoral de IL-12, mediado por INF- γ (KANEGANE et al, 1998; TANNENBAUN et al, 1998).

Os TLRs estão intimamente envolvidos no sensoriamento de micro-organismos invasores ou em seus componentes estruturais. A interação dos TLRs com seus ligantes resulta na ativação de algumas vias sinalizadoras intracelulares, sendo assim, capazes de levar a ativação de processos do sistema imune inato e adaptativo (MEDZHITOV, 2007; KULKARNI et al., 2011). Os TLRs 3, 7, 8 e 9 são especializados em detectar vírus e reconhecer o ácido nucleico, estando presentes em compartimentos intracelulares (HIELI et al, 2003; MATSUMOTO et al, 2003) e detectam ácido nucleico viral pela via endossomal/lissosomal tardia (DIEBOLD et al, 2004; LUND et al, 2004; LUND et al, 2003).

Com relação à via de sinalização do interferon tipo I foi observada a estimulação concentração-dependente da expressão dos genes IFNAR1 (2; NR), IFNA1 (NR; 2), IFNA2 (2; NR), ISG15 (NR; 3) e, igualmente nas duas concentrações de AMY utilizadas, o gene estimulado por interferon APOBEC3G (3; 3). As moléculas IFN tipo I atuam através da estimulação dos seus

receptores IFNAR1 e IFNAR2, sendo estes expressos em todos os tecidos corporais e têm como função principal mediar respostas antivirais. Após reconhecimento do receptor ocorre ativação das quinases TYK2 e JAK1, fosforilação das proteínas STAT1/2 que desencadeiam a transativação dos genes estimulados pelo interferon. O produto destes genes diretamente suprime a disseminação do patógeno, especialmente os vírus, e coopera com a produção de citocinas inflamatórias em células dendríticas para promover a apresentação de antígenos ligando imunidade inata e adaptativa (STARK, 2007; AARONSON et al, 2002; PLATANIAS et al, 2005). A proteína APOBEC3G, codificada por gene de mesmo nome, pertence à superfamília de proteínas APOBEC, enzimas de reconhecida importância na imunidade inata antiviral. Esta molécula interfere com a transcrição reversa, ligando-se ao PBS (*primer-binding site*) e também na integração viral, e, atualmente vem sendo descrita, sua destacada atividade imune antiretroviral, principalmente na infecção pelo HIV (MALIM, BIENIASZ, 2012).

O tratamento de células MT-2 com AMY também regulou positivamente o gene IRF3 (2; NR). A família de fatores reguladores de interferon (*IRF-Interferon Regulatory Factor*) forma uma família de fatores de transcrição que possuem uma extensa homologia em sua seqüência de consenso de reconhecimento do DNA (*DNA-binding domain-DBD*) sendo chamados de IRF-1 a IRF-10 (TAMURA et al, 2008; LOHOFF, MAK, 2005; NEHYBA et al, 2002). De maneira interessante foram identificados em alguns vírus vários homólogos dos IRFs celulares (RUSSO et al, 1996, ALEXANDER et al 2000), comprovando a importância destas moléculas na regulação antiviral. Os membros dessa família de reguladores transcricionais têm em comum a habilidade de se ligar a uma seqüência homóloga do gene do interferon- β e vários genes regulados pelo interferon. A principal função da família IRF é a regulação de respostas imunes, especialmente contra a infecção viral ou de ligação ao Interferon tipo I, resultando na amplificação do ataque antiviral e ativação da defesa adaptativa (NEHYNA, 2002). Os IRFs apresentam funções fisiológicas distintas nos processos biológicos, como nas respostas imunológicas a patogenias, sinalização de citocinas, regulação do crescimento das células e desenvolvimento hematopoiético (NGUYEN et al., 1998; TADATSUGU et al, 2001; ZHANG et al, 2012).

É importante destacar alguns genes codificadores de moléculas importantes no contexto da imunidade inata antiviral que não foram reguladas ou o foram negativamente. Os TLR avaliados neste arranjo gênico (TLR7, TLR8 e TLR9) não foram regulados pelo AMY, ou foram regulados negativamente (como o caso do TLR7 na dose de 1 μ M). O mesmo fenômeno foi

observado para o gene codificador da enzima 2'5'- oligoadenilato sintetase, importante no bloqueio da maquinaria ribossômica pós-infecções virais, onde na maior concentração de AMY foi observada modulação negativa e na menor dose não houve regulação. Para o gene TRIM25 que faz parte da grande família das proteínas de motivo tripartido houve regulação negativa na maior concentração de AMY. Muitas proteínas desta família são induzidas por interferons, sendo alguma delas requeridas para restringir a infecção pelos lentivirus, fenômeno já comprovado para o HIV. Doze proteínas TRIM já foram avaliadas em sua capacidade de subverter a infecção do HIV, alterando desde a entrada do vírus até montagem, liberação e resposta inata à infecção, incluindo a TRIM25 (NDUNG'U, 2011).

A resposta imune tem papel fundamental na defesa contra agentes infecciosos, sendo a resposta mediada pelo sistema imune inato, funcionando em conjunto com o sistema imune adaptativo, mantenedoras da homeostasia do organismo. O fármaco em estudo foi capaz de modular positivamente diferentes genes, importantes na resposta imune inata antiviral, sendo assim, mais um indicativo da sua possível atividade anti-retroviral.

2.6 CONCLUSÃO

As análises de citotoxicidade do composto diterpeno miriadenolídeo demonstraram baixa toxicidade nas linhagens testadas: MT-2, C91-PL, Jurkat e PBMC. A viabilidade foi menor nas células Jurkat em algumas concentrações teste, mas esta se manteve sempre acima de 80% mesmo nesta linhagem leucêmica, nas concentrações avaliadas.

O miriadenolídeo foi capaz de inibir a acumulação de mRNA *gag-pol* e *tax-rex* principalmente na concentração 1 μ M, sendo na ordem de 3,33X para os genes *gag-pol* e 2,08X para os genes *tax-rex*.

Nos ensaios de western verificou-se uma redução das proteínas estruturais e regulatórias do HTLV-1, de maneira concentração-dependente. Na concentração de 1 μ M foram reduzida a expressão das proteínas p19 (87,3%) e p24 (58%), na concentração de 0,0001 μ M a gp46 (87,4%). Estes dados foram evidenciados na linhagem MT-2.

Os dados da PCR cinética utilizando um arranjo de 84 genes da resposta imune inata demonstrou que o composto em estudo foi capaz de modular diferentes elementos responsivos aos receptores de reconhecimento de padrão, dentre eles receptores do tipo *Toll*, NOD e RIG-I e a via de sinalização do interferon tipo I, modulando positivamente, particularmente na linhagem infectada MT-2, pelo menos 41 genes de comprovada importância no disparo da imunidade inata antiviral.

Em todos os experimentos deste estudo verificou-se um comportamento diferenciado das células MT-2 e C91-PL, sendo que, a atividade modulatória do miriadenolídeo foi mais evidenciada nas células MT-2.

Visto que o miriadenolídeo é capaz de inibir diferentes genes e proteínas do HTLV-1 e ativar genes importantes da resposta imune inata, este composto apresentou atividades antivirais relevantes, evidenciando o seu potencial uso no contexto da infecção pelo HTLV-1.

Capítulo 3 – Uso da microscopia eletrônica, de força atômica e confocal na avaliação da atividade antiviral do terpenóide em células MT-2 e C91-PL

“Para tudo há um tempo, para cada coisa há um momento debaixo dos céus:

Tempo para nascer, e tempo para morrer; tempo para plantar,

e tempo para arrancar o que foi plantado;

Tempo para matar, e tempo para sarar; tempo para demolir, e tempo para construir;

Tempo para chorar, e tempo para rir; tempo para gemer, e tempo para dançar;

Tempo para atirar pedras, e tempo para ajuntá-las;

tempo para dar abraços, e tempo para apartar-se.

Tempo para procurar, e tempo para perder; tempo para guardar, e tempo para jogar fora

Tempo para rasgar, e tempo para costurar; tempo para calar, e tempo para falar;

Tempo para amar, e tempo para odiar; tempo para a guerra, e tempo para a paz”

Eclesiastes, 3,1-8

3.1 INTRODUÇÃO

Durante o século 20, muitas pesquisas foram realizadas com o intuito de identificar vírus oncogênicos humanos. Na década de 80, pesquisadores americanos estudando uma linhagem de células T cutânea, descreveram o vírus linfotrópico de células T humanas do tipo I (HTLV-1) (POIESZ et al, 1980). Ao mesmo tempo, pesquisadores japoneses descreveram um tipo de leucemia que apresentava freqüente infiltração do sangue periférico por células pleomórficas e membrana nuclear irregular, denominada leucemia/linfoma de célula T do adulto (ATL). A análise de amostras destes pacientes demonstrou a presença de anticorpos anti-HTLV-1 e o retrovírus HTLV-1. Este foi o primeiro relato associando um retrovírus e um câncer humano (YOSHIDA et al, 1984).

Para o estudo da biologia do novo vírus descoberto, diferentes linhagens foram estabelecidas a partir de células infectadas de indivíduos HTLV-1+ co-cultivadas com células do cordão sanguíneo humano (POPOVIC et al, 1983 A; POPOVIC et al, 1983 B; YOSHIDA et al, 1982). As novas células formadas eram caracterizadas fenotipicamente e a partícula viral identificada por microscopia eletrônica. A partir da microscopia foi demonstrado que a quantidade viral varia entre as linhagens (POPOVIC et al, 1983 A).

Um dos principais objetivos em biociências no momento é obter um profundo entendimento dos processos celulares, pois a célula é a unidade básica da vida. Assim, com a descoberta da microscopia no século XVII houve uma grande revolução nas ciências biológicas revelando o que anteriormente era invisível. Esta revolução científica aconteceu pela junção multidisciplinar da física com a biologia, e as análises de dimensões nanométricas se tornam importantes permitindo visualizar os efeitos de superfícies e suas interfaces (WAKITA et al., 1994; . Atualmente é difundida duas classes microscópicas que permitem acesso à informação de resolução espacial, subnanométrica ou mesmo atômica: as de ponta (STM, *Scanning Tunneling Microscopy* e AFM, *Atomic Force Microscopy*) e as eletrônicas (de varredura, SEM, *Scanning Electron Microscopy* e de transmissão, TEM, *Transmission Electron Microscopy*) (COSTANTINI et al., 2006; HERMAN et al., 1991; LAUHON et al., 2002; WANG et al., 2005; SHINDO, HIRAGA, 1998).

A AFM é uma microscopia de varredura por sonda que foi desenvolvida com o objetivo de se estudar a superfície de materiais não condutores (HADDAD et al., 2007). Na atualidade, vem

sendo também empregada em análises biológicas por analisar essencialmente superfícies de sistemas vivos. Dentro deste contexto, tem aumentado o uso de AFM para análises de formação de biofilme pelos micro-organismos e processos induzidos por infecção viral em células vivas (HANSMA, 2001; ROZATOS et al., 1998; MAH, O'TOOLE, 2001).

As análises por AFM são caracterizada pela varredura da superfície da amostra por uma ponteira (agulha) de formato piramidal (50 nm) ou cônica (10 nm), integrada em uma haste flexível (cantilever) de aproximadamente 100-200 μm de comprimento. A sonda de uma AFM exerce sobre a amostra uma força da ordem das forças interatômicas. O *cantilever* sofre efeito de deflexão por forças de repulsão produzidas a partir da interação entre a agulha e a superfície da amostra, com a sonda podendo afastar-se ou aproximar-se da mesma. As diferenças de deflexão são medidas por um sensor óptico e refletem a topografia da região da amostra que está sendo varrida, transformando os valores em imagens topográficas da superfície bi e tridimensionais (HADDAD et al., 2007; NEVES et al., 1998; SANTOS, CASTANHO, 2004).

A técnica de AFM pode ser operada em três modos diferentes: contato, quando a agulha é mantida em contato suave para não danificar a superfície que está sendo analisada, não contato, quando a agulha se mantém a alguns poucos nanômetros da superfície da amostra e contato intermitente, quando a agulha toca a amostra periodicamente (NEVES et al., 1998; SANTOS, CASTANHO, 2004).

Já na microscopia eletrônica de transmissão, uma onda eletrônica plana é transmitida através de um filme fino (que é a amostra). A interação elétron matéria permite, dadas as condições corretas, a formação de imagens com resolução atômica. A necessidade de um filme fino é um empecilho à obtenção de amostras de qualidade, porém é o que torna a TEM a técnica ideal para analisar pequenos objetos enterrados (interfaces, pontos quânticos, etc) (PETFORD-LONG, CHIARAMONTI, 2008).

Na atualidade, os marcadores fluorescentes são utilizados para detectarem e identificarem micro-organismos, assim como aspectos fisiológicos, tais como expressão de proteínas, atividade enzimática, formação de biofilme, diferenciação de bactérias Gram positivo e Gram negativo, determinação da vitalidade, entre outros (KAGAYAMA et al., 1999; KHEMALEELAKUL et al., 2006). A técnica de microscopia confocal a laser utiliza uma

combinação de recursos de microscopia óptica reunida a princípios de físico-química e computação para a aquisição e processamento de imagens. O sistema utiliza uma fonte de laser para promover a excitação de fluoróforos. Os feixes de luz do laser podem se difundir através das células, detectando sua estrutura interior e exterior formando várias imagens em 2D. Todas as imagens em 2D podem ser sobrepostas, e fotografias em 3D são produzidas (KAGAYAMA et al., 1999).

O descobrimento do HTLV-1 e a correlação com patologias humanas perfazem mais de três décadas, entretanto, até o momento não há uma cartilha terapêutica definida para o tratamento das doenças inerentes a esta infecção. Visto a grande morbidade e a mortalidade associadas ao HTLV-1 e a acurácia das técnicas de microscopia, este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antiviral do composto miriadenolideo, um possível fármaco, em células permanentemente infectadas pelo HTLV-1, por microscopia.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antiviral e imunomodulatória do miriadenolídeo em células infectadas pelo HTLV-1 por microscopia.

3.2.1.1 Objetivos específicos

- Quantificar e avaliar a morfologia as células MT-2 e C91-PL tratadas com o miriadenolídeo por MET - Microscopia eletrônica de transmissão;
- Analisar a morfologia e quantificar os vírus das células MT-2 tratadas ou não com o composto miriadenolídeo por AFM - Microscopia de força atômica;
- Avaliar a expressão de proteínas virais e celulares com o uso de anticorpos monoclonais em células MT-2 utilizando a microscopia confocal.

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 Avaliação por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) da atividade antiviral do composto AMY em células HTLV-1+.

A atividade antiviral do miriadenolídeo foi avaliada pela técnica de Microscopia Eletrônica de transmissão. Para tal, 1×10^6 células/mL de MT-2 e C91-PL foram cultivadas na presença e na ausência de $1 \mu\text{M}$ de miriadenolídeo. Após 24H de incubação, as células foram lavadas com RPMI sem soro e fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 por 18H a 4°C. Em seguida, as células foram centrifugadas a 400 g por 5 minutos a 4°C e então, lavadas com tampão cacodilato, pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1%, desidratadas em acetona e processadas para microscopia eletrônica de transmissão convencional. Os cortes ultrafinos foram visualizados em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2 20 (FEI), do Centro de Microscopia da UFMG. Todo o processamento das amostras para microscopia eletrônica foi realizado pelos técnicos do Centro de Microscopia da UFMG.

3.3.2 Análise por Microscopia de força atômica (AFM) da atividade antiviral do composto AMY em células HTLV-1+.

Para análises por Microscopia de Força Atômica (*Atomic Force Microscopy* - AFM), 2×10^5 células MT-2 foram incubadas com $1 \mu\text{M}$ de miriadenolídeo ou sem o composto (controle celular) por 24 horas. Após a incubação, as células MT-2 foram fixadas em lamínulas de mica (Ted Pella, Inc.), previamente clivadas. As células MT-2, então, foram centrifugadas utilizando o rotor de Cytospin (Jouan, USA) por 10 minutos a 1.000 g, 18°C. A caracterização por Microscopia de Força Atômica procedeu-se em temperatura ambiente operando no modo de contato intermitente (*tapping mode*) utilizando-se um microscópio Multimode IIIa monitorado por um controlador *Nanoscope III*d, ambos produzidos por Bruker AXS (Santa Barbara, USA). As imagens topográficas e de contraste de fase foram obtidas simultaneamente utilizando-se sondas NSC18 MikroMasch (San José, USA) com comprimento de $230 \mu\text{m}$, raio de curvatura de 10nm, uma frequência de ressonância de 60-90kHz e constante de mola de 2-5N/m com velocidade de varredura de uma linha por segundo. A caracterização das imagens quanto ao tamanho e profundidade das estruturas celulares e virais foram medidas utilizando-se o *software* do equipamento.

3.3.3 Avaliação da expressão proteica do HTLV-1 em MT-2

A avaliação da expressão proteica por microscopia confocal procedeu-se utilizando 2×10^5 células MT-2 tratadas com $1 \mu\text{M}$ de miradenolídeo ou o controle celular. Após o tratamento, estas foram lavadas duas vezes com PBS 1X gelado e em seguida fixadas com paraformaldeído 4% em PBS 1X por 10 minutos, a temperatura ambiente. Após fixação, as células foram mantidas em PBS 1X, a 4°C , até o processamento para microscopia confocal. As células foram novamente submetidas a lavagem com PBS 1X acrescido de 2% de SFB e após centrifugação a 1000 g por 5 minutos a 4°C , a massa celular formada foi ressuspensa em PBS 1X acrescida de 3% de BSA e depositadas sob lâminas estéreis previamente tratadas com 0,01% de polilisina, em centrífuga cytospin (*Shandon*), a 100 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Após serem transferidas para câmara úmida protegida da luz, as células foram permeabilizadas ou não com 0,2% de Triton X-100 em PBS 1X acrescido de 3% de BSA, por 5 minutos a temperatura ambiente. Após este período, as células foram lavadas com PBS 1X acrescido de 3% de BSA. Para evitar ligações inespecíficas, as lâminas foram bloqueadas com PBS 1X acrescido de 3% de BSA e 2% de SFB por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS 1X acrescido de 3% de BSA e incubadas, por 50 minutos a temperatura ambiente em câmara úmida, com anticorpo primário preparado em PBS 1X acrescido de 3% de BSA, nas seguintes diluições: anti-p19, 1:25; anti-p24, 1:25; e anti-gp46, 1:50. Após lavagem com PBS 1X acrescido de 3% de BSA, as células foram incubadas, por 30 minutos a temperatura ambiente em câmara úmida, com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488 (*Molecular Probes*), diluído 1:400 em PBS 1X acrescido de 3% de BSA. A seguir, as células foram novamente lavadas em PBS 1X acrescido de 3% de BSA e tratadas com faloidina conjugada a rodamina (aprox. $6,6 \mu\text{M}$ em metanol, *Molecular Probes*), na diluição 1:50, por 20 minutos a temperatura ambiente em câmara úmida. Logo após, as células foram lavadas com PBS 1X acrescido de BSA 3% e incubadas com DAPI (diamidino-2-fenilindol, Sigma-Aldrich Co.) 100 mg/ml preparado em PBS1X acrescido de Triton 0,2%, por 10 minutos a temperatura ambiente em câmara úmida. As células foram então lavadas 3 vezes em PBS 1X e montadas com lâminula utilizando-se uma gota de Mowiol (Sigma-Aldrich Co.), previamente aquecido a 72°C por 15 minutos, para melhor preservação dos fluoróforos. As lâminas prontas foram guardadas por 24 horas a 4°C protegidas da luz e depois congeladas a -20°C até o momento da análise. As células foram analisadas ao microscópio confocal Laser Scanning Microscope (LSM) 510 META (Zeiss), do Centro de Microscopia Eletrônica do ICB

(CEMEL – ICB - UFMG). Imagens representativas dos campos analisados foram obtidas e processadas através dos *softwares* LSM 510 (Zeiss) e *ImajeJ* (NIH).

