



**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Avaliação da atividade antiviral e  
imunomodulatória dos compostos  
polifenólicos quercetina e kaempferol no  
contexto da infecção pelo HTLV-1**

**Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis**

**Edel Figueiredo Barbosa Stancioli**

**2010**



Wassily Kandinsky. *Black Strokes I*. 1913

**Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis**

**Avaliação da atividade antiviral e imunomodulatória dos  
compostos polifenólicos quercetina e kaempferol no  
contexto da infecção pelo HTLV-1**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em  
Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito  
para a obtenção do título de doutor.

Orientadora: Edel Figueiredo Barbosa Stancioli  
Universidade Federal de Minas Gerais

**Belo Horizonte**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**2010**

*Àos três homens da minha vida:*

*A você meu maravilhoso Papai, Liderci, que me ensinou a ser quem eu sou e me nutriu com seu amor e carinho;*

*A você meu querido irmão Hudson, exemplo de força e dedicação a família e ao trabalho;*

*And at last but never at least, to my sweetheart Ricardo, Who encouraged me and walked by my side through this rough but beautiful path of science.*



*“All I ever wanted,  
all I ever needed  
is here in my arms,  
words are very unnecessary...”*

*Enjoy the silence*

*by Depeche Mode*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente a minha orientadora, Edel Stancioli, a oportunidade de realizar este trabalho que me deu tantos ensinamentos e alegrias. Agradeço também a oportunidade de conviver com a Edel, que também tanto me ensinou com seu exemplo de pesquisadora apaixonada e compromissada com a pesquisa séria e de excelência. Agradeço a minha família, meu marido, meus pais Liderci e Marilda, meu irmão Hudson, minha sogra Wilma, minhas queridas avós, tios, tias, primos e primas que tanto me incentivaram neste caminho. Em especial, agradeço meu marido, Ricardo, que sempre me apoiou em tudo para que mais esta etapa fosse finalizada na minha vida. Agradeço aos meus amigos, Priscila, Júnior, Gustavo, Joyce, Ana Paula, Ana Cristina, Fred e Ivana, Luana, Renata, Ana Paula W., Lidiane, aos amigos do antigo Ladoc de quem eu sinto tanta falta e a todos os amigos do Labmic de quem também sentirei muita falta. Gostaria de agradecer o auxílio e amizade de todos, em especial ao Adriano, Marina, Luciana, Camila e Jaqueline que me auxiliaram mais diretamente neste trabalho. Gostaria de agradecer ao Olindo o incentivo de sempre, mesmo a distância, agradeço seu constante carinho e atenção. Também agradeço ao Olindo pelo imenso pontapé inicial na minha carreira de pesquisa. Agradeço a todos do GIPH, em especial a Anna Bárbara e a Marina que sempre trabalham tanto pelo nosso grupo. Gostaria de agradecer ao Orlando e ao Dener por despenderem tanto tempo me auxiliando com AFM, minha gratidão e admiração são eternas. Gostaria de agradecer a Elaine Fagundes que sempre esteve tão solícita em me auxiliar nos experimentos e interpretações dos dados e também a Márcia Rogéria que possibilitou a realização de todo este trabalho. Agradeço a todos os professores e funcionários do Departamento de Microbiologia que de uma forma ou de outra me inspiraram com seu exemplo e dedicação. Agradeço as agências de fomento que permitiram minha dedicação em tempo integral a este trabalho. Também agradeço aos meus alunos que me permitem “descançar” da rotina do laboratório e me fazem ver o mundo com outros olhos.

E finalmente, agradeço a Deus e aos amigos invisíveis, sempre presentes, que me auxiliaram durante a intensa jornada deste doutoramento.

Esta tese de doutorado é parte integrante da pesquisa desenvolvida pelo Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em HTLV-1/2 (GIPH), sediado na Fundação HEMOMINAS.

Agradecimento aos colaboradores diretos e indiretos deste trabalho:

Dra. Márcia Rogéria de Almeida - UFV

Dra. Elaine Maria Souza Fagundes - UFMG

Dr. Orlando Abreu Gomes - FUMEC

Dr. Olindo Assis Martins Filho - IRR

Dra. Andréa Teixeira Carvalho - IRR

Dra. Marina Lobato Martins- HEMOMINAS

À Pós-Graduação em Microbiologia

Ao Laboratório de Biologia de Microrganismos Intracelulares

Ao Laboratório de Virus

Ao Laboratório de Virologia Comparada

À Fundação HEMOMINAS e ao GIPH

Ao CETEC e ao Laboratório de Nanoscopia

Ao Instituto René Rachou

Às Agências Financiadoras: Fapemig – Projeto aprovado Edital Universal 2008

## RESUMO

A citotoxicidade e a atividade antiviral de quercetina e kaempherol em células infectadas pelo HTLV-1 (MT-2) foi avaliada. Os resultados indicaram citotoxicidade das drogas para estas células, quando foram comparadas com células THP-1 e PBMC não infectadas. A análise do potencial antiviral das drogas mostrou que a acumulação de mRNA virais, em especial mRNA de *gag-pol* e a reatividade de proteínas Gag e Env foi inibida na presença de quercetina e kaempherol. Imagens de Microscopia de Força Atômica da superfície de MT-2 revelaram brotamento viral abundante, bem como partículas virais livres na superfície das células. A evidência de brotamento viral, no entanto, foi abolida na presença de quercetina e kaempherol e poros foram observados, indicando morte celular. Estes dados indicam que células MT-2 apresentam morte celular e bloqueio no ciclo de multiplicação viral na presença das drogas, o que permite hipotetizar que a indução de apoptose celular possa ser um mecanismo pelo qual, altas concentrações dos compostos exercem o seu efeito. A atividade imunomodulatória de quercetina foi igualmente avaliada, demonstrando que esta droga tem grande potencial em modular as respostas Th1 e Th2 através da inibição de IFN- $\gamma$ , TNF e IL-10 e indução de IL-4. E finalmente, a proliferação celular de PBMC de indivíduos infectados e não infectados pelo HTLV-1 foi avaliada na presença de quercetina (100  $\mu$ M), que indicou o potencial desta droga em inibir a proliferação de PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Portanto, os dados aqui apresentados fortemente sugerem a utilização de quercetina e kaempherol em estudos objetivando novas abordagens terapêuticas no contexto da infecção pelo HTLV-1.

Palavras-chave: HTLV-1, MT-2, quercetina, kaempherol, atividade antiviral e imunomodulatória.

## ABSTRACT

In this study, the cytotoxicity and antiviral effect of quercetin and kaempferol was evaluated on a HTLV-1 positive cell line (MT-2). The results indicated a specific cytotoxicity of drugs on MT-2 when compared to THP-1 and PBMC cells. The antiviral activity of drugs was verified by the evaluation of *env* and *tax* transcription and viral protein expression assessed by western assay. The data revealed that quercetin and kaempferol were able to inhibit *gag-pol* mRNA levels in different magnitudes. The drugs also were shown to inhibit Gag and Env protein expression in a dose-dependent manner. Atomic Force Microscopy images of MT-2 cell surface demonstrated evidence of profuse viral budding as well as cell-free particles of HTLV-1. The evidence of profuse viral budding is abolished in the presence of quercetin and kaempferol. Instead, enormous pores were found on cell membrane indicating cell death. This data demonstrate and confirm that MT-2 cells present cell death and impairment of viral multiplicity in the presence of in high concentrations of quercetin and kaempferol and we hypothesize that induction of apoptosis could be a mechanism by which they exert those effects. The immunomodulatory effect of quercetin was also evaluated showing that this drug is potent as a modulator of Th1 and Th2 responses by inhibiting IFN- $\gamma$ , TNF and IL-10 and inducing IL-4 expression. At last, the PHA-proliferation of PBMC from HTLV-1-infected and uninfected persons was assessed after treatment with quercetin (100  $\mu$ M), demonstrating that this drug could be useful in the impairment of virus spread by cell proliferation on HTLV-1-infected persons. By and large, our data suggest that quercetin is a potential immunomodulatory compound which enables its use for future studies that focus on finding treatment approaches for HTLV-1-related diseases.

Key words: HTLV-1, MT-2 quercetin, kaempferol, antiviral and immunomodulatory activity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tomografia eletrônica de célula infectadas pelo HTLV-1 em contato com células não infectadas.....	16
Figura 2 – Representação esquemática da estrutura do HTLV-1.....	17
Figura 3 – Representação esquemática do genoma do HTLV-1. ....	19
Figura 4 – Representação esquemática do promotor do LTR do HTLV-1. ....	21
Figura 5 – Representação esquemática do ciclo de multiplicação de um retrovírus em uma célula dendrítica. ....	24
Figura 6 – Representação esquemática das manifestações clínicas associadas a infecção pelo HTLV-1. ....	34
Figura 7 – Representação esquemática dos mecanismos (1 e 2) que levam ao desenvolvimento de HAM/TSP. ....	38
Figura 8– Representação esquemática do princípio de atuação de terapia imunomodulatória e antiviral no contexto de HAM/TSP.....	47
Figura 9 – Estrutura química do kaempferol e da quercetina. ....	52
Figura 10 – Representação esquemática de um processo isquêmico representando o dano neuronal no nível celular e a atuação de quercetina para converter este processo. ....	57
Figura 11 – Estratégia Metodológica. ....	67
Figura 12 – Representação esquemática dos tipos celulares utilizados neste estudo. ....	70
Figura 13 – Fluxograma dos indivíduos avaliados pelo ensaio de proliferação celular, não infectados e infectados pelo HTLV-1. ....	72