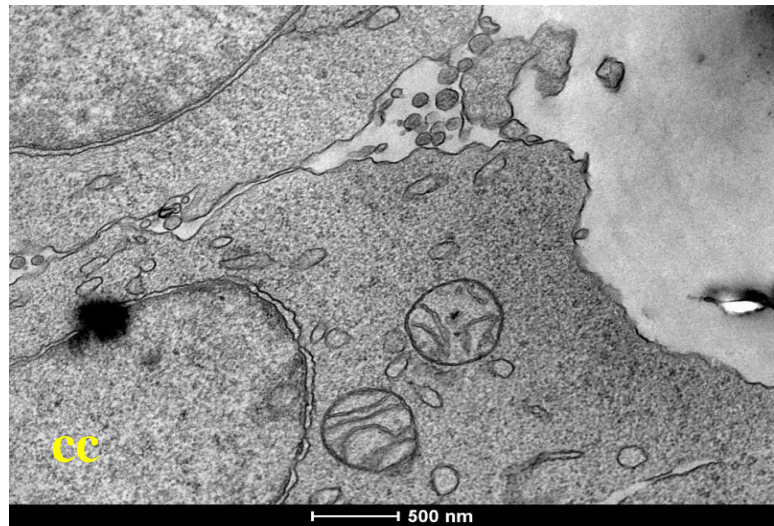
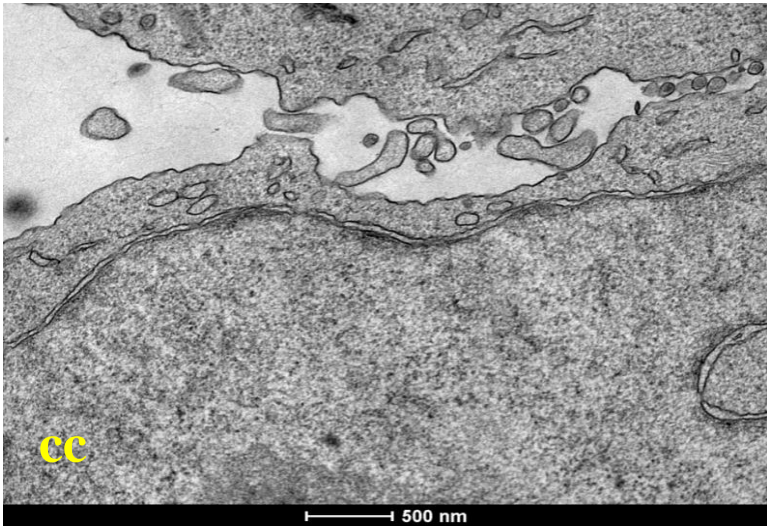
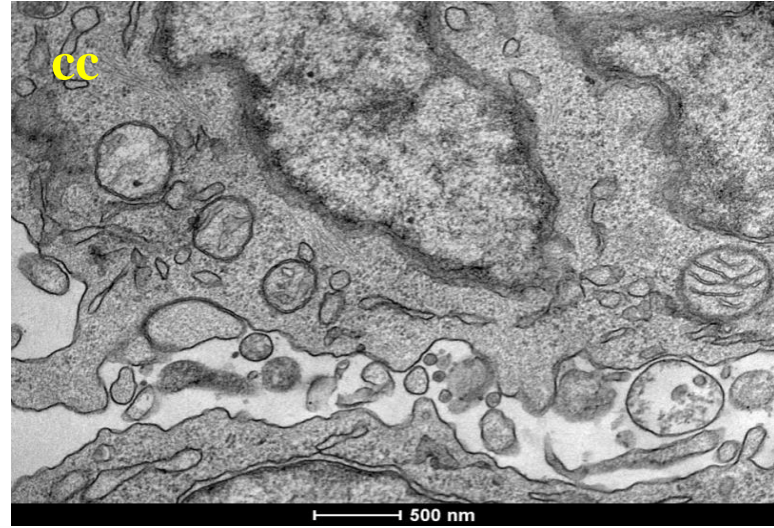
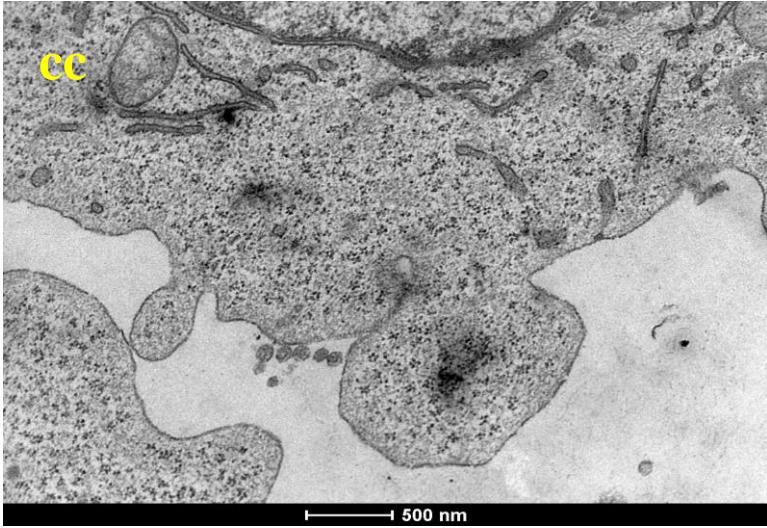
3.4 RESULTADOS

3.4.1 Análise da atividade antiviral do composto AMY em células HTLV-1+ por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

3.4.1.1 MET em MT-2

Após as análises no nível transcricional e traducional, a atividade antiviral do miriadenolídeo foi investigada pelo método acurado de microscopia. As partículas do HTLV-1 não são consideradas pleomórficas, porém, tem sido mostrado por microscopia eletrônica que as mesmas possuem algumas diferenças morfológicas, provavelmente relativas ao último processamento para a maturação efetuado pela protease pós-brotamento, levando ainda à variações no tamanho. Porém, as análises de MET mostram que esta variação morfológica ocorreu de forma mais acentuada nas células tratadas em relação ao controle não tratado (figura 3.1). As células que foram tratadas com o miriadenolídeo apresentaram um maior número de partículas amorfas e irregulares, provavelmente defectivas (figura 3.1), indicativo de provável defeito na morfogênese. Em relação ao tamanho da partícula viral, as análises quantitativas, medidas efetuadas com o uso de *software* livre (*Gwyddion* – <http://gwyddion.net>), demonstraram que as partículas presentes nas células controle e células tratadas não apresentaram grande variação no tamanho. Foram medidas 412 partículas (229 em células tratadas e 183 em células controle), onde as partículas produzidas nas células controle variaram de 53 a 212 nm e as produzidas em células tratadas variaram de 41 a 171 nm (figura 3.2).

As micrografias eletrônicas também revelaram a presença de diferentes estruturas amorfas envoltas por membranas, preenchidas por partículas virais em diferentes estágios de maturação, tanto nas células controle quanto nas células tratadas com o composto (figura 3.3).



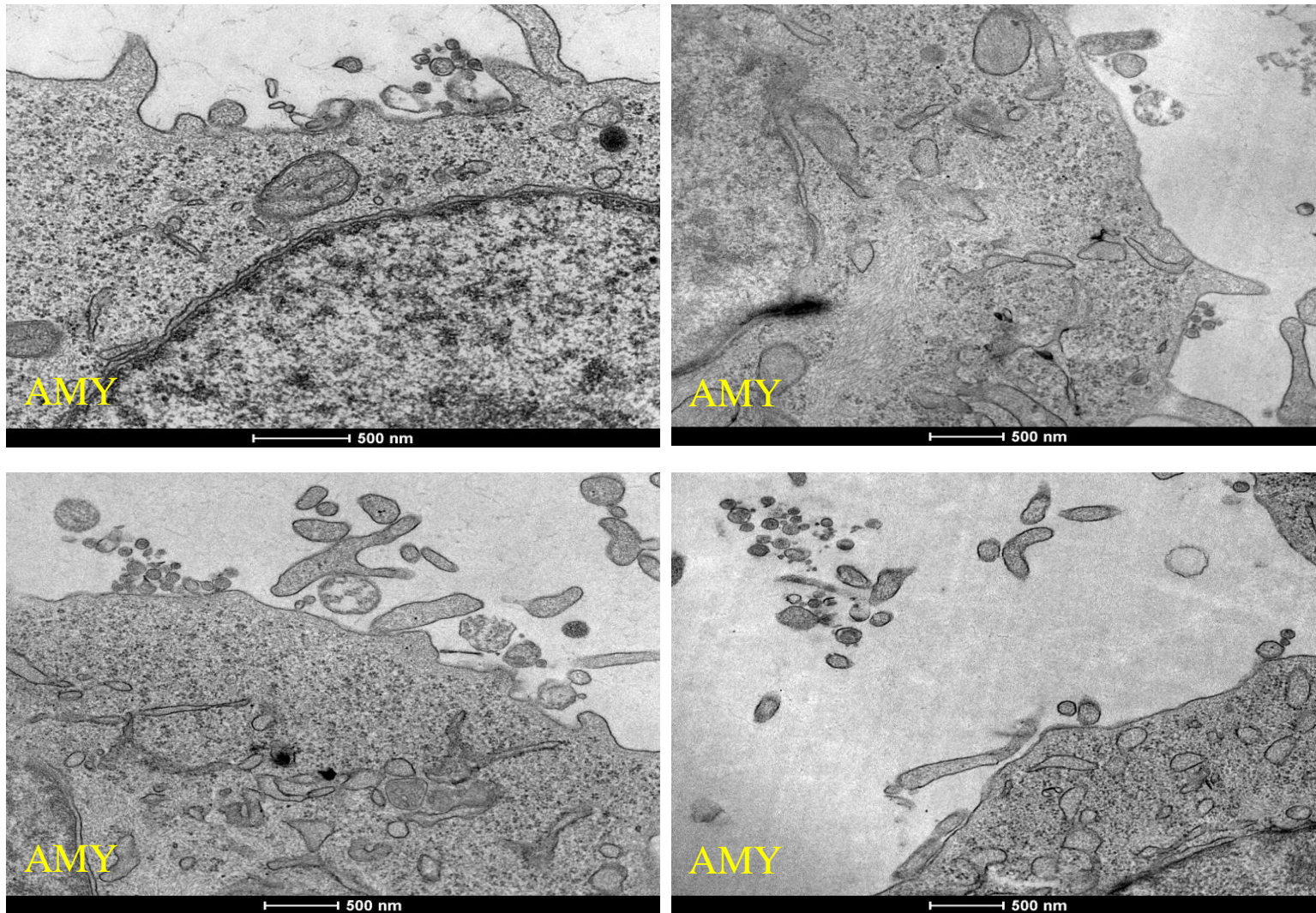
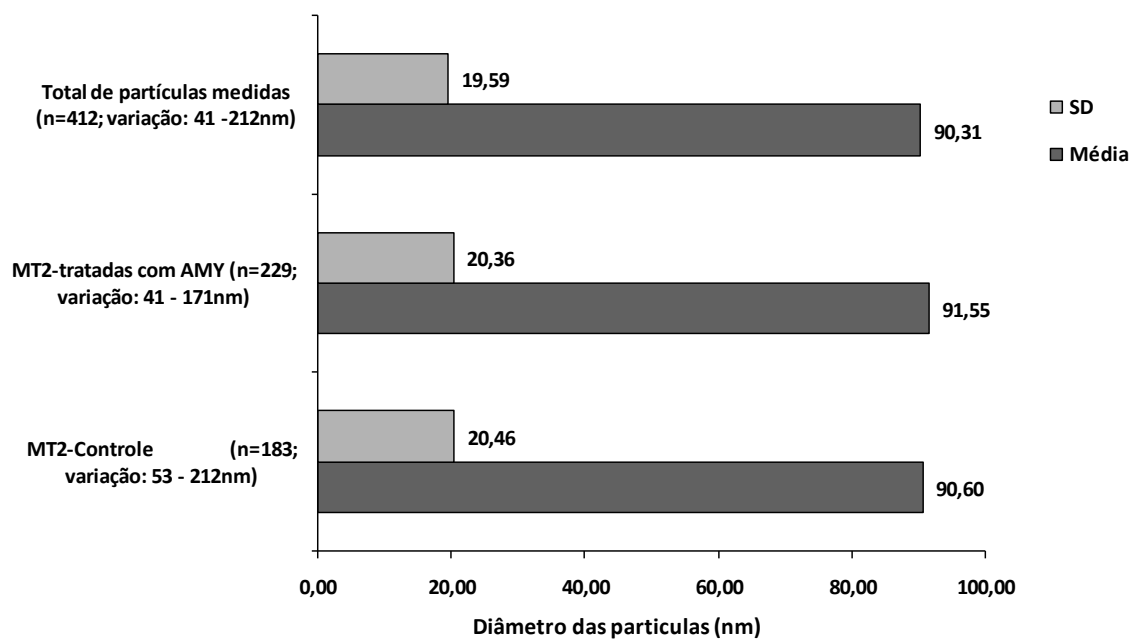


Figura 3.1 - Microfotografias eletrônicas mostrando partículas do HTLV-1 em células MT-2, tratada ou não com o composto terpênico. As células tratadas com AMY apresentam uma maior variação morfológica nas partículas virais produzidas em comparação com as partículas do controle não tratada.

Tamanho das partículas de HTLV-1 em MET



Programa utilizado na medida de partículas: GWYDDION - Free and Open Source software for Scanning Probe Microscopy (<http://gwyddion.net/>)

Figura 3.2 - Análise quantitativa das partículas do HTLV-1 em células MT-2 tratadas ou não com o miriadenolídeo por MET.

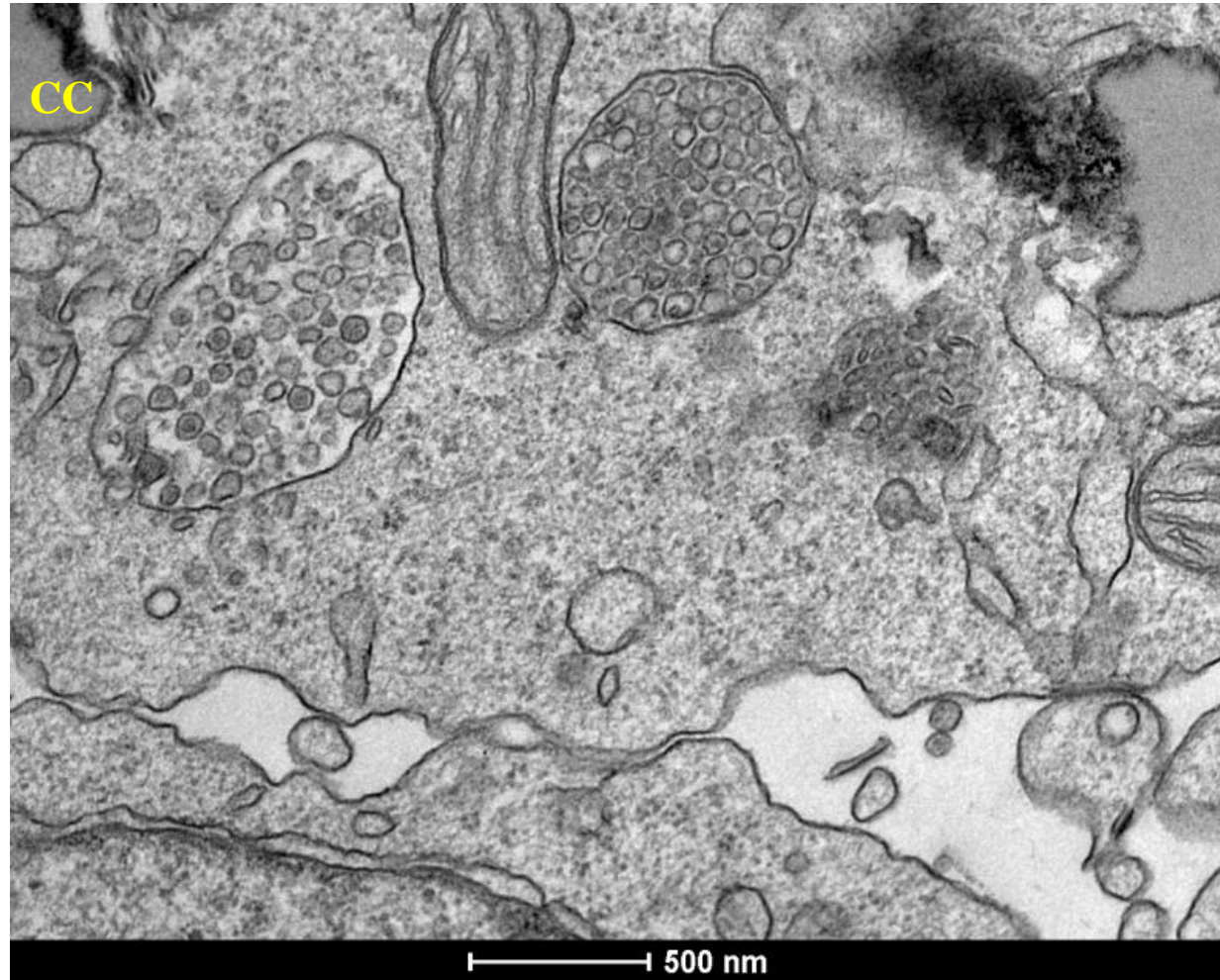
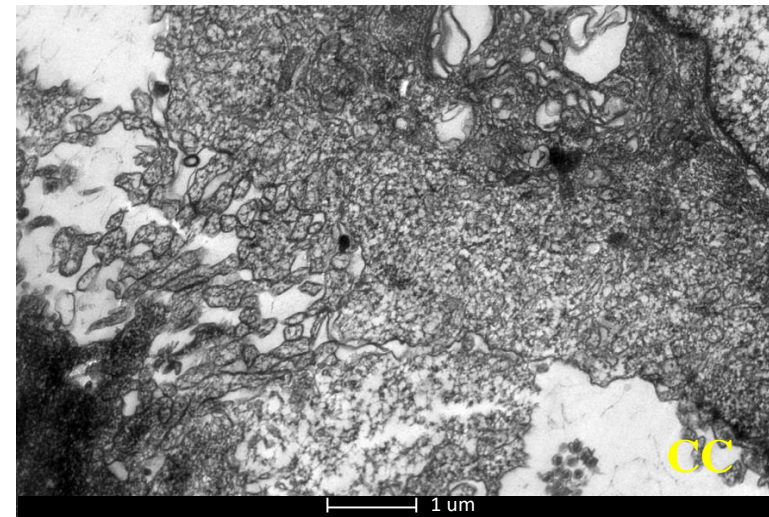
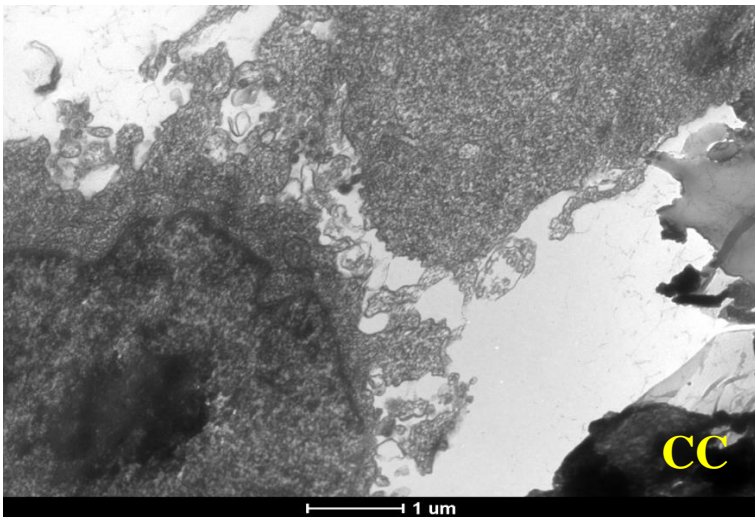
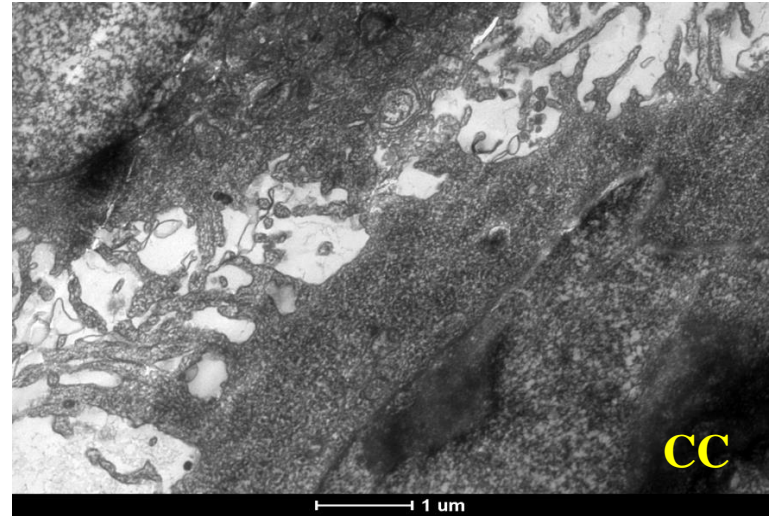
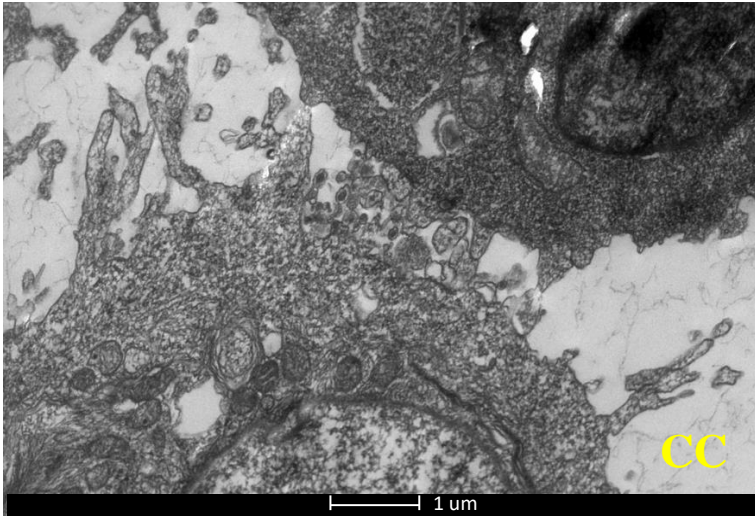


Figura 3.3 - Estruturas envoltas por membranas presentes no citoplasma de células MT-2, apresentando partículas virais em diferentes estágios de morfogênese e maturação.

3.4.1.2 MET em C91-PL

As células C91-PL foram igualmente analisadas por MET e observou-se, como para as células MT-2, uma variação morfológica das partículas virais nas células tratadas com o miriadenolídeo em comparação ao controle sem tratamento. As partículas virais apresentam tamanho diferenciado e apresentam-se desuniformemente (Figura 3.4). Foram medidas 131 partículas (108 em células tratadas com AMY e 23 em células controle) onde as partículas produzidas nas células controle variaram de 84 a 141 nm e as produzidas em células tratadas variaram de 80 a 261 nm, portanto, as análises quantitativas demonstraram que as partículas presentes nas células controle e células tratadas apresentam tamanho relativo diferente conforme observado nas análises morfológicas, sendo a média do tamanho de 110,48 nm para as partículas do controle e 136,11 nm para as partículas das células tratadas com AMY (figura 3.5). Nesta linhagem celular também foi observada a presença de corpos vesiculares com diferentes partículas virais (Figura 3.6).



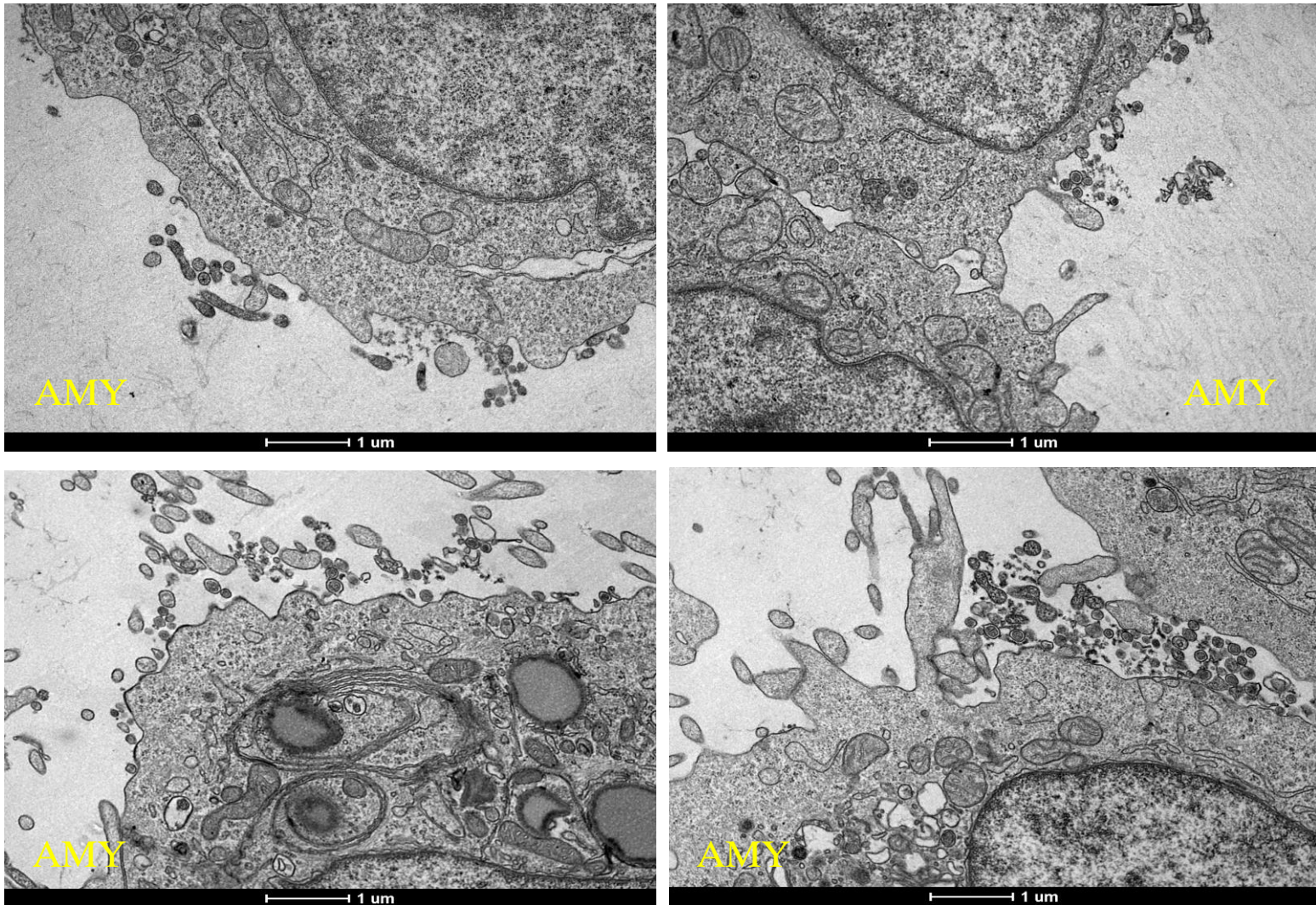
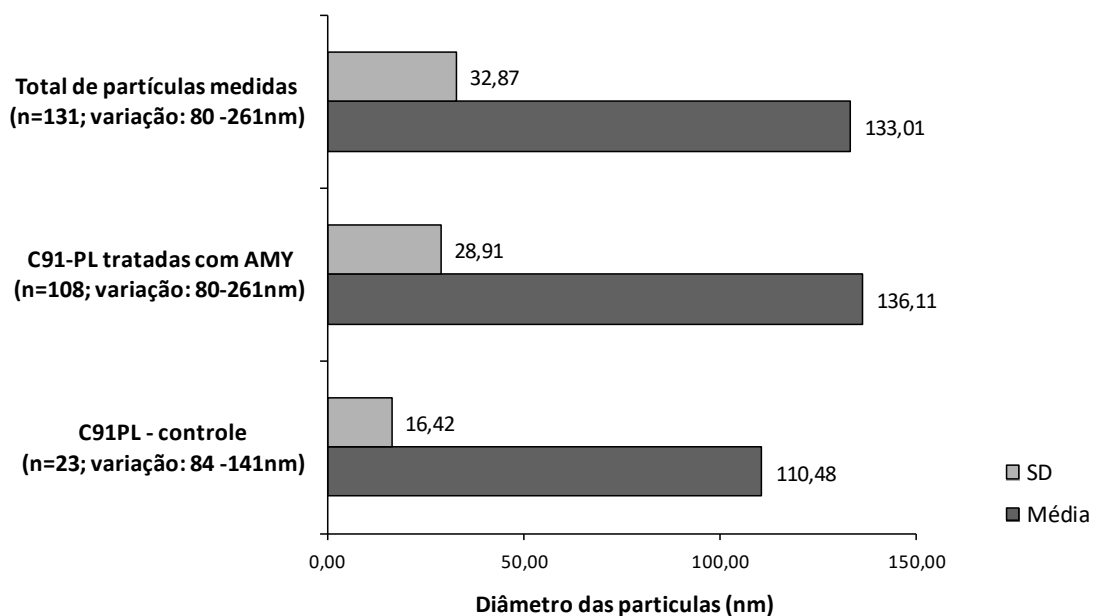


Figura 3.4 - Micrografias eletrônicas demonstrando partículas do HTLV-1 em células C91-PL. As células tratadas com AMY apresentam um maior número de variações morfológicas nas partículas virais produzidas em relação ao controle não tratado.

Tamanho das partículas de HTLV-1 em células C91PL medidas por MET

Programa utilizado na medida de partículas: GWYDDION – Free and Open source software for Scanning Probe Microscopy (<http://gwyddion.net/>)

Figura 3.5: Avaliação quantitativa das partículas do HTLV-1 em células C91-PL tratadas ou não com o miriadenólídeo por MET.



Figura 3.6 - Estrutura envolta por membrana presente no citoplasma de células C91-PL, apresentando diferentes estágios de maturação viral.

Um fato interessante observado, em ambas as linhagens estudadas, é a presença de fibras de actina em grande quantidade ao longo do citoplasma celular, associada aos locais de brotamento em proximidade às partículas virais (figura 3.7).

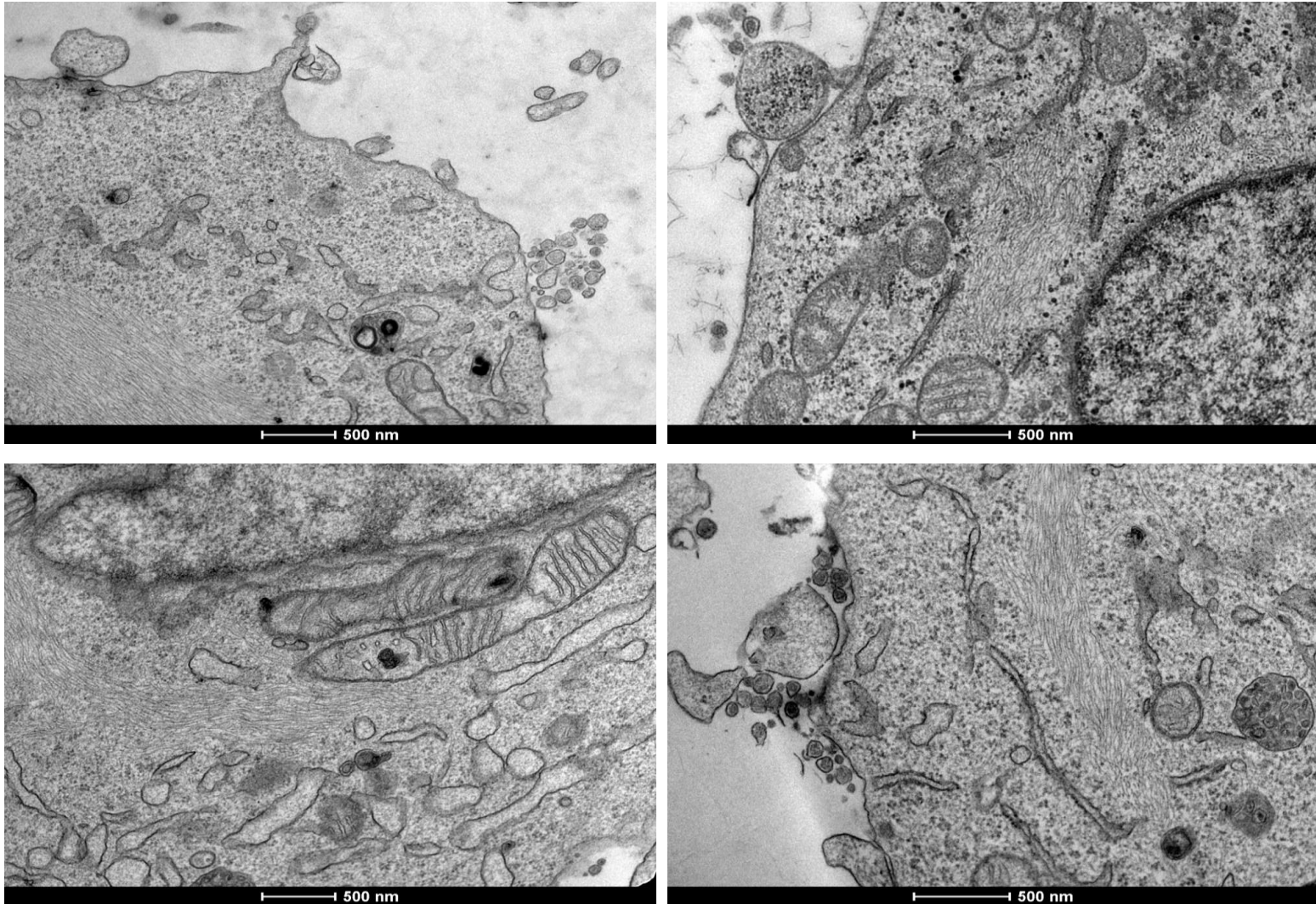
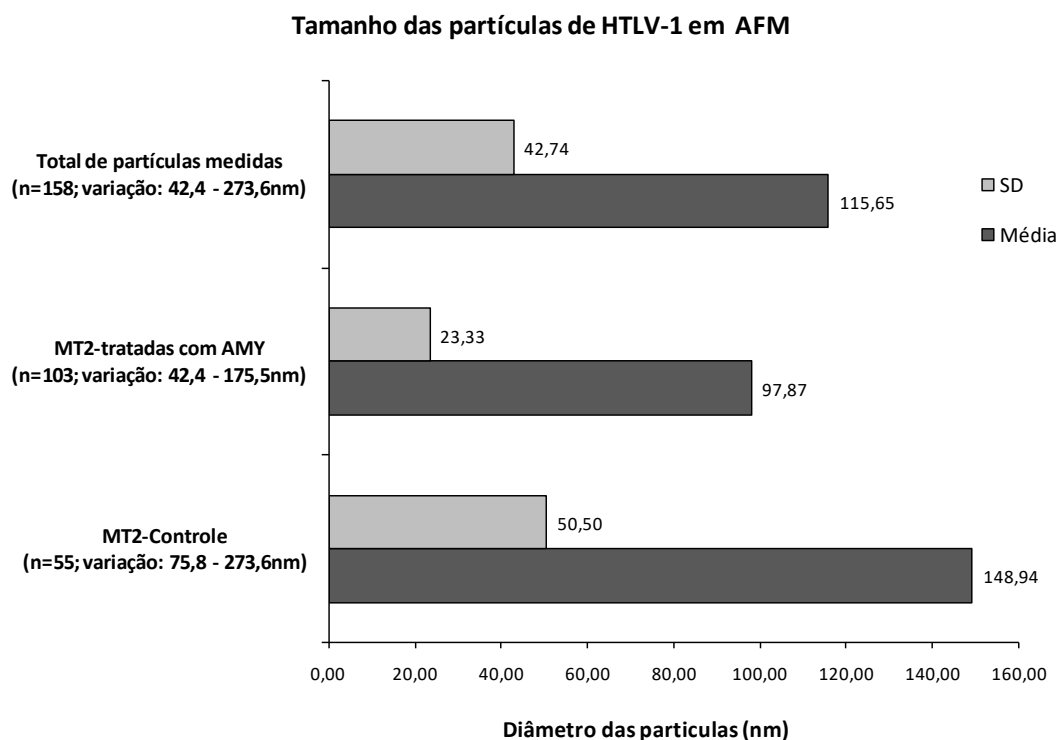


Figura 3.7 - Micrografias eletrônicas demonstrando fibras de actina em células infectadas pelo HTLV-1.

3.4.2. Avaliação da atividade antiviral do composto AMY em células HTLV-1+ por Microscopia de Força Atômica (AFM)

A microscopia de varredura é uma potente ferramenta que permite a caracterização de amostras biológicas com grande precisão. Neste trabalho a microscopia de varredura de escolha foi a Microscopia de Força Atômica, uma vez que esta técnica permite medidas acuradas da superfície celular e das partículas virais. No presente trabalho, onde se buscou mensurar os prováveis efeitos antivirais do composto terpênico AMY, esta técnica permitiu varrer a superfície das culturas celulares e efetuar a observação das mesmas e das partículas virais, praticamente a partir de culturas celulares frescas. Destaca-se aqui a obtenção de medidas das partículas virais mais fidedignas em relação à microscopia eletrônica, que depende de várias etapas de inclusão e coloração, sendo relatado em todo o mundo que estas técnicas que antecedem a captura de imagens na eletrônica podem distorcer tamanho e morfologia de componentes biológicos.

As culturas celulares trabalhadas nesta técnica foram somente a linhagem MT-2. Na análise por AFM foi demonstrado qualitativamente e quantitativamente que o composto miriadenolideo foi capaz de reduzir o diâmetro da partícula viral (figura 3.8). Foram medidas 158 partículas (103 em células tratadas com AMY e 55 em células controle) onde as partículas produzidas nas células controle variaram de 75,8 a 273,6 nm (média 148,94 nm) e as produzidas em células tratadas variaram de 42,4 a 175,5 nm (média 97,87 nm). Portanto, as análises quantitativas demonstraram que as partículas presentes nas células controle e células tratadas apresentam tamanho relativo diferente conforme observado nas análises morfológicas.

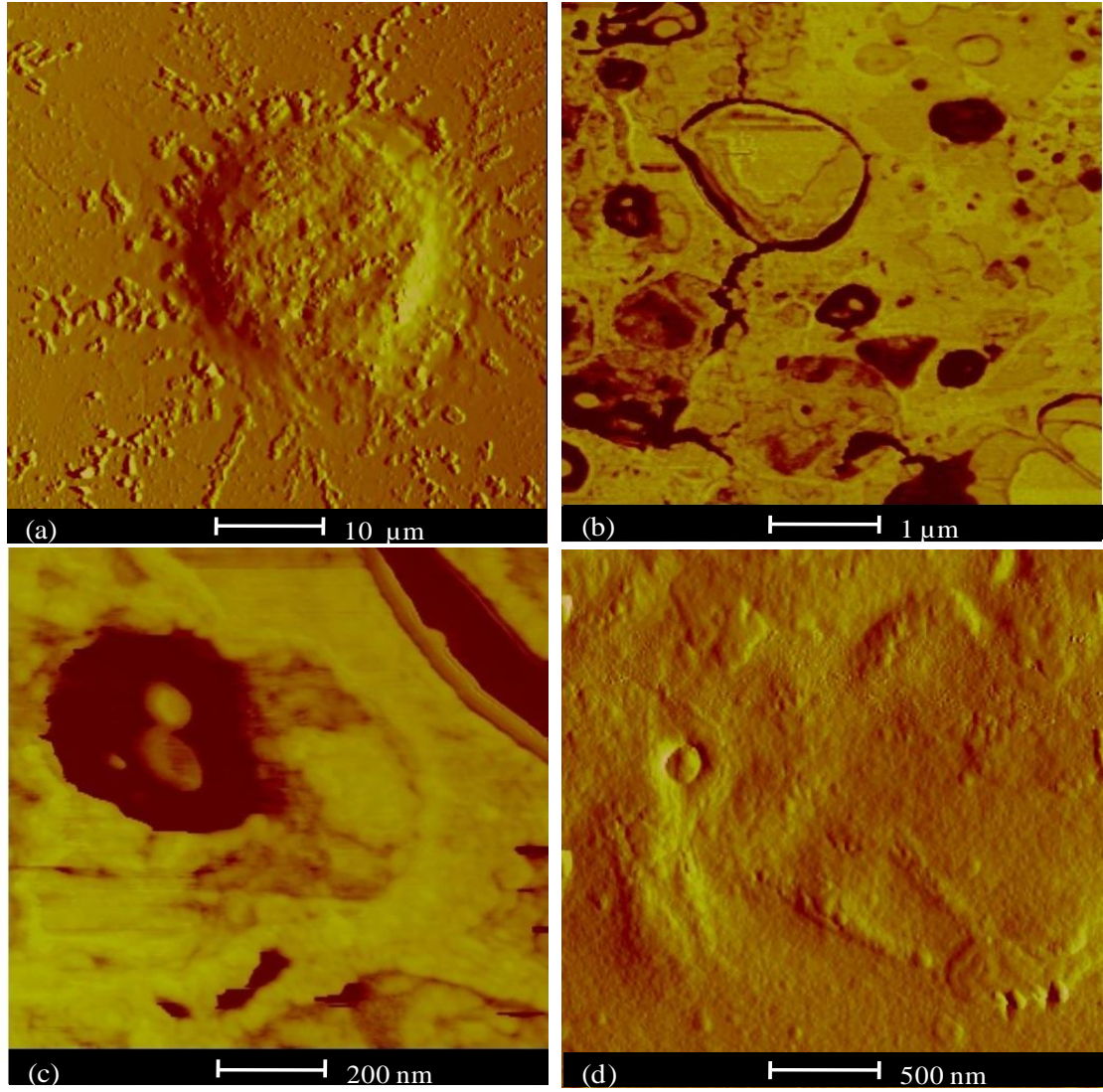


Programa utilizado na medida de partículas: *Software* do Nanoscópio

Figura 3.8: Avaliação quantitativa das partículas do HTLV-1 em células MT-2 tratadas ou não com o miriadenolídeo por AFM.

As imagens de AFM foram capturadas utilizando o modo de contato intermitente, e, deve ser aqui enfatizado que as sondas “varrem” a superfície celular, e, toda e qualquer estrutura aqui visualizada está sobre a superfície. Na figura 3.9 pode ser observada na letra A uma imagem de amplitude mostrando uma célula MT-2 completa, não tratada, onde pode ser observada uma superfície irregular, contendo inúmeras projeções, provavelmente citoplasmáticas. Nas letras B e C estão representadas imagens de fase, nas células não tratadas, onde pode ser observada uma superfície rugosa, apresentando áreas mais escuras, que, na AFM representam áreas mais profundas, contendo provavelmente invaginações da membrana. Nestas estruturas podem ser observadas partículas virais em brotamento. Nas letras D a F, estão representadas superfícies de células tratadas com o miriadenolídeo. A mais interessante e intrigante observação na comparação entre as superfícies celulares antes e após o tratamento, é que as células tratadas apresentam uma superfície mais lisa, e, as partículas virais não parecem envoltas por nenhuma estrutura.

Após observar esta diferença, novos experimentos foram conduzidos e, estão representados na figura 3.10, onde foram analisadas células MT-2 não tratadas (células controle). Nos quadrantes de A-D podem ser visualizadas partículas virais envoltas em uma complexa rede de proteínas, muito provavelmente trata-se do biofilme viral, recentemente relatado. Este biofilme é descrito como uma estrutura imprescindível à transmissão dos vírus célula a célula, sendo composto por complexa matrix protéica. No quadrante D pode ser destacada uma estrutura assemelhada a uma invaginação, onde podem ser visualizadas muitas partículas virais, já envolvidas por um envelope.



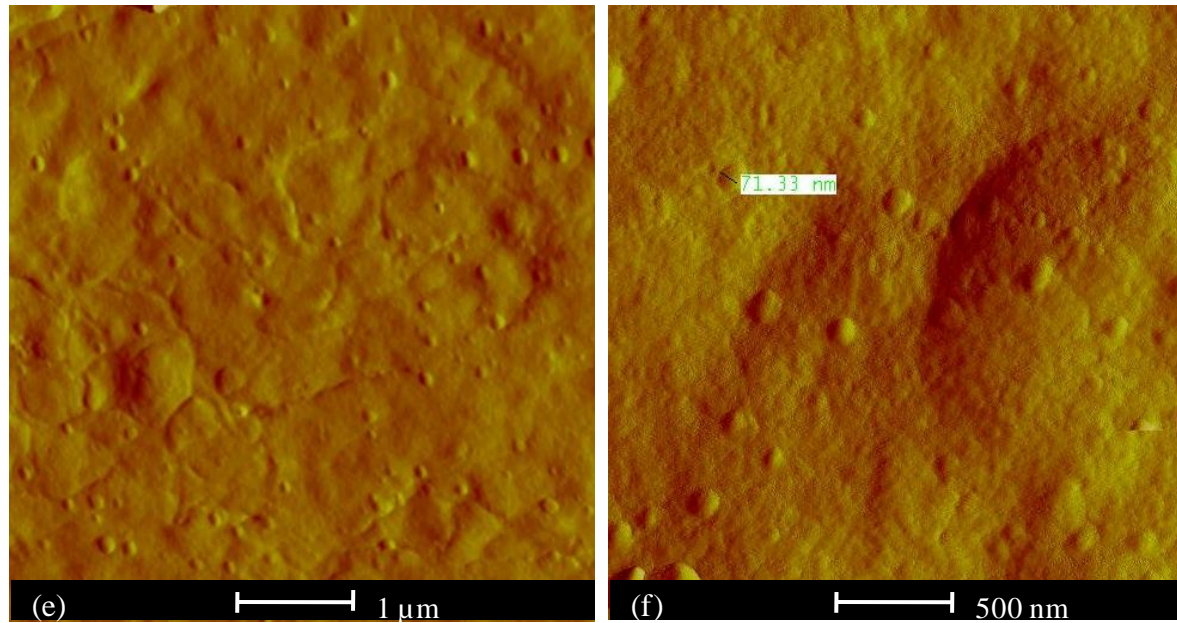


Figura 3.9 - Imagens das células MT-2 por Microscopia de Força Atômica. A-Imagem de amplitude mostrando a célula MT-2; B-C - Imagens de fase mostrando invaginações na superfície de células MT-2 não tratadas, com partículas virais em seu interior; D-F - Imagens de fase mostrando a superfície de células MT-2 tratadas com o miradenolídeo, onde podem ser observadas partículas do HTLV-1, porém, sem as invaginações observadas nas células controle.

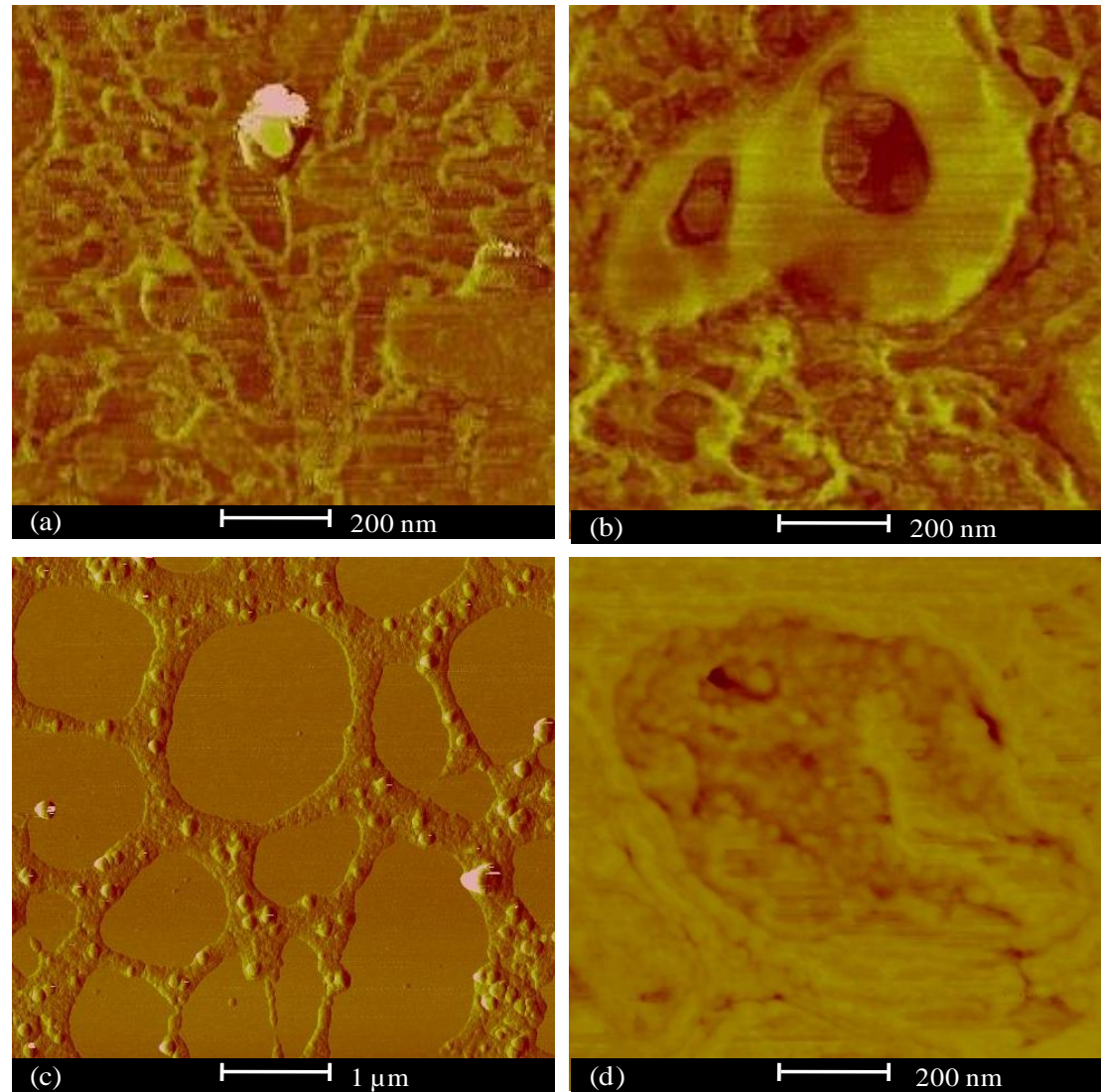
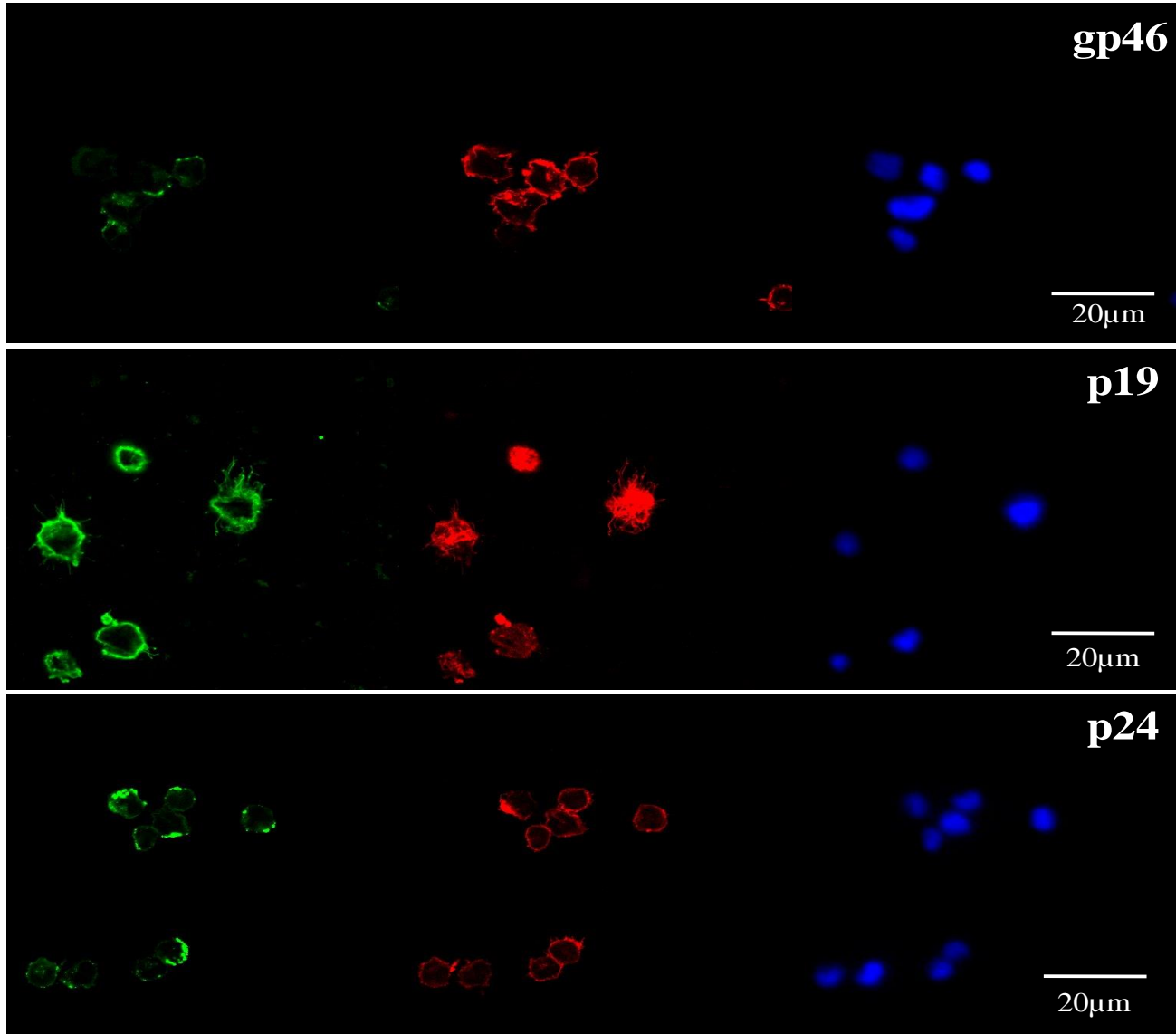


Figura 3.10- Visualização de células MT-2 por AFM. Nos quadrantes de A – D observa-se figuras de fase com partículas virais sempre envoltas por uma complexa estrutura provavelmente de glicoproteínas. Observa-se a formação de uma estrutura extracelular as partículas virais tipo biofilme. A, B, D – Célula MT-2; C – Célula MT-2 tratada com AMY.

3.4.3 Análise da expressão protéica do HTLV-1 em células MT-2 tratadas com o miriadenolídeo utilizando Microscopia Confocal

A dinâmica da expressão e movimentação das proteínas estruturais do HTLV-1 foi verificada por análises de imunofluorescência confocal. Os experimentos demonstraram a presença das proteínas estruturais gp46, p24 e p19 na membrana celular, e, nestas análises foram utilizados anticorpos monoclonais específicos contra cada uma das proteínas avaliadas. Entretanto, a distribuição ao longo da membrana plasmática mostrou ter um padrão diferenciado entre as diferentes proteínas (figura 3.11). A proteína de envelope, gp46, está disposta em torno de toda a estrutura de membrana das células MT-2. A proteína p24 foi também encontrada em toda a membrana, mas em menor quantidade, e caracteristicamente, apresentou-se em aglomerados em regiões ao longo da membrana. Por sua vez, a proteína p19 além de ter sido observada em toda a superfície celular em grande quantidade, foi encontrada presente nos prolongamentos celulares (figura 3.11). A actina, proteína do citoesqueleto celular, mostrou estar expressa em grande quantidade nas células infectadas e se co-localizar com as proteínas virais.



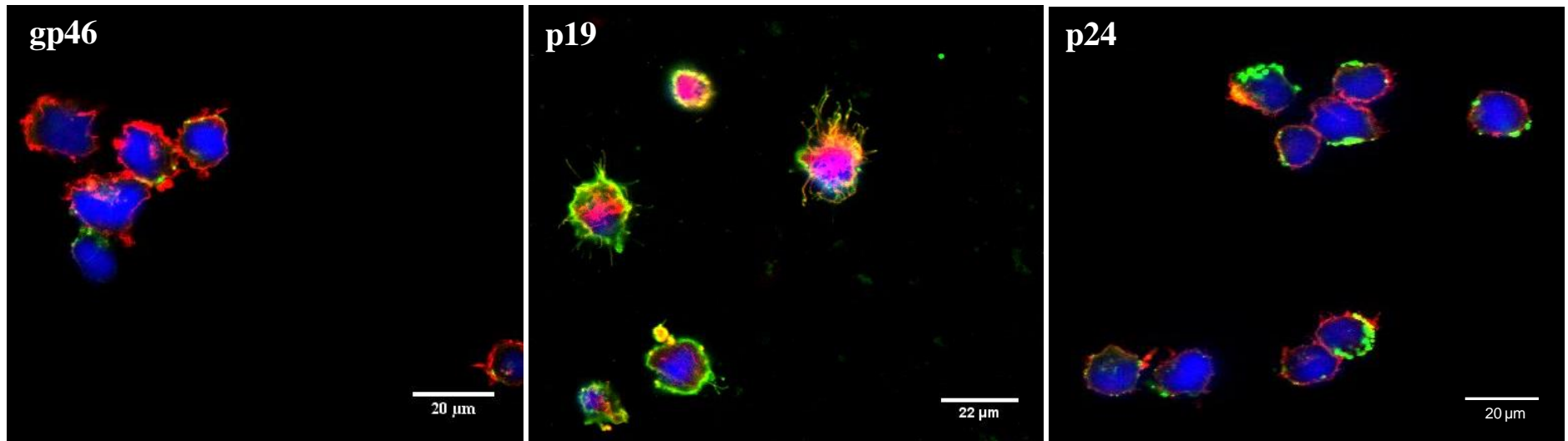


Figura 3.11 - Análise do perfil de expressão de proteínas virais e celulares das células MT-2. As cores representam: Azul – núcleo – (DAPI); vermelho – actina (Rodomina/faloidina) e, verde – proteínas do HTLV-1 (anti-IgG de camundongo conjugado AlexaFluor 488).

3.5 DISCUSSÃO

A exploração e caracterização de fenômenos em materiais com dimensões nanométricas é uma das linhas de pesquisa mais promissoras da atualidade, sendo amplamente aplicada aos sistemas biológicos. Devido à importância da caracterização celular e molecular para o entendimento do ciclo da célula, a biologia vem estimulando a criação de uma interface com novos campos da física/matемática, facilitando o conhecimento de estruturas e o entendimento de fenômenos biológicos anteriormente não detectáveis e impossível de serem compreendidas. Desta forma é possível estudar a formação fractal formada pelo crescimento de ramos de uma árvore, ou em escalas micrométricas, o crescimento de uma colônia de fungos ou bactérias, obtendo informações quantitativas de um sistema aleatório (NOY et al, 1997; NAKABAYASHI et al, 2008; FOGARTY et al, 2011).

No presente estudo foram utilizados três métodos de microscopia: a Microscopia Eletrônica de Transmissão, a Microscopia de Força Atômica e a Microscopia Confocal para análise da atividade antiviral do composto miriadenolídeo.

A MET e a AFM evidenciaram qualitativamente, e a última, também, quantitativamente que o composto miriadenolídeo alterou a formação da partícula viral, sendo observadas partículas menores a partir das células tratadas com o miriadenolídeo (média 97,9 nm) em comparação com as células controle (média 148,9), demonstrando a produção de vírus provavelmente defectivos apresentando defeito na morfogênese. Foi também observada a presença de grande quantidade de partículas virais envoltas por membranas em diferentes estágios de maturação nas células tratadas e não tratadas.

Os retrovírus apresentam os genes *gag*, *pro-pol* e *env* que codificam proteínas do cerne viral (MA - matriz, CA – capsídeo e NC - nucleocapsídeo), proteínas enzimáticas e glicoproteínas do envelope (SU - superfície e TM - transmembrana), respectivamente. Sendo que, a expressão da poliproteína Gag em eucariontes é suficiente para a liberação de partículas semelhantes a vírus (VLP – *virus like particles*), demonstrando que esta proteína apresenta todas as funções necessárias para a montagem, o brotamento e a subsequente liberação da partícula viral. Nas partículas maduras, a proteína de matriz forma uma camada interna ao envelope viral, além de interagir com a proteína TM ancorada na bicamada lipídica (SWANSTROM et al, 1997). As proteínas do CA definem o cerne interno que envolve o genoma viral associado com as

proteínas do NC. Biologicamente já foi determinado o papel de cada proteína gerada através do precursor poliproteico de Gag durante a formação da partícula viral. Os domínios de MA (domínio M) estão envolvidos na ligação a membrana e são necessários para miristilação da região N terminal de Gag e subsequente ligação na membrana plasmática. O domínio de interação (domínio I) apresenta função destacada na multimerização de Gag e o domínio de montagem atrasada (domínio L) é importante para introduzir a partícula viral na membrana da célula do hospedeiro (ALDOVINI, YOUNG, 1990; GORELICK et al, 1988; ONO, FREED, 1999; HAYAKAWA et al, 1992; BENNETT et al, 1993; SANDEFUR et al, 2000 ZHANG et al, 1996; WANG, GOFF, 2003; BLANC et al, 2002). O domínio L apresenta uma sequência consenso formada por três motivos: PPXY, PT/SAP e o YPXL, sendo que muitos vírus de RNA, como os retrovírus, apresentam algumas destas sequências como os motivos PPXY e/ou PT/SAP (DORWEILER et al., 2006; HEIDECKER et al., 2004; SHEHU-XHILAGA et al., 2004; YUAN, GOFF; 1999; WANG et al., 2004).

Diferentes fatores do hospedeiro que interagem com o domínio L estão envolvidos com a via de proteína vacuolar classe E, sugerindo que o brotamento em corpos multivesiculares (MVBs) em endossomas tardios e o brotamento viral são topologicamente idênticos e ocorrem por mecanismos semelhantes (URATA et al, 2007; TIMAR et al, 1987). Estudos de Urata e colaboradores (2007) utilizando forma de domínio negativo de proteínas da classe E, demonstraram que o HTLV-1 brota utilizando a via MVB, sendo que para este processo é requerida as enzimas ATPases VPs4A e VPs4B.

Pesquisadores utilizando análises biofísicas para obter informações sobre o tamanho da partícula viral e a estequiometria das proteínas, produziram partículas assemelhadas a vírus (VLPs) e determinaram a média do número de cópias de Gag de 510 ± 50 (de 300 a 800 cópias) (GRIGSBY et al, 2010). Em um estudo com o HIV-1 foi observado que o número aumentado de moléculas de Gag na produção do vírus pode interferir na infectividade da partícula, transmissão e patogênese (CARLSON et al, 2008). Nos experimentos de MET e AFM ficou evidenciada a alteração da morfologia da partícula viral pelo tratamento com o miriadanolídeo. Visto que a proteína Gag é de fundamental importância para a estruturação da partícula, além de orquestrar o brotamento e a liberação da partícula, os dados apontam que a sua dinâmica de maturação foi possivelmente alterada pelo o composto levando a produção de vírus menores e, possivelmente, defectivos, por defeito na morfogênese.

Análises das imagens de microscopia de força atômica permitiram observar a formação de matriz extracelular viral em torno das partículas virais, sendo este fato evidenciado pela microscopia confocal onde se verifica regiões com concentração das proteínas estruturais, como a p24, e regiões com alta concentração da proteína p19. Nos experimentos com confocal foi comprovada ainda a co-localização com a proteína actina. Certamente que à partir da complexidade do arranjo visualizado na AFM (figura 3.9) esta matriz deve ser formada por múltiplas proteínas celulares e virais, dentre outras moléculas como os carboidratos.

No contexto da infecção pelo HTLV-1 o contato intercelular é essencial para a transmissão eficiente do vírus (GRASSMANN et al., 2005; MATSUOKA, 2005). O contato célula-célula ocorre pela polarização do centro organizador dos microtúbulos (MTOC), estabilizado por moléculas celulares como a ICAM-1 (Molécula de adesão intercelular 1), LFA1 (Antígeno de função associada ao linfócito 1) e pela proteína viral Tax, na região intercelular, acarretando a formação de uma sinapse viral. Segundo Nejmeddine e colaboradores (2009) a polarização sinérgica nas sinapses virais do HTLV-1 é dependente da presença da proteína Tax associada às regiões do MTOC das células T infectadas, ativação da via CREB pela Tax e ativação da via MEK/ERK através da ligação de ICAM-1 na superfície celular. Nesta sinapse, o RNA, proteínas virais e a partícula viral são transferidos para a célula-alvo (MATSUOKA et al., 2007; MAJOROVITS et al., 2008; BRAND et al., 2009).

Recentemente a forma de transmissão do HTLV-1 utilizando as sinapses virais foi mais bem caracterizada e, foi descrito, uma estrutura celular de superfície complexa que protege a partícula do HTLV-1 durante a transmissão célula-célula conhecida como tipo biofilme (THOULOZE, ALCOVER, 2011; PAIS-CORREIA et al., 2010). Pais-Correia e colaboradores (2010) também descreveram que a estrutura tipo biofilme que o HTLV-1 produz durante o seu brotamento, é formada por agregados ricos em glicoproteínas, que rapidamente adere à outra célula durante o contato celular suportando a transmissão viral.

A transmissão por contato célula-célula através de sinapse viral permite a efetiva transmissão do HTLV-1 e de outros vírus como o HIV-1 (MALBEC et al., 2011). A transmissão célula-célula do HTLV-1 é efetivada em parte pela formação de pontes (*conduits*) celulares induzidas pela proteína acessória p8 (VAN PROOYEN et al., 2010). As pontes são finas extensões de membrana (~5 µm) que podem ser formadas por consequência de uma protusão tipo filopódio

em direção a uma célula vizinha ou por deslocamento após interação direta com a célula de contato (GERDES et al., 2007; RUDNICKA et al., 2009).

A proteína acessória p8 aumenta o número e o comprimento das pontes celulares, aumentando assim, a comunicação entre diferentes tipos celulares (SOWINSKI et al., 2008; WATKINS, SALTER, 2005), desta forma é responsável por um aumento de quatro vezes na transmissão do HTLV-1 (MALBEC et al., 2011). Logo, as pontes celulares representam também uma forma de transmissão do HTLV-1 (VAN PROOYEN et al., 2010).

3.6 CONCLUSÃO

As células MT-2 e C91-PL analisadas pelo MET mostraram a produção de partículas virais com morfologia e tamanhos diferindo quando tratadas com o composto miriadenolídeo em comparação a amostra controle não tratada. As análises quantitativas não demonstraram diferença expressiva entre a amostra tratada e não tratada. As análises evidenciaram também partículas virais em diferentes estágios de maturação presentes em corpos vesiculares, incluindo partículas já envelopadas.

A microscopia de força atômica realizada em células MT-2 demonstrou quantitativamente e qualitativamente a alteração morfológica de partículas do HTLV-1 tratadas com o miriadenolídeo. Por esta metodologia também foi observada que a superfície das células MT-2 tratadas e não tratadas apresentaram grande diferença de topologia, podendo ser evidenciado nas células não tratadas o biofilme induzido pelo vírus na forma de uma complexa matriz extracelular, fenômeno não visualizado nas células tratadas.

Corroborando as análises da AFM, a microscopia confocal permitiu verificar a distribuição de proteínas estruturais do vírus (gp46, p24 e p19) ao longo da membrana celular, em co-localização com a proteína actina do citoesqueleto. As proteínas gp46 e p24 apresentaram-se com alguns pontos de localização definidos, e, de maneira destacada, a proteína p19 mostrou uma expressão aumentada, igualmente distribuída ao longo da superfície celular, e, em longos prolongamentos citoplasmáticos.

As análises microscópicas trouxeram novas luzes ao presente estudo, contribuindo enormemente na caracterização dos fenômenos pós-tratamento com o miriadenolídeo, e permitiram demonstrar que o terpenóide alterou a morfogênese das partículas virais, bem como o biofilme viral, enfatizando a possibilidade de empregá-lo em futuros estudos para o desenvolvimento de fármacos com atividades anti-HTLV-1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOULAFIA, D. M. Clinical implications of human T-cell leukemia virus type I/II-a/ssociated diseases. *AIDS Reader*, vol. 5, p. 118-125, 1995.

ADCOCKS, C.; COLLIN, P.; DAVID, J. B. Catechins from green tea (*camellia sinesis*) inhibit bovine and human cartilage proteoglycan and type II collagen degradation in vitro. *J. Nutr.*, vol. 132, p. 341-346, 2002.

ADUNDUK, A. M.; ADUNDUK, M. C.; VARNELL, E. D.; KAUFMAN, H. E. The comparison of efficacies of tropical corticosteroids and nonsteroidal anti-inflammatory drops on dry eye patients: a clinical and immunocytochemical study. *Am J Ophthalmol.*, vol., 136 (4), p. 593-602, 2003. IN: FELBERG, S.; DANTAS, P. E. C. Diagnóstico e tratamento da síndrome de Sjögren. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*, vol. 69 (6), p. 959-963, 2006.

ADYA, N.; AND GIAM, C. Distinct Regions in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type I Tax Mediate Interactions with Activator Protein CREB and Basal Transcription Factors. *American Society for Microbiology*, vol. 69 (3), p. 1834-1841, 1995.

AHMAD, N.; GUPTA, S.; MUKHTAR, H. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor kappaB in cancer cells versus normal cells. *Arch Biochem Biophys*, vol. 376, p. 338-46, 2000.

ALAMANOS, Y.; and DROSOS, A. A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews*, vol.4, p. 130-136, 2005.

ALBA, J.; EDGAR, J.; JEANNTTE, M.; OMAR, E.; RAMOS, B.; CASTILLO, A. Actividad antiviral de flavonoides de *hirtella castilanum* ante los vírus herpes simplex vírus tipo 2 encefalitis equina Venezolana. *Rev. Inst. Nac. Hig.*, v.33, p.6-9, 2002.

ALBRECHT, B.; AND LAIRMORE, M. D. Critical role of human T-lymphotropic virus type 1 accessory proteins in viral replication and pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:396-406, 2002.

ALBRECHT, B.; COLLINS, N. D.; BURNISTON, M. T.; NISBET, J. W.; RATNER, L.; GREEN, P. L.; AND LAIRMORE, M. D. Human T-lymphotropic virus type 1 open reading frame I p12 is required for efficient viral infectivity in primary lymphocytes. *J. Virol.* Vol. 74: p. 9828-9835, 2000.

ALEFANTIS, T.; MOSTOLLER, K.; JAIN, P.; HARHAJ, E.; GRANT, C. Secretion of the human T cell leukemia virus type I transactivator protein Tax. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280 (17), p. 17353-17362, 2005 A.

ALEFANTIS, T.; JAIN, P.; AHUJA, J.; MOSTOLLER, K.; AND WIGDAHL, B. HTLV-1 Tax nucleocytoplasmic shuttling interaction with the secretory pathway, extracellular signaling, and implications for neurologic disease. *Journal of Biomedical Science*, vol. 12, p. 961-974, 2005.

ANDRADE, R. G.; RIBEIRO, M. A.; NAMEN-LOPES, M. S. S.; SILVA, S. M. N.; BASQUES, F. V.; RIBAS, J. G. et al. Evaluation of the use of real-time PCR for human T cell

lymphotropic virus 1 and 2 as a confirmatory test in screening for blood donors. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* Apr 43(2): 111-115, 2010.

AONO, H.; FUJISAWA, K.; HASUNUMA, T.; MARRIOT, S. J.; NISHIOKA, K. Extracellular human T cell leukemia virus type I Tax protein stimulates the proliferation of human sinovial cells. *Arthritis & Rheumatism*, vol. 41 (11), p. 1995-2003, 1998.

ARAÚJO, A.; LIMA, M. A.; SILVA, M. T. T. “Avanços e perspectivas na terapêutica das doenças associadas à infecção pelo HTLV”. IN: CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F. (org.) HTLV: Cadernos Hemominas Volume XIII. Belo Horizonte: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais, 2006.

ARMANT, M. A.; FENTON, M. J. Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biol.*, v. 3 (8), 2002.

ASQUITH, B.; BANGHAM, C. R. The role of cytotoxic T lymphocytes in human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. *Journal of theoretical biology*, vol. 207(1), p. 65-79, 2000.

AZRAN, I.; SCHAVINKY-K., ABOUD, M. Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukomogenicity. *Retrovirology*, vol. 1 (20), p. 1-24, 2004.

BALCI-PEYNIRCIUGLU, B.; WAITE, A. L.; HU, C.; RICHARDS, N.; STAUBACH-GROSSE, A.; YILMAZ, E.; GUMUCIO, D. L. Basic amino acids of the human T-cell leukemia virus type 1 matrix protein biologics. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 2008 a.

BALUNAS, M. J.; and KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Science*, vol. 78, p. 431-441, 2005.

BANERJEE, P.; FEUER, G.; BARKER, E. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) p12I down-modulates ICAM-1 and -2 and reduces adherence of natural killer cells, thereby protecting HTLV-1-infected primary CD4+ T cells from autologous natural killer cell-mediated cytotoxicity despite the reduction of major histocompatibility complex class I molecules on infected cells. *J Virol.*, v. 81, p. 9707-9717, 2007.

BANGHAM, C. R. M.; OSAME, M. Cellular immune response to HTLV-1. *Oncogene*, vol. 24, p. 6035-6046, 2005.

BARANGER, A. M.; PALMER, R. C.; HAMM, M. K.; GIEBLER, H. A.; BRAUWEILER, A.; NYBORG, J. K.; SCHEPARTZ, A. Mechanism of DNA-binding enhancement by the human T-cell leukaemia virus transactivator Tax. *Nature*, vol. 376 (6541), p. 606-608, 1995.

BARMAK K.; HARHAJ, E.; GRANT, C.; ALEFANTIS, T.; WIGDAHL, B. Human T cell leukemia virus type I-induced disease: pathways to cancer and neurodegeneration. *Virology*, vol. 308, p. 1-12, 2003.

BARNHART, M. K.; CONNOR, L. M.; AND MARRIOTT, S. J. Function of the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 21-Base-Pair Repeats in Basal Transcription *Journal of Virology*, vol. 71 (1), p. 337-344, 1997.

BAZARBACHI, A.; HERMINE, O. treatment of adult T-cell Leukemia/lymphoma: current strategy and future perspectives. *Virus Res.* 30; 78 (1-2): 79-92, 2001.

BAZARBACHI, A.; HERMINE, O. Treatment with a combination of zidovudina and alpha-interferon in naïve and pretreated adult T-cell leukemia/lymphoma patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, vol. 13, p. 186-190, 1996.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol*. Vol. 40 (12): p. 845-859, 2004.

BEX, F.; MURPHY, K.; WATTIEZ, A.; BURNY, A.; GAYNOR, R. B. Phosphorylation of the human T-cell leukemia virus type 1 transactivator Tax on adjacent serine residues is critical for Tax activation. *Journal of Virology*, vol. 73, p. 3484-3497, 1999.

BHIGJEE, A. L.; WILEY, C. A.; WACHSMAN, W.; AMENOMORI, T.; PIRIE, D.; BILL, P. L. Windsor HTLV-I-associated myelopathy: clinicopathologic correlation with localization of provirus to spinal cord. *Neurology* 41: p. 1990-1992, 1991.

BLAKE, J. S.; DAHL, M. V.; HERRON, M. J. NELSON, R. D. An immunoinhibitory Cell Wall Glicoprotein (Mannan) from *Trichophyton rubrum*. *J. Invest Dermatol*. Vol. 96 (5), p. 657-661, 1991.

BLATTNER, W. Human retrovirology: HTLV. Raven, p. 191-197, 1990. IN: RIBAS, J. G. R., MELO, G. C. N. Mielopatia associada ao vírus linfotrópico humano de células T do tipo 1 (HTLV-1). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 35 (4), p. 377-384, 2002.

BLATTNER, W. A. Epidemiology of HTLV-I and associated diseases. In: Blattner WA, editor. *Human retrovirology: HTLV*. New York: Raven Press; p. 251-261, 1990.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; GUPTA, R. K.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Naturally-occurring terpene derivatives 1980. Diterpene and tetranorditerpene from *Acritopappus species*. *Phytochemistry*, vol.19, p. 2695-2705, 1980.

BONITA, J. S.; MANDARANO, M.; SHUTA, D.; VINSON, J. Coffe and cardiovascular disease: in vitro, cellular, animal, and human studies. *Pharmacological Research*, vol. 55, p. 187-198, 2007.

BOUVIER, F.; RAHIER, A.; CAMARA, B. Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Progress in Lipid Research*, vol. 44 (6), p. 357-429, 2005.

BOXUS, M.; TWIZERE, J. C.; LEGROS, S.; DEWULF, J. F.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology*, vol. 5, p. 76, 2008.

BRADY, J.; JEANG, K. T.; DUVALL, J.; AND KHOURY, G. Identification of p4 Ox-Responsive Regulatory Sequences within the Human T-Cell Leukemia Virus Type I Long Terminal Repeat. *Journal of Virology*, vol. 61, p. 2175-2181, 1987.

BROZ, P.; MOLTKE, J. V.; JONES, J. W.; VANCE, R. E.; MONACK, D. M. Differential Requirement for Caspase-1 Autoproteolysis in Pathogen-Induced Cell Death and Cytokine Processing. *Cell Host & Microbe*, v. 8, p. 471-483, 2010.

BUCHER, B.; POUPARD, J. A.; VERNANT, J. C.; DEFREITAS, E. C. Tropical neuromyelopathies and retroviruses: a review. *Reviews of Infectious Diseases*, vol. 12, p. 890-899, 1990.

BUDAGIAN, V.; BULANOVA, E.; PAUS, R.; BULFONE-PAUS, S. IL-15/IL-15 receptor biology: A guided tour through an expanding universe. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. v. 17, p. 259-280, 2006.

BURTON, M.; UPADHYAYA, C. D.; MAIER, B.; HOPE, T. J.; SEMMES, J. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax shuttles between functionally discrete subcellular targets. *Journal of Virology*, vol. 74 (5), p. 2351-2364, 2000.

BUSKILA, D.; SHNAIDER, A.; NEUMANN, L.; ZILBERMAN, D.; HILZENRAT, N.; SIKULER, E. Fibromyalgia in Hepatitis C Virus Infection: Another Infectious Disease Relationship. *Archives of Internal Medicine*, vol. 157, p.2497-2500, 1997.

BUSTIN, S. A.; AND NOLAN, T. Chemistries. In: S.A. Bustin, Editor, *A-Z of Quantitative PCR*, International University Line, La Jolla, CA (2004), p. 217-278 (Chapter 6).

CALATTINI, S.; CHEVALIER, S. A.; DUPREZ, R.; BASSOT, S.; FROMENT, A.; MATHIEUX, R.; GESSAIN, A. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology*, vol. 2, p. 1-4, 2005.

CANN, A. J.; CHEN, I. S. Y. Human T-cell leukemia virus types I and II. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al, eds. *Fields virology*, vol. 59, p. 1849-1980, 1996.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F.; RIBAS, J. G. R.; CATALAN-SOARES, B. C.; MARTINS, M. L.; BRITO-MELO, G. E. A.; MARTINS-FILHO, O. A.; PINHEIRO, S. R.; ARAUJO, A. Q. C.; GALVÃO-CASTRO, B.; OLIVEIRA, M. S. P.; GUEDES, A. C.; PROIETTI, F. A. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLVI/II) no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Belo Horizonte, vol. 35, n.5, p. 499-508, 2002.

CARON, C.; ROUSSET, R.; BERAUD, C.; MONCOLLIN, V.; EGLY, J.; AND JALINOT, P. Functional and biochemical interaction of the HTLV-1 Tax1 transactivator with TBP. *The EMBO Journal*, vol. 12 (11), p. 4269 - 4278, 1993.

CARVALHO, E. G.; UTIYAMA, S. R. R.; KOTZE, L. M. S.; IARA, T. Lectina ligante de manose (MBL): características biológicas e associação com doenças. Mannan-binding lectin (MBL): biological characteristics and diseases association. *Messias Reason Rev. Bras. Alerg. Imunopatol*, 2007.

CASTRO-COSTA, C. M.; ARAÚJO, A. Q.; BARRETO, M. M.; TAKAYANAGUI, O. M.; SOHLER, M. P.; DA SILVA, E. L.; DE PAULA, S. M.; ISHAK, R.; RIBAS, J. G.; ROVIROSA, L. C.; CARTON, H.; GOTUZZO, E.; HALL, W. W.; MONTANO, S.; MURPHY, E. L.; OGER, J.; REMONDEGUI, C.; TAYLOR, G. P. Proposal for diagnostic criteria of tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM). *Aids Reseach and Human Retroviruses*, vol. 22 (10), p. 931-935, 2006.

CATALAN-SOARES, B.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F.; PROIETTI, F. A. GIPH. Vírus-T linfotrópico humano em familiares de candidatos a doação de sangue soropositivo: disseminação silenciosa. *Revista Panamericana de Salud Pública*, vol. 16, n.6, p. 387-393, 2004.

CATALAN-SOARES, B.; PROIETTI, F. A.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F. Os vírus linfotrópico de células T humanos (HTLV) na última década (1990-2000), aspectos epidemiológicos. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, vol. 4, n. 2, p. 81-95, 2001.

CAVROIS, M.; GESSAIN, A.; GOUT, O.; WAIN-HOBSON, S.; WATTEL, E. Common Human T Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) Integration Sites in Cerebrospinal Fluid and Blood Lymphocytes of Patients with HTLV-1- Associated Myelopathy/Tropical Spastic

Paraparesis Indicate that HTLV-1 Crosses the Blood-Brain Barrier via Clonal HTLV-1-Infected Cells. *The Journal of Infectious Disease*, vol.182, p. 1044-1050, 2002.

CERESETO, A.; BERNEMAN, Z.; KORALNIK, I.; VAUGHN, J.; FRANCHINI, G.; KLOTMAN, M. E. Differential expression of alternatively spliced pX mRNAs in HTLV-1-infected cell lines. *Leukemia*, vol. 11, p. 866-870, 1997.

CHAE, J. J.; AKSENTIJEVICH, I.; KASTNER, D. L. *Advances in the understanding of familial*, 2009.

CHAO, T. H.; LAM, T.; VONG, B. G.; TRAVES, P. G.; HORTELANO, S.; CHOWDHURY, C.; BAHJAT, F. R.; LLOYD, G. K.; MOLDAWER, L. L.; BOSCA, L. et al. A new family of synthetic diterpenes that regulates cytokine synthesis by inhibiting I κ B α phosphorylation. *Chembio Chem*, vol. 6, p. 133-144, 2005.

CHEN, I. S. Y.; OKAYAMA, A.; LEE, T-H.; TACHIBANA, N.; MUELLER, N.; AND ESSEX, M. Sexual transmission of human T-cell leukemia virus type I associated with the presence of anti-Tax antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 88, p. 1182-1186, 1991.

CHEN, J. C.; HO, F. M.; PEI-DAWN LEE C.; CHEN, C. P.; JENG, K. C.; HSU, H. B.; LEE, S. T.; WEN TUNG, W.; LIN, W. W. Inhibition of iNOS gene expression by quercetin is mediated by the inhibition of I κ B kinase, nuclear factor-kappa B and STAT1, and depends on heme oxygenase-1 induction in mouse BV-2-microglia. *Eur J Pharmacol.*, vol. 521, p. 9-20, 2005.

CHING, Y. P.; CHUN, A. C.; CHIN, K. T.; ZHANG, Z. Q.; JEANG, K. T.; JIN, D. Y. Specific TATAA and bZIP requirements suggest that HTLV-I Tax has transcriptional activity subsequent to the assembly of an initiation complex. *Retrovirology*, vol. 1, p.18, 2004.

CHUNG, H. K.; YOUNG, H. A.; GOON, P. K.; HEIDECKER, G.; PRINCLER, G. L.; SHIMOZATO, O.; TAYLOR, G. P.; BANGHAM, C. R.; DERSE, D. Activation of interleukin-13 expression in T cells from HTLV-1-infected individuals and in chronically infected cell lines. *Blood*, vol. 102 (12), p. 4130-4139, 2004.

CIMINALE, V.; ZOTTI, L.; D'AGOSTINO, D. M.; FERRO, T.; CASARETO, L.; FRANCHINI, G.; BERNARDI, P.; CHIECO-BIANCHI, L. Mitochondrial targeting of the p13II protein coded by the x-II ORF of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I (HTLV-I) *Oncogene*. p. 4505–4514, 1999.

COFFIN, J. M. *Retroviridae: the viruses and their replication*. In *Fields Virology* 3rd edition (ed. B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al), v. 2, pp. 1767-1847. Philadelphia: Raven Publishers, 1996.

COMALADA, M., BALLESTER, I., BAILON, E., SIERRA, S., XAUS, J., GALVEZ, J., MEDINA, F. S., ZARZUELO, A. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: Analysis of the structure-activity relationship. *Biochem. Pharmacol.*, vol. 72 (8), p. 1010-1021, 2006.

CONSTANTINE, N. Serological tests for the retroviruses: approaching a decade of evolution. *AIDS*, vol. 7, p. 1-13, 1993.

CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO, J. R. O.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50 (9), p. 2581-2586, 2002.

CORNILESCU, C. C.; BOUAMR, F.; Carter, C.; TJANDRA, N. Backbone ¹⁵N relaxation analysis of the N-terminal domain of the HTLV-I capsid protein and comparison with the capsid protein of HIV-1. *Protein Science*, vol. 12, p. 973-981, 2003.

COSTA, E. A; MAGRI, M. C.; CATERINO-DE-ARAUJO, A. The best algorithm to confirm the diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 in at-risk individuals from São Paulo, Brazil. *J Virol Methods*. V. 173 (2): p. 280-286, 2011.

COSTANTINI, G.; RASTELLI, A.; MANZANO, C.; ACOSTA-DIAZ, P.; SONGMUANG, R.; KATSAROS, G.; GALLO, R. C. History of the discoveries of the first human retroviruses: Forcemicroscopy. *Annu. rev. phys. chem.* Vol. 52: p. 71-92, 2001.

COWAN, E. P.; ALEXANDER, R. K.; DANIEL, S.; KASHANCHI, F.; BRADY, J. Induction of tumor necrosis factor alpha in human neuronal cells by extracellular human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax₁. *Journal of Virology*, vol. 71 (9), p. 6982-6989, 1997.

CRUIKSHANK, E.K. A neuropathic syndrome of uncertain origin; review of 100 cases. *West Indian Medical Journal*; vol. 5, p. 147-158, 1956.

CRAKER, L.E. Herbs and volatile oils. *The Herb, Spice and Medicinal Plant Digest*, vol. 8, p. 1-5, 1990.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. *Biochemistry & molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.

CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J. Immunol. Methods.*, n. 265, p. 49-72, 2002.

DANGI, J. L.; JONES J. D. Plants pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, vol. 411, p. 826-833, 2001.

DATTA, S.; KOTHARI, N. H.; AND FAN, H. In Vivo Genomic Footprinting of the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) Long Terminal Repeat Enhancer Sequences in HTLV-1-Infected Human T-Cell Lines with Different Levels of Tax I Activity. *Journal of Virology*, vol. 74 (18), p. 8277-8285, 2000.

DAVIDSON, A.; DIAMOND, B. Autoimmune diseases. *The New England Journal of Medicine*, vol. 345, p. 340-350, 2001.

DE THE, G.; BOMFORD, R. An HTLV-I vaccine: why, how, for whom? *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol. 9, n. 5, p. 381-386, 1993.

DELAMARRE, L; ROSENBERG, A. R.; PIQUE, C.; PHAM, D.; CALLEBAUT, I.; & DOKHÉLAR, M-C. The HTLV-1 envelope glycoproteins: struture and functions. *Journal Acquired Immune Deficiency Syndromes Humam: Retrovirology*, vol. 13 (suppl. 1), p. 85-91, 1996.

DIEBOLD, S. S.; KAISHO, T.; HEMMI, H.; AKIRA, S.; REIS, E. S. C. Innate antiviral response by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA, *Science*, vol. 303, p. 1529-1531, 2004.

DIMAS, K.; DEMETZOS, C.; MARSELLOS, M.; SOTIRIADOU, R.; MALAMAS, M.; KOKKINOPOULOS, D. Cytotoxic activity of labdane type diterpenes against human leukemic cell lines *in vitro*. *Planta Médica*, vol. 64, p. 208-211, 1998.

DING, W.; ALBRECHT, B.; LUO, R.; ZHANG, W.; STANLEY, J. R.; NEWBOUND, G. C.; LAIRMORE, M. D. Endoplasmic reticulum and cis-Golgi localization of human T-lymphotropic virus type 1 p12 (I): association with calreticulin and calnexin. *J Virol*. Vol. 75: p. 7672–7682, 2001.

DINSMORE, J.; RATLIFF, J.; DEACON, T.; PAKZABAN, P.; JACOBY, D.; GALPERN, W. et al. Embryonic stem cells differentiated *in vitro* as a novel course of cells for transplantation. *Cell Transplant*. V. 5, p. 131–43. 2001.

DORWEILER, I. J.; RUONE, S. J.; WANG, H.; BURRY, R. W.; MANSKY, L.M. Role of the human T-cell leukemia virus type 1 PTAP motif in Gag targeting and particle release. *J. Virol*. Vol. 80: p. 3634-3643, 2006.

DUIN, D. V.; SHAW, A. C. Triggering TLR signaling in vaccination. *Trends in immunology*, v. 27, 2006.

EDLICH, R. F.; ARNETTE, J. A.; WILLIAMS, F. M. Global Epidemic of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type-I (HTLV-I). *The Journal of Emergency Medicine*, vol. 18, n. 1, p. 109-119, 2000.

EDWARDS, D.; FENIZIA, C.; GOLD, H.; CASTRO-AMARANTE, M. F.; BUCHMANN, C.; PISE-MASISON, C. A.; AND FRANCHINI, G. *Orf-I* and *Orf-II*-Encoded Proteins in HTLV-1 Infection and Persistence. *Viruses*. Vol. 3 (6): 861–885, 2011.

EGUCHI, K.; MATSUOKA, N.; IDA, H.; NAKASHIMA, M.; SAKAI, M.; SAKITO, S.; KAWAKAMI, A.; TERADA, K.; SHIMADA, H.; KAWABE, Y.; FUKUDA, T.; SAWADA, T.; NAGATAKI, S. Primary Sjögren síndrome with antibodies to HTLV-1: clinical and laboratory features. *Annals of the rheumatic diseases*, vol. 51, p. 769-776, 1992.

EHRlich, G. D.; GREENBERG, S.; ABBOTT, M. A. Detection of human T-cell lymphoma/leukemia viruses. In INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (eds). *PCR protocols: A guide to methods and applications*, San Diego, California, Academic Press, p. 324-336, 1990.

ELOVAARA, I.; KOENIG, S.; BREWAH, A. Y.; WOODS, R. M.; LEHKY, T.; JACOBSON, S. High human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific precursor cytotoxic T lymphocyte frequencies in patients with HTLV-1-associated neurological disease. *Journal of Experimental Medicine*, vol. 177, p. 1567-1573, 1993.

ELVIN-LEWIS. Should we be concerned about herbal remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 75, p. 141-164, 2001.

ENOSE-AKAHATA, Y.; YUETSU, E.; TANAKA, O. H.; JACOBSON, S. Minocycline modulates antigen-specific CTL activity through inactivation of mononuclear phagocytes in patients with HTLV-I associated neurologic disease *Retrovirology*. Vol. 9: p. 16, 2012.

FABER-ZUSCHRATTER, H.; SEIDENBECHER, T.; REYMANN, K.; WOLF, G. Ultrastructural distribution of NADPH-diaphorase in the normal hippocampus and after long-term potentiation. *J Neural Transm Gen Sect.* v. 103: 807–817, 1993.

FERREIRA, I. D.; ROSÁRIO, V. E.; CRAVO, P. V. L. Real-time quantitative PCR with SYBR Green I detection for estimating copy numbers of nine drug resistance candidate genes in *Plasmodium falciparum*. *Mol Aspects Med.* vol, 27 (2-3), p. 95-125, 2006.

FESEN, M. R.; KOHN, K. W.; LETEURTRE, F.; POMMIER, Y. Inhibitors of human immunodeficiency virus integrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 90, p. 2399-2403, 1993.

FLAIG, K.; JAIN, P.; MOSTOLLER, K. WIGDAHL. Protein-protein interaction between HTLV-I Tax protein and the components of the cellular secretory pathway. *Retrovirology*, vol. 2, p. 1, 2005.

FLAJNIK, M. F.; DU-PASQUIER, L. Evolution of innate and adaptative immunity: can we draw a line? *Trend Immunol.*; vol. 25: P. 640-644, 2004.

FRANCHINI, G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. *The journal of the American society of hematology*, vol. 86 (10), p. 3619-3639, Nov. 1995.

FREIMOSER, F. M.; JAKOB, C. A.; AEBI, M.; TUOR, U. The MTT [3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromide] Assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, p. 3727-3729, 1999.

FRIST, J. H.; FERRERO, R. L.; PHILPOTT, D. J.; GIRARDIN, S. E. NOD-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nature immunology*, v. 7, 2006.

FUJII, M.; SASSONE-CORSI, P.; VERMA, I. M. c-fos promoter trans-activation by the tax1 protein of human T-cell leukemia virus type I. *Proceedings of the National Academy of Sciences San Diego*, vol.85, p. 8526- 8530, 1988.

FUJINO, T.; KAWATO, K.; IKEDA, M.; MIYAKOSHI, H.; MIZUKOSHI, M.; IMAI, J. Improvement of gelatin particle agglutination test for detection of anti-HTLV-I antibody. *Japanese Journal of Cancer Research*, vol. 82, p. 367-370, 1991.

FUJINO, T.; IWAMOTO, I.; OTSUKA, H.; IKEDA, T.; TAKESAKO, S.; NAGATA, Y. Apoptosis in placentas from HTLV-I-seropositive pregnant women: a possible defense mechanism against HTLV-I transmission from mother to fetus. *Obstetetric & Gynecology*, vol. 94, p. 279-283, 1999.

FUJINO, T.; NAGATA, Y. HTLV-I Transmission from mother to child. *Journal of Reproductive Immunology*, vol. 47, p. 197-206, 2000.

FUJISAWA, J.; SEIKI, M.; SATO, M.; AND YOSHIDA, M. A transcriptional enhancer sequence of HTLV-I is responsible for trans-activation mediated by p40x of HTLV-I .*The EMBO Journal*, vol.5 (4), p. 713 -718, 1986.

FUJISAWA, J.; SEIKI, M.; SATO, M.; AND YOSHIDA, M. A transcriptional enhancer sequence of HTLV-I is responsible for trans-activation mediated by p40x of HTLV-I. *The EMBO Journal*, vol. 5 (4), p.713 -718, 1986.

FUJISAWA, J. I.; SEIKI, M.; KIOKAWA, T.; YOSHIDA, M. Functional activation of the long terminal repeat of human T-cell leukemia virus type I by a trans-acting factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.82, p. 2277-2281, 1985.

FUKUSHIMA, T.; MIYAZAKI, Y.; HONDA, S.; KAWANO, F.; MORIUCHI, Y.; MASUDA, M.; TANOSAKI, R.; UTSUNOMIYA, A.; UIKE, N.; YOSHIDA, S.; OKAMURA, J.; TOMONAGA, M. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation provides sustained long-term survival for patients with adult T-cell leukemia/lymphoma, vol. 19 (5): p. 829-34, 2005.

GALVÃO-CASTRO, B.; LOURES, L.; RODRIGUES, L. G.; SERENO, A.; FERREIRA-JUNIOR, O. C.; FRANCO, L. G. et al. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors; a nationwide Brazilian study. *Transfusion*, vol. 37, p. 242-3, 1997.

GAO, S.; and SINGH, J. In vitro percutaneous absorption enhancement of lipophilic drug tamoxifen by terpenes. *Journal of Control Release*, vol. 51, p. 193-199, 1998.

GARCÍA-MEDIAVILLA, V.; CRESPO, I.; COLLADO, P. S.; ESTELLER, A.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; TUÑÓN, M. J.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *European Journal of Pharmacology*, vol. 28, p. 221-229, 2007.

GAZZINELLI, G. Molecular and cellular basis of interleukin 12 activity in prophylaxis and therapy against infectious diseases. *Molecular Medicine Today*, p. 258-267, 1996.

GEORGES, S. A.; KRAUS, W. L.; LUGER, K.; NYBORG, J. K.; AND LAYBOURN, P. J. p300-mediated Tax transactivation from recombinant chromatin: histone tail deletion mimics coactivator function. *Molecular Cellular Biology*, vol. 22, p. 127-137, 2002.

GERDES, H. H.; BUKORESHTLIEV, N. V.; BARROSO, J. F. Tunneling nanotubes: A new route for the exchange of components between animal cells. *FEBS Lett*, vol. 581: p. 2194-2201, 2007.

GESSAIN, A.; & DE THÉ, G. What is the situation of human T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) in Africa? Origin and dissemination of genomic subtypes. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*, vol. 13(Sup. 1), p. 228-235, 1996.

GESSAIN, A.; BARIN, F.; VERNANT, J. C.; GOUT, O.; MAURS, L.; CALENDER, A.; & THÉ, G. D. Antibodies to human T-lymphotropic virus type I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet*, 2: 407-410, 1985.

GHOSH, S.; HAYDEN, M.S. New regulators of NF-KappaB in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8 (11), p. 837-848, 2008.

GITLIN, S. D.; DITFMER, J.; SHIN, R. C.; AND BRADY, J. N. Transcriptional Activation of the Human T-Lymphotropic Virus Type I Long Terminal Repeat by Functional Interaction of Tax1 and Ets1. *Journal of Virology*, vol. 67, p. 7307-7316, 1993.

GOFF, S. Retroviridae: the retroviruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. Lippincott (Eds.), *Fields Virology*, Fourth ed. Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, p. 1871–1940, 2001.

GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; TUÑÓN, M. J. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutricion Hospitalaria*, vol. 22 (3), 287-293, 2007.

GOON, P. K.; HANON, E.; IGAKURA, T.; TANAKA, Y.; WEBER, J. N.; TAYLOR, G. P.; AND BANGHAM, C. R. M. High frequencies of Th1-type CD4+ T cells specific to HTLV-1 Env and Tax proteins in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Blood*, vol. 99, p. 3335-3341, 2002.

GOON, P. K.; IGAKURA, T.; HANON, E.; MOSLEY, A. J.; BARFIELD, A.; BARNARD, A. L.; KAFTANTZI, L.; TANAKA, Y.; TAYLOR, G. P.; WEBER, J. N.; AND BANGHAM, C. R. M. Human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-specific CD4+ T cells: Immunodominance Hierarchy and preferential infection with HTLV-I. *The journal of immunology*, vol. 172, p. 1735-1743, 2004.

GOTUZZO, E., CABRERA, J., DEZA, L., VERDONCK, K., VANDAME, A. M., CAIRAMPOMAR, R., VIZCARRA, D., CABADA, M., NARVARTE, G., DE LAS CASAS, C. Clinical characteristics of patients in peru with human t cell lymphotropic virus type 1-associated tropical spastic paraparesis. *Clinical Infectious Disease*, vol. 39 (7), p. 939-944, 2004.

GRANT, C.; BARMAK, K.; ALEFANTIS, T.; YAO, J.; JACOBSON, S.; AND W, B. Human T cell leukemia virus type I and neurologic diseases: events in bone marrow, peripheral blood, and central nervous system during normal immune surveillance and neuroinflammation. *Journal of cellular physiology*, vol. 190, p. 133-159, 2002.

GRASSMANN, R.; ABOUD, M.; JEANG, K. T. Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax. *Oncogene*, vol. 24, p. 5976-5985, 2005.

HADDAD, A., et al. Interaction between pyrin and the apoptotic speck protein (ASC) modulates ASC-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* Vol. 276 (42): p. 39320-39329, 2007.

HANCHARD, B.; GIBBS, W. N.; LOFTERS, W.; CAMPBELL, M.; WILLIAMS, E.; WILLIAMS, N.; JAFFE, E.; CRANSTON, B.; PANCHOOSINGH, L. D.; LAGRENADE, L.; WILKS, R.; MURPHY, E.; BLATTNER, W.; MANNS, A. *Human Retrovirology: HTLV*. Blattner WA (Ed). Raven Press: New York, p. 173–183, 1990.

HANON, E.; STINCHCOMBE, J. C.; SAITO, M.; ASQUITH, B. E.; TAYLOR, G. P.; TANAKA, Y.; WEBER, J. N.; GRIFFITHS, G. M.; BANGHAM, C. R. Fratricide among CD8(+) T lymphocytes naturally infected with human T cell lymphotropic virus type I. *Immunity*, vol. 13, p. 657-664, 2000.

HARADA, S. The broad anti-viral agent glycyrrhizin directly modulates the fluidity of plasma membrane and HIV-1 envelope. *Biochemical Journal*, vol. 392, p. 191-199, 2005.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. *Drug discovery today*, v. 13, p. 894-901, 2008.

HATTORI, T.; UCHIYAMA, T.; TOIBANA, T.; TAKATSUKI, K.; UCHINO, H. Surface Phenotype Japanese Adult T-Cell Leukemia Cells Characterized by Monoclonal Antibodies. *Blood*, vol. 58, n. 3, p. 645- 647, 1981.

HEIDECKER, G.; LLOYD, P. A.; FOX, K.; NAGASHIMA, K.; DERSE, D. Late assembly motifs of human T-cell leukemia virus type 1 and their relative roles in particle release. *J. Virol.* Vol. 78: p. 6636-6648, 2004.

HELL, F. et al. The toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol.* Vol. 33, p. 2987-2997, 2003.

HERMAN, M. A.; BIMBERG, D.; CHRISTEN, E. J Heterointerfaces in quantum wells and epitaxial growth processes: Evaluation by luminescence techniques. *Journal of Applied Physics*, Vol. 70 (2), 1991.

HINO, S.; KATAMINE, S.; MIYATA, H.; TSUJI, Y.; YAMABE, T.; MIYAMOTO, T. Primary prevention of HTLV-I in Japan. *Journal Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*, vol. 13, p. 15-19, 1996.

HINO, S.; KATAMINE, S.; MIYAMOTO, T.; DOI, H.; TSUJI, Y.; YAMABE, T.; KAPLAN, J. E.; RUDOLPH, D. L.; LAL, R. B. Association between Maternal Antibodies to the External Envelope Glycoprotein and Vertical Transmission of Human T-Lymphotropic Virus Type I. *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 95, p. 2920-2925, 1995.

HINUMA, Y.; NAGATA, K.; HANAOKA, M.; NAKAI, M.; MATSUMOTO, T.; KINOSHITA, K. I.; SHIRAKAWA, S.; MIYOSHI, I. Adult T-cell leukemia: Antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proceedings of the National Academy Sciences*, vol. 78 (10), p. 6476-6480, 1981.

HISADA, M.; OKAYAMA, A.; SHIOIRI, S.; SPIEGELMAN, D. L.; STUVER, S. O.; MUELLER, N. E. Risk Factors for Adult T-Cell Leukemia Among Carriers of Human T-Lymphotropic Virus Type I. *Blood*, vol. 92, n.10, p.3557-3561, 1998.

HÖLLSBERG, P.; HAFLER D. A. What is the pathogenesis of HAM/TSP? *Annals Neurology*, vol. 37, p. 143-145, 1995.

HU, C. Q.; CHEN, K.; SHI, Q.; KILKUSKIE, R. E.; CHENG, Y. C.; LEE, K. H. Anti-AIDS agents, 10 Acacetin-7-O-beta-d-galactopyranoside, an anti-HIV principle from *Chrysanthemum morifolium* and structure-activity correlation with some related flavonoids. *J. Nat Prod.*, vol. 57 (1), p. 42-51, 1994.

HUANG, S. C.; HO, C. T.; LIN-SHIAU, S. Y.; LIN, J. K. Carnosol inhibits the invasion of B16/F10 mouse melanoma cells by suppression metalloproteinase-9 through downregulating nuclear factor- κ B and c-Jun. *Biochemical Pharmacology*, vol. 69, p. 221-232, 2005.

HUDSON, J. B. *Antiviral compounds from plants.* CRC Press Florida, USA, p.119-131, 1990.

IKEDA, T.; YOKOMIZO, K.; OKAWA, M.; TSUCHIHASHI, R.; KINJO, J.; NOHARA, T.; UYEDA, M. Anti-herpes virus type 1 activity of oleanane-type triterpenoids. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 28, p. 1779-1781, 2005.

IGAKURA, T.; STINCHCOMBE, J. C.; GOON, P. K.; TAYLOR, G. P.; WEBER, J. N.; GRIFFITHS, G. M.; TANAKA, Y.; OSAME, M.; BANGHAM, C. R. Spread of HTLV-I

between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science*, vol. 299, 1713–1716, 2001.

ISHITSUKA K.; TAMURA, K. Treatment of adult T-cell leukemia/lymphoma: past, present, and future. *European Journal of Haematology*, Vol. 80, p. 185–196, 2008.

IWAKURA, Y.; SAIJO, S.; KIOKA, Y.; NAKAYAMA-YAMADA, J.; ITAGAKI, K.; TOSU, M.; ASANO, M.; KANAI, Y.; KAKIMOTO, K. Autoimmunity induction by human T cell leukemia virus type 1 in transgenic mice that develop chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in humans. *Journal of Immunology*, vol. 155, p. 1588-1598, 1995.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV. Toll-like receptor control of the adaptative immune response. *Nature immunology*, v. 5, 2004.

IZUMO, S.; GOTO, I.; ITOYAMA, Y.; OKAJIMA, T.; WATANABE, S.; KURODA, Y. et al. Interferon-alpha is effective in HTLV I-associated myelopathy: a multicenter, randomizes, double-blind, controlled trial. *Neurology*, vol 46 (4), p. 1016-1021, 1996.

IZUMO, S.; UMEHARA, F.; KASHIO, N.; KUBOTA, R.; SATO, E. Neuropathology of HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP) Leukemia. Vol. 11 (Suppl 3): p. 82–84, 1997.

JAIN, P.; MOSTOLLER, K.; FLAIG, K. E.; AHUJA, J.; LEPOUTRE, V.; ALEFANTIS, T.; KHAN, Z. K.; WIGDAHL, B. Identification of human T cell leukemia virus type 1 Tax amino acid signals and cellular factors involved in secretion of the viral oncoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282 (47), p. 34581-34593, 2007.

JANEWAY, C. A. JR., MEDZHITOV, R. Introduction: the role of innate immunity in the adaptative immune response. *Semin. Immunol.* Vol. 10, p. 349-350, 1998.

JASSAL, S. R.; POHLER, R. G.; BRIGHTY, D. W. Human T-cell leukemia virus type 1 receptor expression among syncytium-resistant cell lines revealed by a novel surface glycoprotein-immuno-adhesion. *The Journal of Virology*, p. 8371-8328, 2001.

JOHNSON, J. M.; NICOT, C.; FULLEN, J.; CIMINALE, V.; CASARETO, L.; MULLOY, J. C.; JACOBSON, S.; FRANCHINI, G. Free major histocompatibility complex class I heavy chain is preferentially targeted for degradation by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 p12 (I) protein. *J Virol.* Vol. 75: p. 6086–6094, 2001.

JONES, K. S.; PETROW-SADOWSKI, C.; BERTOLETT, D. C.; HUANG, Y.; AND RUSCETTI, F. W. Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4+ T cells. *Journal of Virology*, vol. 79, p. 12692-12702, 2005.

JOURNO, C.; MAHIEUX, R. HTLV-1 and Innate Immunity. Review, vol. 3 (8), p. 1374-1394, 2011.

JÚNIOR, D. V.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; CASSALI, G. D.; RIBEIRO, E. L.; ZANI, C. L.; MELO, M. M. Efeito do miriadenolídeo isolado de *Alomia myriadenia* (Asteraceae) sobre o tumor de Erlich ascítico no camundongo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, vol. 58 (5), p. 788-798, 2006.

KAGAYAMA, M.; SASANO, Y.; SATO, H.; KAMAKURA, S.; MOTEGI, K.; MIZOGUCHI, I. Confocal microscopy of dentinal tubules in human tooth stained with alizarin red. *Anat. Embriol.* Vol. 199 (3), p. 233-238, 1999.

KALYANARAMAN, V. S.; SARNGADHARAN, M. G.; ROBERT-GUROFF, M.; MIYOSHI, I.; BLAYNEY, D.; GOLDE, D.; & GALLO, R. C. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science*, vol. 218, p. 517-573, 1982.

KAPLAN, J. E.; KHABBAZ, R. F.; MURPHY, E. L.; HERMANSEN, S.; ROBERTS, C.; LAL, R.; HENEINE, W.; WRIGHT, D.; MATIJAS, L.; THOMSON, R.; RUDOLPH, D.; SWITZER, W. M.; KLEINMAN, S.; BUSCH, M.; SCHREIBER, G. B. Male-to-Female Transmission of Human T-Cell Lymphotropic Virus Types I and II: Association with Viral Load. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*, vol. 12, n. 2, p. 193-201, June 1996.

KASHANCHI, F.; AND BRADY, J. N. Transcriptional and post-transcriptional gene regulation of HTLV-1. *Oncogene*, vol. 24, p. 5938-5951, 2005.

KAWAI, T.; AND AKIRA, S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann. NY Acad. Sci.* v. 20, p. 1143:1151, 2008.

KAZANJI, M.; & GESSAIN, A. Human T-cell lymphotropic virus types I and II (HTLV-I/II) in French Guiana: clinical and molecular epidemiology. *Caderno Saúde Pública Rio de Janeiro*, vol. 19, p. 1227–1240, 2003.

KHABBAZ, R. F.; FUKUDA, K.; KAPLAN, J. E. Guidelines for counseling human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) – and HTLV type II-infected persons. *Transfusion*, vol. 33 (8), p. 694, 1993.

KHAN, M. T.; ATHER, A.; THOMPSON, K. D.; GAMBARI, R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. *Antiviral Res.*, vol. 67, p. 107-119, 2005.

KHEMALEELAKUL, S.; BAUMGATHER, J. C.; PRUKSAKOM, S. Autoaggregation and coaggregation of bacteria associated with acute endodontic infections. *J. Endod.* Vol. 32 (4), p. 312-318, 2006.

KNIGHT, V.; SANGLIER, J. J.; DITULIO, D.; BRACCILI, S.; BONNER, P.; WATERS, J.; HUGHES, D.; ZHANG, L. Diversifying microbial natural products for drug discovery. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 62, p. 446-458, 2003.

KITAJIMA, I.; MARUYAMA, K.; SATO, K.; NAKAJIMA, Y.; NAKAJIMA, T.; MARUYAMA, I.; OSAME, M.; NISHIOKA, K. Detection of human T cell leukemia virus type I proviral DNA and gene expression in sinovial cells in chronic inflammatory arthropathy. *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 88, p. 1315-22, 1991.

KLAPAN, J. E.; OSAME, M.; KUBOTA, H.; IGATA, A.; NISHITANI, H.; MAEDA, Y.; KHABBAZ, R. F.; JANSSEN, R. S. The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*, vol. 11, p. 1096-1101, 1990.

KNOPLICH, J. *Enfermidades da coluna vertebral*. 3ed. São Paulo: Robe Editorial, 2003.

KOIKE, M.; ISHINO, K.; KOHNO, Y.; TACHIKAWA, T.; KARTASOVA, T.; KUROKI, T. et al. DMSO induces apoptosis in SV40-transformed human keratinocytes, but not in normal keratinocytes. *Cancer Lett.* 29: p. 185–93, 1996.

KOMURO, A.; HAYAMI, M.; FUJII, H.; MIYAHARA, S.; HIRAYAMA, M. Vertical Transmission of Adult T-Cell Leukemia Virus. *The Lancet*, vol.1, p. 240, 1983.

KORALNIK, I. J.; LEMP, J. F. JR.; GALLO, R. C.; FRANCHINI, G. In vitro infection of human macrophages by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I (HTLV-I). *AIDS research and human retroviruses*, vol. 8: p. 1845-1849, 1992.

KWON, H. M. ; CHOI, Y. J. ; JEONG, Y. J. et al. Anti-inflammatory inhibition of endothelial cell adhesion molecule expression by flavone derivatives. *J Agric Food Chem.*, vol. 53, p. 5150-5157, 2005.

LAL, R. B.; BUCKNER, C.; KHABBAZ, R. F.; KAPLAN, J. E.; REJES, G.; HADLOCK, K.; LIPKA, J.; FOUNG, S. K. H.; CHAN, L.; AND COLIGAN, J. E. Isotypic and IgG subclass restriction of the humoral immune responses to human T- lymphotropic virus type-I. *Clinical Immunology and Immunopathology* vol. 67 (1): p. 40-49, 1993.

LAMEIRA, J.; MEDEIROS, I. G.; REIS, M.; SANTOS, A. S.; ALVES, C. N. Structure-activity relationship study of flavone compounds with anti-HIV-1 integrase activity: a density functional theory study. *Bioorg Med Chem.*, vol. 14 (21), p. 7105-7112, 2006.

LAPAQUE, N.; MORIYON, I.; MORENO, E.; GORVEL, J. P. *Brucella lipopolysaccharide* acts as a virulence factor. *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 8: p. 60-66, 2005.

LEE, I. S.; MA, X.; CHAI, H. B.; MADULID, D. A.; LAMONT, R. B.; O'NEILL, M. J.; BESTERMAN, J. M.; FARNSWORTH, N. R.; SXOEJARTO, D. D.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Novel cytotoxic labdane diterpenoids from *Neouvaria acuminatissima*. *Tetrahedron*, vol. 51 (1), p. 21-28, 1995.

LEE, J. et al. Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 100, p. 6646-6651, 2003.

LI, J.; HUANG, H.; ZHOU, W.; FENG, M.; ZHOU, P. Anti-hepatitis B virus activities of *Geranium carolinianum* L. Extracts and identification of the active components. *Biol. Pharm. Bull.* Vol. 31, p. 743-747, 2008.

LI, M.; GREEN, P. L. Detection and quantitation of HTLV-1 and HTLV-2 mRNA species by real-time RT-PCR *Journal of Virological Methods*, vol. 142, p. 159–168, 2007.

LINDHOLM, P. F.; REID, R. L.; BRADY, J. N. Extracellular Ta_{x1} protein stimulates tumor necrosis factor- β and immunoglobulin kappa light chain expression in lymphoid cells. *Journal Virology*, vol., 66 (3), p. 1294-1302, 1992.

LIU, S.; LU, H.; ZHAO, Q.; HE, Y.; NIU, J.; DEBNATH, A. K.; WU, S.; JIANG, S. Theaflavin derivatives in black tea and catechin derivatives in green tea inhibit HIV-1 entry by targeting gp41. *Biochim. Biophys Acta*, v. 25, p. 270-281, 2005.

LIU, H.; SHAH, M.; STRAMER, S. L.; CHEN, W.; WEIBLEN, B. J.; MURPHY, E. L. Sensitivity and specificity of human T-lymphotropic virus (HTLV) type-I and II polymerase chain reaction and several serological assays in screening a population with a high prevalence of HTLV-II. *Transfusion*, vol. 39 (11-12), p. 1185-1193, 1999.

LIU, J.; YOSHIKAWA, H.; NAKAJIMA, Y.; TASAKA, K.; LIU, Y. C.; YANG, Z. Y.; DU, J.; YAO, X. J.; LEI, R. X.; ZHENG, X. D.; LIU, J. N.; HU, H. S.; LI, H. Study on the interactions of kaempferol and quercetin with intravenous immunoglobulin by fluorescence quenching, fourier transformation infrared spectroscopy and circular dichroism spectroscopy. *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 56 (4), p. 443-451, 2008.

LU, H.; PISE-MASISON, C. A.; FLETCHER, T. M.; SCHILTZ, R. L.; NAGAICH, A. K.; RADONOVICH, M.; HAGER, G.; COLE, P. A.; AND BRADY, J. N. Acetylation of nucleosomal histones by p300 facilitates transcription from tax-responsive human T-cell leukemia virus type 1 chromatin template. *Molecular Cellular Biology*, vol. 22, p. 4450–4462, 2002.

LUND, J. M. et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 101, p. 5598-5603, 2004.

LUND, J.; SATO, A.; AKIRA, S.; MEDZHITOV, R.; IWASAKI, A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.*, vol. 198, p. 513-520, 2003.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; AND NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology, *Nucl. Acids Res.* 30, p. 1292–1305, 2002.

MACKENZIE, G. G.; CARRASQUEDO, F.; DELFINO, J. M.; KEEN, C. L.; FRAGA, C. G.; OTEIZA, P. I. Epicatechin, catechin, and dimeric procyanidins inhibit PMA-induced NF-kappaB activation at multiple steps in Jurkat T cells. *FASEB J.*, vol. 18, p. 167-169, 2004.

MAH, T. F.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* Vol. 9 (1): p. 34-9, 2011.

MALIM, M. H.; BIENIASZ, P. D. HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

MANEL, N.; BATTINI, J. L.; TAYLOR, N.; AND SITBON, M. HTLV-1 tropism and envelope receptor. *Oncogene*, vol. 24, p. 6016-6025, 2005.

MANNS, A.; HISADA, M.; & LA-GRENADE, L. Human T-lymphotropic virus type I infection. *Lancet*, vol. 353, p. 1951–1958, 1999.

MANNS, A.; MURPHY, E. L.; WILKS, R. et al. Detection of early human T-cell lymphotropic virus type I antibody patterns during seroconversion among transfusion recipients. *Blood*, vol. 77, p. 896-905, 1991.

MARRIOTT, S. J.; SEMMENS, O. J. Impact of HTLV-1 Tax on cell progression and the cellular DNA damage repair response. *Oncogene*, vol. 24, p. 5986-5995, 2005.

MARTHYN, P.; BEUSCART, A.; COLL, J.; MOREAU-GOCHELIN, F.; RIGHI, M. DMSO reduces CSF-1 receptor levels and causes apoptosis in *v-myc* immortalized mouse macrophages. *Exp Cell Res*, vol. 243: p. 94–100, 1998.

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 27, p. 229–265, 2009.

MARTINS, M. L.; SANTOS, A. C.; NAMEN-LOPES, M. S.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F.; UTSCH, D. G.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. Long-term serological follow-up of blood donors with an HTLV-indeterminate western blot: antibody profile of seroconverters and individuals with false reactions. *J Med Virol. Vol. 82 (10)*: p. 1746-53. 2010.

MATSUMOTO, M. et al. Subcellular localization of toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol. Vol. 171*, p. 3154-3162, 2003.

MASUKO, K.; KATO, T.; NISHIOKA, K. Virus-associated Arthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, vol. 17, p. 309-318, 2003.

MATSUOKA, M. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). *Retrovirology*, vol. 2 (27), p. 1-13, 2005.

MATSUOKA, M.; JEANG, K. T. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, p. 270–280, 2007.

MATSUOKA, M.; JEANG, K. T. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and leukemic transformation: viral infectivity, Tax, HBZ and therapy. *Oncogene*, vol. 30, p. 1379–1389, 2011.

MATUTES, E.; TAYLOR, G. P.; CAVENAGH, J.; PAGLIUCA, A.; BAREFORD, D.; DOMINGO, A.; HAMBLIN, M.; KELSEY, S.; MIR, N.; & REILLY, J. T. Br. J. Haematol. 113: 779–784. IN: TAYLOR, G. P.; MATSUOKA, M. Natural history of adult T-cell leukemia/lymphoma and approaches to therapy. *Oncogene*, vol. 5; 24 (39), p. 6047-6057, 2005.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.*, vol. 1, p. 135-145, 2001.

MELO, P. S. et al. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. In: MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 52 (4), p. 673-751, 2000.

MICHAEL, B.; NAIR, A. M.; LAIMORE, M. D. Role of accessory proteins of HTLV 1 in viral replication, T cell activation, and cellular gene expression. *Front. Biosci. Vol. 9*, p. 2527-2539, 2004.

MIYOSHI, I.; MIYAMOTO, K.; SUMIDA, M.; NISHIHARA, R.; LAI, M.; YOSHIMOTO, S. AND SATO, J. Chromosome 14q+ in adult T-cell leukemia. *Cancer Genetics Cytogenetics*. vol. 3 (3), p. 251-259, 1981.

MOGENSEN, T. H.; PALUDAN, S. R. Molecular pathways in virus-induced cytokine production. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 65, p.131-150, 2001.

MONTANHEIRO, P. A.; OLIVEIRA, A. C.; POSADA-VERGARA, M. P.; MILAGRES, A. C.; TAUIL, C.; MARCHIORI, P. E.; DUARTE, A. J.; CASSEB, J. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral DNA viral load among asymptomatic patients and patients with

HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Braz J Med Biol Res.* Vol. 38 (11): p. 1643-7. 2005.

MORA, C.; OSAME, M.; JACOBSON, L. Human T-lymphotropic Virus Type I-associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis: Therapeutic Approach. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*, vol. 5, p. 443-455, 2003.

MORIUCHI, M.; AND MORIUCHI, H. Transforming growth factor- β enhances human T-cell leukemia virus type I infection. *Journal of Virology*, vol. 71, p.343-346, 2002.

MORIUCHI, M. H.; INOUE, H. Reciprocal interactions between human T-lymphotropic virus type 1 and prostaglandins: implications for viral transmission. *Journal of Virology*, vol. 75, p. 192-198, 2001.

MORIUCHI, M.; MORIUCHI, H. Seminal Fluid Enhances Replication of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1: Implications for Sexual Transmission. *Journal Virology*, vol. 78 (22): p. 12709–12711, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: applications to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, vol. 65, p. 55-63, 1983.

MOTOKAWA, S.; HASUNUMA, T.; TAJIMA, K. et al. High prevalence of arthropathy in HTLV-1 carriers on a Japanese island. *Ann Rheum Dis.*, vol. 55, p. 193-195, 1996.

MURAOKA, K.; SHIMIZU, K.; SUN, X.; TANI, Y.; IZUMUMI, R.; MIWA, K.; y cols. Flavonoids exert diverse inhibitory effects on the activation of NF- κ B. *Transplant proc.*, vol. 34, p. 1335-1340, 2002.

MURPHY, E. L.; WANG, B.; SACHER, R. A.; FRIDEY, J.; SMITH, J. W.; NASS, C. C.; NEWMAN, B.; OWNBY, H. E.; GARRATTY, G.; HUTCHING, S. T.; SCHREIBER, G. B. Respiratory and urinary tract infections, arthritis, and Asthma associated with HTLV-I and HTLV-II infection. *Emerg Infec Dis.*, vol. 10, p. 109-116, 2004.

MURPHY, E. L.; FIGUEROA, J. P.; GIBBS, W. N.; HOLDING-COBHAM, M.; CRANSTON, B.; MALLEY, K.; BODNER, A. J.; ALEXANDER, S. S.; BLATTNER, W. A. Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) seroprevalence in Jamaica. I. Demographic determinants. *American Journal of Epidemiology*, vol. 133 (11), p. 1114–1124, 1991.

MURPHY, E. L.; FIGUEROA, J. P.; GIBBS, W. N.; BRATHWAITE, A.; HOLDING-COBHAM, M.; WATERS, D.; CRANSTON, B.; HANCHARD, B.; BLATTNER, W. A. Sexual Transmission of Human T-Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I). *Annals of Internal Medicine*, Bethesda, vol. 111, p. 555-560, 1989.

NAKAGAWA, M.; NAKAHARA, K.; MARUYAMA, Y.; KAWABATA, M.; HIGUCHI, I.; KUBOTA, H. et al. Therapeutic trials in 200 patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurovirology*, vol 2, p. 345-355, 1996.

NAM, S.H.; KIDOKORO, M.; SHIDA, H.; HATANAKA, M. 1988. Processing of *gag* precursor polyprotein of human T-cell leukemia virus type I by virus-encoded protease. *J. Virol.* 62, 3718–3728.

NAM, S. H.; COPELAND, T. D.; HATANAKA, M.; OROSZLAN, S. Characterization of Ribosomal Frameshifting for Expression of *pol* Gene Products of Human T-Cell Leukemia Virus Type I. *Journal Virology*, v. 67, n. 1, p. 196-203, 1993.

NAM, S. H.; KIDOKORO, M.; SHIDA, H.; HATANAKA, M. Processing of gag Precursor Polyprotein of Human T-Cell Leukemia Virus Type I by Virus-Encoded Protease. *J. Virology*, v. 62, n. 10, p. 3718- 3728, Oct. 1988.

NARUKAMA, N.; SHIZAKI, K.; KITABATA, Y.; ABE, T.; KOBATA, H.; AKIZAWA, T. Plasma Exchange for the treatment of human T-cell lymphotropic virus type 1 associated myelopathy. *The Apher.*, vol. 5 (6), p. 491-493, 2001.

NASR, R.; ROSENWALD, A.; EL-SABBAN, M. E.; ARNULF, B.; ZALLOUA, P.; LEPELLETIER, Y.; BEX, F.; HERMINE, O.; STAUDT, L.; DE THE H & BAZARBACHI, A. (2003) *Blood* 101: 4576–4582. IN: TAYLOR, G. P.; MATSUOKA, M. Natural history of adult T-cell leukemia/lymphoma and approaches to therapy. *Oncogene*, vol. 5; 24 (39), p. 6047-6057, 2005.

NEJMEDDINE, M.; BARNARD, A. L.; TANAKA, Y.; TAYLOR, G. P.; BANGHAM, C. R. M. Human T-lymphotropic Virus, Type 1, Tax Protein Triggers Microtubule Reorientation in the virological Synapse. *J. Biol. Chem.*, vol. 280 (33), p. 29653-29660, 2005.

NEJMEDDINE, M.; NEGI, V. S.; MUKHERJEE, S.; TANAKA, Y.; ORTH, K.; TAYLOR, G. P.; BANGHAM, C. R. HTLV-1 Tax and ICAM-1 act on T-cell signal pathways to polarize the microtubule-organizing center at the virological synapse. *Blood*, vol. 114, p. 1016–1025. 2009.

NEHYBA, J. et al. A novel interferon regulatory factor (IRF), IRF- 10, has a unique role in immune defense and is induced by the v-Rel oncoprotein. *Mol Cell Biol*. vol. 22: p. 3942–57, 2002.

NEHYBA, J.; HRDLICKOVA, R.; BOSE, H. R. Dynamic evolution of immune system regulators: the history of the interferon regulatory factor family. *Mol Biol Evol*. Vol. 26: p. 2539–2550, 2009.

NEVES, B.; VILELA, J. ANDRADE, M. Microscopia de varredura por sonda mecânica: uma introdução. *Cerâmica*, v. 44, 1998.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as source of drugs over the last 25 years. *Journal of natural products*, v. 70, p. 461-477, 2007.

NICOLETTI, I.; MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M. C.; GRIGNANI, F.; RICCARDI, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Meth*. Vol. 139: p. 271-279, 1991.

NICOT, C.; HARROD, R. L.; CIMINALE, V.; FRANCHINI, G. Human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 nonstructural genes and their functions. *Oncogene*. Vol. 24: p. 6026–6034, 2005.

NIESTERS, H. G. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques, *Methods*. Vol. 25, p. 419–429, 2001.

NISHIOKA, K.; KITAJIMA, I.; YAMAMOTO, K. Novel mechanism of synovial proliferation caused by human T leukemia/lymphotropic virus type 1. *Arthritis & Rheumatism*, vol. 34, p. 33, 1991.

NISHIOKA, K.; SUMIDA, T.; HASUNUMA, T. Human T lymphotropic virus type I in arthropathy and autoimmune disorders. *Arthritis & Rheumatism*, vol. 39, p. 1410-1418, 1996.

NISHIZAWA, Y.; SOEKI, K.; HIRAI, H.; YAZAKI, Y.; TAKAKU, F.; YOU, A. Potent inhibition of cells density-dependent apoptosis and enhancement of survival by dimethyl sulfoxide in human myeloblastic HL-60 cells. *J Cell Physiol*, vol. 174: p. 135–43, 1998.

NYGREN, P.; LARSSON, R.; RASTAD, J.; AKERSTROM, G.; GYLFE, E. Dimethylsulfoxide increases cytoplasmic Ca²⁺ concentration and inhibits parathyroid hormone release in normal bovine and pathological human parathyroid cells. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 928, p. 194-198, 1987.

OGAWA, N. L. et al. Involvement of the interferon-gamma-induced T cell-attracting chemokines, interferon-gamma-inducible 10-kd protein (CXCL10) and monokine induced by interferon-gamma (CXCL9), in the salivary gland lesions of patients with Sjogrens syndrome. *Arthritis Rheum*, v. 46, n. 10, p. 2730-2741, 2002.

OH, U.; YAMANO, Y.; MORA, C. A.; OHAYON, J.; BAGNATO, F.; BUTMAN, J.; DAMBROSIA, J.; LEIST, T. P.; MCFARLAND, H.; JACOBSON, S. Interferon- α 1a therapy in human T-lymphotropic virus type-I-associated neurologic disease. *Ann Neurol.*, vol 57, p. 526-534, 2005.

OKOCHI, K.; SATO, H.; HINUMA, Y. A retrospective study on transmission of adult T cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. *Vox Sanguinis*, vol. 46, p. 245-253, 1983.

ONO K.; NAKAME, H. Mechanisms of inhibition of various cellular DNA and RNA polymerases by several flavonoids. *J. Biochem.*, vol. 108, p. 609-613, 1990.

OLIÈRE, S.; DOUVILLE, R.; SZE, A.; BELGNAOUI, S.M.; HISCOTT, J. Modulation of innate immune responses during human T-cell leukemia virus (HTLV-1) pathogenesis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2011.

ORLAND, J. R.; ENGSTROM, J.; FRIDEY, J.; SACHER, R. A.; SMITH, J. W.; NASS, C.; GARRATTY, G.; NEWMAN, B.; SMITH, D.; WANG, B.; LOUGHLIN, K.; AND MURPHY E. L. Prevalence and clinical features of HTLV neurologic disease in the HTLV Outcomes Study. *Neurology*, vol. 61, p. 1588-1594, 2003.

OSAME, M.; USUKU, K.; IZUMO, S.; IJICHI, N.; IGATA, A. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet*, 1: 1031-1032, 1986.

OSAME, Mitsuhiro. Pathological mechanisms of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy (HAM/TSP). *Journal of Neurovirology*, vol. 8, p. 359-364, 2002.

OSAME, Mitsuhiro. The past, the present and the future of HAM/TSP research. *Evening Seminar*, p. 1-23, 1998.

OVERBAUGH, J.; MILLER, A. D.; AND EIDEN, M. V. Receptors and entry cofactors for retroviruses include single and multiple transmembrane-spanning proteins as well as newly described glycoposphatidylinositol-anchored and secreted proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 65, p. 371–389, 2001.

PADUCH, R.; KANDEFER-SZERSZÉN, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREX, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, vol. 55, p. 315-327, 2007.

PAINE, E.; GU, R.; RATNER, L. Structure and expression of the human T-cell leukemia virus type 1 envelope protein. *Virology*, vol. 199, p. 331–338, 1994.

PAWSON, R.; MUFTI, G. J.; AND PAGLIUCA, A. Management of adult t-cell leukaemia/lymphoma. *British Journal of Haematology*, vol. 100, p. 453-458, 1998.

PETFORD-LONG, A. K.; CHIARAMONTI, A. N. Transmission Electron Microscopy of Multilayer Thin Films. *Annual Review of Materials Research*, v. 38, p. 559-584, 2008.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, vol. 29, p. 2002-2007, 2001.

PICHLMAIR, A.; SCHULZ, O.; TAN, C. P.; NASLUND, T. I.; LILJESTROM, P. et al. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science*, vol. 314: p. 997-1001, 2006.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. *Química Nova*, São Paulo, v. 25, Supl.1, p. 45-61, 2002.

POIESZ, B. J.; RUSCETTI, F. W.; GAZDAR, A. F.; BUNN, P. A.; MINNA, J. D.; GALLO, R. C. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy Sciences*, vol. 77, n. 12, p. 7415-7419, 1980.

POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S.; MATUTES, E.; SCHULZ, T.; CARVALHO, S. M.; NORONHA, H.; REAVES, J. D.; LOUREIRO, P.; MACHADO, C.; & CATOVSKY, D. T-cell malignancies in Brazil. Clinico-pathological and molecular studies of HTLV-I positive and negative cases. *International Journal of Cancer*, vol. 60, p. 823-827, 1995.

PONZIO, G.; LOUBAT, A.; ROCHET, N.; TURCHI, L.; REZZONICO, R.; FARAH, F. A. R. D. et al. Early G1 growth arrest of hybridoma B cells by DMSO involves cyclin D inhibition and p21^{wCIP1} permeability transition and caspase-9 activation in dimethyl sulfoxide-induced apoptosis of EL-4 lymphoma cells. *Int. Immunopharmacol.*, v.1, p.63-74, 2001.

PROIETTI, F. A.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F.; CATALAN-SOARES, B.; MURPHY, E. L. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene*, vol. 24, p. 6058-6068, 2005.

PROIETTI, F.A. Seroprevalence correlates of human T-cell leukemia/lymphoma virus type II, human T-cell leukemia/lymphoma virus type II/ human immunodeficiency virus type 1 serostatus and clinical manifestations of human T-cell leukemia/lymphoma virus type II infection among intravenous drug users in Baltimore, Maryland [PhD Thesis]. Baltimore: Johns Hopkins School of Hygiene and Public Health; 1992.

RIBAS, J.; MELO, G. Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-I) - Associated Myelopathy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 35(4), p. 377-84, 2002.

RIBAS, J. G. R.; MELO, G. C. N. Mielopatia associada ao vírus linfotrófico humano de células T do tipo 1 (HTLV-1). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 35 (4), p. 377-384, 2002.

RICHARDS, N.; SCHANER, P.; DIAZ, A.; STUCKEY, J.; SHELDEN, E.; WADHWA, A.; GUMUCIO, D. L. Pryn, product of the MEFV locus, interacts with the proapoptotic protein, Zhong. *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 109, p. 215-293, 2005.

ROBIN, K. A. Vaccination of Immunossupressed Adult Patient with Rheumatologic disease. *Rheum Dis Clin North Am*, vol. 25, p. 567-83, 1999.

RODGERS, P. E. The clinical features and etiology if the neuropathic syndrome in Jamaica. *West Indian Medical Journal*, vol. 14, p.36-47, 1965.

RODGERS-JOHNSON, P.; GAJDUSEK, D. C.; MORGAN, O. S.; ZANINAVIC, V.; SARIN, P. S.; GRAHAM, D. S. HTLV-I and HTLV-III antibodies and tropical spastic paraparesis. *Lancet*, 2: 1246-1249, 1985.

ROSEN, C. A.; PARK, R.; SODROSKI, J. G.; AND HASELTINE, W. A. Multiple sequence elements are required for regulation of human T-cell leukemia virus gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 84, p. 4919-4923, 1987.

ROTHENFUSSER, S.; GOUTAGNY, N.; DIPERNA, G.; GONG, M.; MONKS, B. G.; SCHOENEMEYER, A.; YAMAMOTO, M.; AKIRA, S.; FITZGERALD, K. A. The RNA helicases Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J. Immunol.*, vol. 175, 2005.

ROUCOX, D. F.; WANG, B.; SMITH, D.; NASS, C. C.; SMITH, J.; HUTCHING, S. T.; NEWMAN, B.; LEE, T. H.; CHAFETS, D. M.; MURPHY, E. L. A prospective Study of Sexual Transmission of Human T Lymphotropic Virus (HTLV)-I and HTLV-II. *Journal of Infectious Disease*, San Francisco, vol. 191, p. 1490-1497, 2005.

RUDNICKA, D. et al. Simultaneous cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus to multiple targets through polysynapses. *J. Virol.* Vol. 83: p. 6234–6246, 2009.

RUIZ, P. A.; BRAUNE, A.; HOLZLWIMMER, G.; QUINTANILLA-FREND, L.; HALLER, D. Quercetin inhibits TNF-induced NF-kappaB transcription factor recruitment to proinflammatory gene promoters in murine intestinal epithelial cells. *J Nutr*, vol. 137, p. 1208-1215, 2007.

RUSSO, J. J. et al. Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma associated herpes virus (HHV8). *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 93: p. 14862–14867, 1996.

SAITO, M.; NOSE, H.; USUKU, K.; SABOURI, A. H.; MATSUZAKI, T.; IZUMO, S.; ARIMURA, K.; OSAME, M. Flow cytometry evaluation of the T-cell receptor Vbeta repertoire among human T-cell lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) infected individuals: effect of interferon alpha therapy in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Journal of Neurological Science*, vol. 246 (1-2), p. 37-43, 2006.

SALMINEN, A.; LEHTONEN, M.; SUURONEN, T.; KAARNIRANTA, K.; HUUSKONEN, J. Terpenoids: natural inhibitors of NF-κB signaling with anti-inflammatory and anticancer potencial. *Cellular and Molecular Life Sciences*, p. 1-21, 2008.

SANTANGELO, C.; VARI, R.; SCAZZOCCHIO, B.; DI-BENEDETTO, R.; FILESI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, intracellular signaling and inflammation. *Ann Ist Super Sanità*, vol. 43 (4), p. 394-405.

SANTOS, N.; CASTANHO, M. An overview of the biophysical applications of atomic force microscopy. *Biophysical Chemistry*, v. 107, p. 133-149, 2004.

SATO, K.; MARUYAMA, I.; MARUYAMA, Y.; KITAJIMA, I.; NAKAJIMA, Y.; HIGAKI, M.; YAMAMOTO, K.; MIYASAKA, N.; OSAME, M.; NISHIOKA, K. Arthritis in patients infected with human T lymphotropic virus type I. *Clinical and immunopathologic features. Arthritis & Rheumatism*, vol. 34, p. 714-721, 1991.

SATOH, T.; ISOBE, H.; AYUKAWA, K.; SAKAI, H.; NAWATA, H. The effects of pravastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on cell viability and DNA production of rat hepatocytes. *Life Sci*, vol. 59: p. 1103–1108. 1996.

SCHMIDT, O. G.; KERN, E. K. Interplay between Thermodynamics and Kinetics in the Capping of InAs/GaAs (001) Quantum Dots. *Physical Review Letters*, vol. 96, p. 2261- 2266, 2006.

SCHNEIDER, J.; YAMAMOTO, N.; HINUMA, Y.; HUNSMANN, G. Precursor Polypeptides of Adult T-Cell Leukemia Virus: Detection with Antisera against Isolated Polypeptides gp68, p24 and p19. *Journal of General Virology*, vol. 65, p. 2249-2258, 1984.

SCUDIERO, D. A.; SHOEMAKER, R. H.; PAULL, K. D.; MONKS, A.; TIERNEY, S.; NOFZIGER, T. H.; CURRENS, M. J.; SENIFF, D.; BOYD, M. R. Evaluation of a soluble tetrazolium/ formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res*, vol. 48: p. 4827– 4833. 1988.

SEBASTIAN, D.; NAYIAGER, S.; YORK, D. Y.; MODY, G. M. Lack of associated of Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infection and rheumatoid arthritis in an endemic area. *Clinical Rheumatology*, vol. 22, p. 30-32, 2003.

SEIKI, M.; HATTORI, S.; HIRAYAMA, Y.; YOSHIDA, M. Human adult T-cell leukemia virus: Complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proceedings of the National Academy Sciences*, vol. 80, p. 3618-3622, 1983.

SEMMES, O. J.; JEANG, K. T. Localization of human T-cell leukemia virus type 1 tax to subnuclear compartments that overlap with interchromatin speckles. *Journal Virology*, vol. 70, p. 6347-6357, 1996.

SEMMES, O.; JEANG, K. T. Mutational analysis of human T-cell leukemia virus type 1 Tax: regions necessary for function determined with 47 mutant proteins. *Journal Virology*, vol. 66, p. 7183-7192, 1992.

SENGUPTA, B.; SENGUPTA, P. K. The interaction of quercetin with human serum albumin: a fluorescence spectroscopic study *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 299, p. 400-403, 2002.

SHEARMAN, M. S. Cellular MTT reduction distinguishes the mechanism of action of beta-amyloid from that of tachykinin receptor peptides. *Neuropeptides*, vol. 30: p. 125–132. 1996.

SHEHU-XHILAGA, M.; ABLAN, S.; DEMIROV, D. G.; CHEN, C.; MONTELARO, R. C.; FREED, E. O. Late domain-dependent inhibition of equine infectious anemia virus budding. *J. Virol.* Vol. 78: p. 724-732, 2004.

SHEREMATA, W. A.; BENEDICT, D.; SQUILACOTE, D. C.; SAZANT, A.; DEFREITAS, E. High-dose zidovudina induction in HTLV-I-associated myelopathy: safety and possible efficacy. *Neurology*, vol. 43, p. 2125-2129, 1993.

SHIMOTHONO, K.; TAKAHASHI, Y.; SHIMIZU, N.; GOJOBORI, T.; GOLDE, DW.; CHEN, ISY, MIWA, M.; & SUGIMURA, T. Complete nucleotide sequence of an infections clone of human T-cell leukemia virus type II: an open reading frame for the protease gene. Proceedings of the. National Academy Sciences United States of America, vol. 82, p. 3101-3105, 1985.

SHINDO, D. HIRAGA, E. K. High-Resolution Electron Microscopy for Materials. Science, demyelinating disease 2012 John Wiley & Sons A/S Immunological Reviews Cell Physiol, vol. 216 (3): p. 595-602, 2009.

SHOHAM, N. G.; CENTOLA, M.; MANSFIELD, E.; HULL, K. M.; WOOD, G.; WISE, C. A.; KASTNER, D. L. Pypin binds the PSTPIP1/CD2BP1 protein, defining familial Mediterranean fever and PAPA syndrome as disorders in the same pathway. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 100 (23): p. 13501-13506, 2003.

SILVA, P. Farmacologia. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1998. IN: RIBAS, J. G. R.; MELO, G. C. N. Mielopatia associada ao vírus linfotrópico humano de células T do tipo 1 (HTLV-1). Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, vol. 35 (4), p. 377-384, 2002.

SMITH, M. R.; GREENE, W. C. Identification of HTLV-I *tax* transactivator mutants exhibiting novel transcriptional phenotypes. Genes & Development, vol. 4, p. 1875-1885, 1990.

SODROSKI, J.; PATARCA, R.; PERKINS, D.; BRIGGS, D. Sequence of Envelope Glycoprotein Gene of Type II Human Lymphotropic Virus. Science, Boston, vol.225, p.421-423, 1984.

SONADA, J.; KORIYAMA, C.; YAMAMOTO, S.; KOZAKO, T.; LI, H. C.; LEMA, C.; YASHIKI, S.; FUJIYOSHI, T.; YOSHINAGA, M.; NAGATA, Y.; TAKEZAKI, T.; YAMADA, K.; SONADA, S. HTLV-1 provirus load in peripheral blood lymphocytes of HTLV-1 carriers is diminished by green tea drinking. Cancer Sci., vol 95 (7), p. 596-601, 2004.

SOULAT, D.; BURCKSTUMMER, T.; WESTERMAYER, S.; GONÇALVES, A.; BAUCH, A.; STEFANOVIC, A.; HANTSCHHEL, O.; BENNETT, K. L.; DECKER, T.; SUPERTIFURGA, G. The DEAD-box helicases DDX3X is critical component of the TANK-binding kinase 1-dependent innate immune response. The EMBO Journal, v. 27, p. 2135-2146, 2008.

SOUZA-FAGUNDES, E. M. Mecanismos celulares e moleculares envolvidos na atividade imunomodulatória *in vitro* de um diterpeno de *Alomia myriadenia*. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte 2002.

SOUZA-FAGUNDES, E. M.; BRUMATTI, G.; MARTINS-FILHO, O. A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; ZANI, C. L.; AMARANTE-MENDES, G. P. Myriadenolide, a labdane diterpene isolated from *Alomia myriadenia* (asteraceae) induces depolarization of mitochondrial membranes and apoptosis associated with activation of caspases-8, -9, and -3 in Jurkat and THP-1 cells. Experimental Cell Research, vol. 290 (2), p. 420-426, 2003 B.

SOUZA-FAGUNDES, E. M.; GAZZINELLI, G.; PARREIRA, G. G.; MARTINS-FILHO, O. A.; AMARANTES-MENDES, G. P.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; ZANI, C. L. In vitro activity of labdane diterpene from *Alomia myriadenia* (Asteraceae): immunosuppression via induction of apoptosis in monocytes. International Immunopharmacology, vol. 3, p. 383-392, 2003 A.

SOUZA-FAGUNDES, E. M.; GAZZINELLI, G.; PARREIRA, G. G.; MARTINS-FILHO, O. A.; AMARANTE-MENDES, G. P.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; ZANI, C. L. In vitro activity of labdane diterpene from *Alomia myriadenia* (Asteraceae): immunosuppression via induction of apoptosis in monocytes. *International Immunopharmacology*, vol. 3, p. 383–392, 2003 C.

SOWINSKI, S. et al. Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nat Cell Biol.*, vol. 10: p. 211–219, 2008.

SPENCER, J. P. E.; KUHNLE, G. G.; WILLIANS, R. J. Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. *Biochem. J.*, v. 372, p. 173-181, 2003.

STUVER, S. O. N.; TACHIBANA, A.; OKAYAMA, S.; SHIOIRI, Y.; TSUNETOSHI, K.; TSUDA, AND MUELLER, N. E. Heterosexual transmission of human T cell leukemia/lymphoma virus type 1 among married couples in southwestern Japan: an initial report from the Miyazaki cohort study. *Journal of Infectious Diseases*, vol. 167, p. 57-65, 1993.

SUN, S. C.; YAMAOKA, S. Activation of NF- κ B by HTLV-I and implications for cell transformation. *Oncogene*, vol 24, p. 5952-5964, 2005.

SUN, X.F.; ZHANG, H. NF κ B and NF κ BI polymorphisms in relation to susceptibility of tumour and other diseases. *Histol. Histopathol.* Vol. 22, p. 1387-1398, 2007.

TAKATSUKI, K.; YAMAGUCHI, K.; WATANABE, T. Adult T-cell leukemia and HTLV-I related diseases. IN: TAKATSUKI, K.; HINUMA, Y.; YOSHIDA, M. *Advances in adult T-cell leukemia and HTLV-I research*. Tokyo, Japanese Scientific Societies Press, p. 1-15, 1992.

TAKATSUKI, M.; YAMAGUCHI, K.; KAWANO, F.; HATTORI, T.; NISHIMURA, H.; TSUDA, H AND SANADA, I.; NAKADA, K.; ITAI, Y. Clinical diversity in adult T-cell leukemia-lymphoma. *Cancer Research*, vol. 45, p. 4644-4645, 1985.

TAKATSUKI, M.; UCHIYAMA, T.; SAGAWA, K. AND YODOI, J. Adult T-cell leukemia in Japan. In SENO, S.; TAKAKU, F.; IRINO, S. (eds): *Topics in Hematology*. Amsterdam, Excerpta Medical: p. 73-77, 1977.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors and pathogen resistance. *Cell Microbiol*, v. 5, p. 143-53, 2003.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. *Ann. Rev. Immunol.*, vol. 21, p. 335-376, 2003.

TAKEZAKI, T.; TAJIMA, K.; ITO, M.; ITO, S.; KINOSHITA, K.; TACHIBANA, K.; MATASUSHITA, Y. Short-term breast-feeding may reduce the risk of vertical transmission of HTLV-I. The Tsushima ATL Study group. *Leukemia* 11 (Suppl. 3), p. 60-62, 1997.

TAMURA, T. et al. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol.* Vol. 26: p. 535–584, 2008.

TANIGUCHI, A.; TAKENAKA, Y. et al. Adult T cell leukemia presenting with proliferative synovitis. *Arthritis & Rheumatism.*, vol. 31, p. 1076-1077, 1988.

TAYLOR, G. P. The epidemiology of HTLV-I in Europe. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*, vol. 13 (Sup. 1), p. 8-14, 1996.

TAYLOR, G. P.; GOON, P.; FURUKAWA, Y.; GREEN, H.; BARFIELD, A.; MOSLEY, A.; NOSE, H.; BABIKER, A.; RUDGE, P.; USUKU, K.; OSAME, M.; BANGHAM, C. R. M.; WEBER, J. N. Zidovudine plus lamivudine in Human T-Lymphotropic Virus type-I-associated myelopathy: a randomized trial. *Retrovirology*, vol. 3: p. 63, 2006.

TAYLOR, G. P.; MATSUOKA, M. Natural history of adult T-cell leukemia/lymphoma and approaches to therapy. *Oncogene*, vol. 5; 24 (39), p. 6047-6057, 2005.

TAYLOR, G. P. Pathogenesis and treatment of HTLV-I associated myelopathy. *Sexually Transmitted Infections*, vol.74, p. 316-322, 1998.

TIWARI, A. K. Imbalance in antioxidant defenses and human diseases: multiple approach of natural antioxidants therapy. *Current Science*, vol. 81, 1179-1187, 2001.

TOBINAI, K.; HOTTA T. Clinical trials for malignant lymphoma in Japan. *Jpn J Clin Oncol.*, vol. 34 (7), p. 369-378, 2004.

TRIBOLO, S.; LODI, F.; CONNOR, C.; SURI, S.; WILSON, V. G.; TAYLOR M. A.; NEEDS, P. W.; KROON, P. A.; HUGHES, D. A. Comparative effects of quercetin and its predominant human metabolites on adhesion molecule expression in activated human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*, vol. 197 (1), p. 50-56, 2007.

TRUBIANI, O.; CIANCARELLI, M.; RAPINO, M.; DI-PRIMIO, R. Dimethyl sulfoxide induces programmed cell death and reversible G1 arrest in the cell cycle of human lymphoid pre-T cell line. *Immunol Lett.* Vol. 50: p. 51-57, 1996.

TSUKASAKI, K.; UTSUNOMIYA, A.; FUKUDA, H.; SHIBATA, T.; FUKUSHIMA, T.; TAKATSUKA, Y.; IKEDA, S.; MASUDA, M.; NAGOSHI, H.; UEDA, R.; TAMURA, K.; SANO, M.; MOMITA, S.; YAMAGUCHI, K.; KAWANO, F.; HANADA, S.; TOBINAI, K.; SHIMOYAMA, M.; HOTTA, T.; & TOMONAGA, M. VCAP-AMP-VECP compared with biweekly CHOP for adult T-cell leukemia-lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study. *J. Clin. Oncol.* Vol. 25, p. 5458-5464, 2007.

UCHIYAMA, T.; YODOI, J.; SAGAWA, K.; TAKATSUKI, K.; UCHINO, H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood*, vol. 50, p. 481-492, 1977.

ULUKAYA, E.; COLAKOGULLARI, M.; WOOD, E. J. Interference by anti-cancer chemotherapeutic agents in the MTT-tumor chemosensitivity assay. *Chemotherapy*, vol 50, p. 43-50, 2004.

UMEHARA, F.; IZUMO, S.; RONQUILLO, A.T.; MATSUMURO, K.; OSAME, M. Cytokine expression in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, vol. 53, p. 72-77, 1994.

UMEHARA, F.; IZUMO, S.; RONQUILLO, A. T.; MATSUMURO, K.; OSAME, M. Cytokine expression in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, vol. 53, p. 72-77, 1994.

UMEHARA, F.; IZUMO, S.; NAKAGAWA, M.; RONQUILLO, A. T.; TAKAHASHI, K.; MATSUMURO, K.; SATO, E.; OSAME, M. Immunocytochemical analysis of the cellular infiltrate in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. Vol. 52: p. 424-430, 1993.

VAN-PROOYEN, N.; GOLD, H.; ANDRESEN, V.; SCHWARTZ, O.; JONES, K.; RUSCETTI, F.; LOCKETT, S.; GUDLA, P.; VENZON, D.; FRANCHINI, G. Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, p. 20738–20743, 2010.

VEIROS, I.; MARTINS, L.; MARTINS, F. Intrathecal baclofen in treatment of spasticity casuistry of the Centro Hospitalar de Coimbra. *Acta Med Port.*, vol. 19 (3), p. 217-224, 2006.

VENDEL, A. C.; MCBRYANT, S. J.; LUMB, K. J. KIX-mediated assembly of the CBP-CREB-HTLV-1 tax coactivator-activator complex. *Biochemistry*, vol. 42, p. 12481–12487, 2003.

VERDONCK, K.; GONZÁLEZ, E.; VAN-DOOREN, S.; VANDAMME, A. M.; VANHAM, G.; GOTUZZO, E. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *Lancet infectious diseases*, vol. 7(4), p. 266-281, 2007.

VERNANT, J. C. ; BUISSON, G. ; MAGDELEINE, J. ; DE THORE, J.; JOUANNELLE, A.; NEISSON-VERNANT, C.; MONPLAISIR, N. T-lymphocyte alveolitis, tropical spastic paresis, and Sjögren syndrome. *Lancet*, vol. 1, p. 177, 1988.

VONDRÁČEK, J.; SOUCEK, K.; SHEARD, M. A.; CHRAMOSTOVÁ, K.; ANDRYSÍK, Z.; HOFMANOVÁ, J.; KOZUBÍK, A. Dimethyl sulfoxide potentiates death receptor-mediated apoptosis in the human myeloid leukemia U937 cell line through enhancement of mitochondrial membrane depolarization. *Leuk. Res.*, v.30, p.81–89, 2006.

WAGNER, K. H.; and ELMADFA, I. Biological relevance of terpenoids. Overview focusing on mono-, di-, and tetraterpenes. *Ann. Nutr. Metab.*, vol. 47, p. 95-106, 2003.

WAKITA, J.; KOMATSU, K.; NAKAHARA, A.; MATSUYAMA, T.; AND MATSUSHITA, M. Experimental Investigation on the Validity of Population Dynamics Approach to Bacterial Colony Formation. *Journal of the Physical Society of Japan*. Vol. 63: p. 1205-1211, 1993.

WALDMANN, T. A.; GOLDMAN, C. K.; BONGIOVANNI, K. F.; SHARROW, S. O.; DAVEY, M. P.; CEASE, K. B.; GREENBERG, S. J.; & LONGO, D. L. (1988) *Blood* 72: 1805–1816. IN: TAYLOR, G. P., MATSUOKA, M. Natural history of adult T-cell leukemia/lymphoma and approaches to therapy. *Oncogene*, vol. 5; 24 (39), p. 6047-6057, 2005.

WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *J Ethnopharmacol*. Vol. 51: p. 239-54, 1996.

WANG, H. K.; XIA, Y.; YANG, Z. Y.; JIANG, S. Recent advances in the discovery and development of flavonoids and their analogues as antitumor and anti- HIV agents. *Flavonoids in the Living System*. Manthey and Buslig Plenum Press, 1998.

WANG, L.; LUO, J.; FAN, Q.; SUZUKI, M.; SUZUKI, I. S.; ENGELHARD, M. H.; LIN, Y.; KIM, N.; XIE, J. L.; YAMAMOTO, B.; HAUDI, A.; SEMMES, O.J.; GREEN, P.L. PDZ binding motif of HTLV-1 Tax promotes virus-mediated T-cell proliferation in vitro and persistence in vivo. *Blood*, vol. 107, p. 1980–1988, 2006.

WANG, H.; MACHESKY, N. J.; MANSKY, L. M. Both the PPPY and PTAP motifs are involved in human T-cell leukemia virus type 1 particle release. *J. Virol*. Vol. 78: p. 1503-1512, 2004.

WATERS, A.; OLIVEIRA, A. L.; COUGHLAN, S.; DE-VEVECIA, C.; SCHOR, D.; LEITE, A. C.; ARAÚJO, A. Q.; HALL, W. W. Multiplex real-time PCR for the detection and quantitation of HTLV-1 and HTLV-2 proviral load: addressing the issue of indeterminate HTLV results. *J Clin Virol.*, vol. 52 (1): p. 38-44, 2011.

WATKINS, S. C.; SALTER, R. D. Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubes. *Immunity.*, vol. 23: p. 309–318, 2005.

WOLFE, N. D.; HENEINE, W.; CARR, J. K.; GARCIA, A. D.; SHANMUGAM, V.; TAMOUFE, U.; TORIMIRO, J. N.; PROSSER, A. T.; LEBRETON, M.; MPOUDI-NGOLE, E.; MCCUTCHAN, F. E.; BIRX, D. L.; FOLKS, T. M.; BURKE, D. S.; SWITZER, W. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proceedings of the National Academy Sciences*, vol. 102 (22), p. 7994-7999, 2005.

WONG, M. L., MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantification. *Biotechniques*, vol. 39, 2005.

YAMADA, Y.; TOMONAGA, M. The current status of therapy for adult T-cell leukaemia-lymphoma in Japan. *Leuk Lymphoma*, vol 44 (4), p. 611-618, 2003.

YAMAGUCHI, K.; KIYOKAWA, T.; FUTAMI, G.; ISHII, T.; AND TAKATSUKI, K. *Human Retrovirology HTLV Blattner WA* (ed). Raven Press: New York, p. 163-171, 1990.

YAMAGUCHI, K.; TAKATSUKI, K. Adult T cell leukemia-lymphoma. *Baillieres Clinical Haematology*, vol. 6 (4), p. 899-915, 1993.

YANG, C. S.; LANDAU, J. M.; HUANG, M. T.; NEWMARK, H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, vol. 21, p. 381-406, 2001.

YASUNAGA, J.; MATSUOKA, M. Molecular mechanisms of HTLV-1 infection and pathogenesis. *Int J Hematol*, vol. 94 (5), p. 435-42, 2011.

YELENA, L.; POBEZINSKAYA, Y.; YOU-SUN, K.; SWATI, C.; MICHAEL, J.; MORGAN, T. L.; CHENGYU, L.; AND ZHENGANG, L. The function of TRADD in signaling via tumor necrosis factor receptor 1 and TRIF-dependent Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* Vol. 9 (9): p.1047–1054, 2008.

YI, L.; YUAN, K.; QU, X. et al. Small molecules blocking the entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus into host cells. *J. Virol.*, v.78, p. 11334-11339, 2004.

YIN, W.; HASUNUMA, T.; KOBATA, T.; SUMIDA, T.; NISHIOKA, K. Synovial hyperplasia in HTLV-I associated arthropathy is induced by tumor necrosis factor-alpha produced by HTLV-I infected CD68+ cells. *J Rheumatol*, vol. 27, p. 874-881, 2000.

YONEYAMA, M.; KIKUCHI, M.; MATSUMOTO, K.; IMAIZUMI, T.; MIYAGISHI, M.; TAIRA, K.; FOY, E.; LOO, Y. M.; GALE, M. JR.; AKIRA, S. et al. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J. Immunol.*, v. 175, 2005.

YOSHIDA, M. Discovery of HTLV-1, the first human retrovirus, its unique regulatory mechanisms, and insights into pathogenesis. *Oncogene*, vol. 24, p. 5931–5937, 2005.

YOSHIDA, M. Multiple Viral Strategies of HTLV-1 for Dysregulation of Cell Growth Control. *Annual Review Immunology*, vol. 19, p. 475-496, 2001.

YOSHIDA, M.; SEIKE, M.; YAMAGUCHI, K.; AND TAKATSUKI, K. Monoclonal Integration of Human T-Cell Leukemia Provirus in All Primary Tumors of Adult T-Cell Leukemia Suggests Causative Role of Human T-Cell Leukemia Virus in the Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America*, 81: 2534-2537, 1984.

YUAN, B.; LI, X.; GOFF, S. P. Mutations altering the moloney murine leukemia virus p12 Gag protein affect virion production and early events of the virus life cycle. *Embo J.* Vol. 18: p. 4700-4710, 1999.

ZANI, C. L.; ALVES, T. M. A.; QUEIROZ, R.; FONTES, E. S.; SHIN, Y. G.; CORDELL, G. A. A cytotoxic diterpene from *Alomia myriadenia*. *Phytochemistry*, vol. 53 (8), p. 877-880, 2000.

ZHANG, Z.; ZHANG, M.; GOLDMAN, C. K.; RAVETCH, J. V.; & WALDMANN, T. A. (2003) *Cancer Res.* 63: 6453-6457. IN: TAYLOR, G. P., MATSUOKA, M. Natural history of adult T-cell leukemia/lymphoma and approaches to therapy. *Oncogene*, vol. 5; 24 (39), p. 6047-6057, 2005.

ZHAO, G.; VASZAR, L. T.; QIU, D.; SHI, L.; KAO, O. N. Anti-inflammatory effects of triptolide in human bronchial epithelial cells. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, vol. 279, p. 958-966, 2000.

ZHAO, L.; AND GIAM, C. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) transcriptional activator, Tax, enhances CREB binding to HTLV-I 21-base-pair repeats by protein-protein interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America*, vol. 89, p. 7070-7074, 1992.

Anexos

ANEXO 1- CONSENTIMENTO PARA PESQUISA LIVRE E ESCLARECIDO

A pesquisa intitulada “Potencial anti-viral do composto terpênico Miriadenolídeo para o retrovírus HTLV-1”, em doadores de sangue da Fundação Hemominas e pacientes do Hospital Sarah Kubstchek, pretende estudar aspectos clínicos e laboratoriais destes pacientes. Os objetivos do presente projeto são:

- 1 – Esclarecer os riscos para a infecção e estudar a transmissão desse vírus entre familiares;
- 2 – Verificar se existem problemas de saúde que possam estar relacionados com a presença dele;
- 3 – Estudar o vírus e sua forma de relacionar com a pessoa infectada para esclarecer como ele causaria estas alterações.

Embora o HTLV-I/II não seja um vírus novo, sua descoberta é recente e muitos aspectos precisam ser esclarecidos. Sabe-se que ele pode ser transmitido através de relações sexuais, agulhas e sangue contaminado e aleitamento materno.

Procedimentos: Sua participação neste estudo terá as seguintes etapas:

1 – Entrevista individual em consultório para investigação da presença de fatores de risco para a infecção pelo HTLV-I/II.

2 – Exame clínico para avaliação do seu estado de saúde, com possibilidade de encaminhamento para especialistas se o médico achar necessário.

3 – Coleta de sangue da veia para exames laboratoriais (hemograma, pesquisa de linfócitos atípicos, imunofenotipagem, PCR e outros testes específicos para estudo do vírus); amostras serão guardadas para o caso de haver necessidade de repetição desses exames. A picada da veia para a coleta de sangue causa leve dor local, podendo raramente haver inchaço; às vezes, ocorre um pequeno sangramento.

4 – Exames laboratoriais (sangue, fezes e urina), se indicado pelo médico.

Os resultados deste estudo serão mantidos sigilosos, podendo ser informados somente ao participante e só serão publicados em conjunto, não permitindo a identificação individual. O participante da pesquisa ou seu responsável legal tem garantia de quaisquer esclarecimentos, pelos pesquisadores responsáveis, antes e durante o curso da pesquisa.

Eu consinto na minha participação na pesquisa descrita acima. Tenho liberdade de retirar o meu consentimento em qualquer fase da pesquisa, caso não queira continuar participando da mesma.

Assinatura _____ Data: ____/____/____

Representante legal: _____

Nome do participante: _____

Idade: _____ DN: _____ Estado Civil: _____

N.º Prontuário: _____ N.º Pesquisa: _____

Naturalidade: _____ Procedência: _____

Escolaridade: _____ Profissão: _____

Endereço Residencial:

Rua: _____ N.º _____

Bairro: _____ Cidade: _____

Telefone: _____

Endereço/Telefone Profissional: _____

Pesquisador

Para contato com o pesquisador:

Edel Figueiredo Barbosa Stancioli - coordenadora - Telefone - 3409-2753

Camila Pacheco Silveira Martins- Telefone - 3409-2736

Comitê de ética em pesquisa - COEP - Unidade Administrativa II - 2º andar - sala 2005 Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha. Fone: 3499-4592.

ANEXO 2 – Aprovação pelo comitê de ética da UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 45/08

Interessado(a): Profa. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli
Departamento de Microbiologia
ICB - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 2 de abril de 2008, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação da atividade antiviral, imunomodulatória e antioxidante dos compostos polifenólicos quercetina e Kaempferol em cultura de PBMC de pacientes infectados pelo HTLV-1**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO 3 – Aprovação pelo comitê de ética da Fundação HEMOMINAS