Figura 14 – Estratégia de formação de imagem por microscopia de força atômica.....	82
Figura 15 – Estratégia de aquisição e análise da fluorescência obtida para cada amostra de sobrenadante de PBMC por <i>Cytometric Bead Array</i> . .....	85
Figura 16 – Viabilidade celular de PBMC, THP-1 e MT-2 após tratamento por 24 horas com quercetina (A) e kaempherol (B) nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 $\mu$ M.....	90
Figura 17 – Viabilidade de PBMC (A), THP-1 (B) e MT-2 (C) em valores percentuais obtidos pelo ensaio de azul de trypan em tabelas .....	92
Figura 18 – Viabilidade média das células avaliadas na presença de quercetina (acima) e kaempherol (abaixo) em gráficos de barra (A) e as médias das viabilidades de cada tipo celular em gráficos de box plot (B).....	93
Figura 19 – Acumulação de mRNA de gag-pol em MT-2 após tratamento por 24 horas com diferentes concentrações de quercetina e kaempherol por PCR em Tempo Real. ....	96
Figura 20 – Acumulação de mRNA de tax-rex em MT-2 após tratamento por 24 horas com diferentes concentrações de quercetina e kaempherol por PCR em Tempo Real.....	97
Figura 21 – Correlação entre acumulação de gag-pol e tax-rex em MT-2 após tratamento por 24 horas com quercetina e kaempherol. ....	98
Figura 22 – Membranas de nitrocelulose do western blot. ....	100
Figura 23 – Reatividade a proteínas de MT-2 após incubação por 24 horas com diferentes concentrações de quercetina e kaempherol. ....	102
Figura 24 – Avaliação da expressão de proteínas Gag avaliada por western blot em	

relação à acumulação de mRNA de <i>gag-pol</i> obtida por PCR em Tempo Real. ....	109
Figura 25 – Correlação entre a reatividade relativa das proteínas 28 KDa, 24 KDa, 21 KDa, 19 KDa e 15 KDa avaliadas por Western Blot e a acumulação de mRNA para <i>gag-pol</i> avaliada por PCR em Tempo Real.....	105
Figura 26 – Célula MT-2 rastreada com sonda de cantilever de maior comprimento por Microscopia de Força Atômica. ....	107
Figura 27 – Superfície de THP-1 (A), U937 (B) e MT-2 (C) rastreadas por AFM em aumento aproximado de 7.500 vezes. ....	108
Figura 28 – Superfície de MT-2 rastreada por AFM em aumentos distintos.....	109
Figura 29 – Superfície de MT-2 rastreada por AFM e gráfico de radar demonstrando as faixas de tamanho do diâmetro das estruturas observadas.....	111
Figura 30 – Estruturas semelhantes a partículas virais do HTLV-1 livres na superfície de MT-2 em aumentos sucessivos e crescentes.....	112
Figura 31 – Análise topográfica de imagem de MT-2 rastreada por AFM para a mensuração do tamanho das partículas virais presentes da superfície da célula. ....	113
Figura 32 – MT-2 tratada com quercetina e kaempherol e não tratada com drogas (controle) e rastreada por AFM em aumentos sucessivos.....	115
Figura 33 – Avaliação do impacto de quercetina e kaempherol no tamanho (A) e número (B) de estruturas semelhantes ao HTLV-1 na superfície de MT-2 rastreada por AFM. ....	116
Figura 34 – Rastreamento dos poros observados em células MT-2 após tratamento com quercetina e kaempherol à 100 $\mu$ M por 24 horas, por AFM em aumentos sucessivos crescentes. ....	128
Figura 35 – Viabilidade de células MT-2 e PBMC de pacientes saudáveis soronegativos medida pelo método de exclusão de Trypan Blue. ....	118

Figura 36 – Acumulação de mRNA de IFN- $\gamma$ , obtida por PCR convencional, em células THP-1 após estimulação por 4 horas com PMA e posterior incubação com diferentes concentrações de quercetina por 24 horas. ....	121
Figura 37 – Avaliação de citocinas por avaliadas por <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA), em sobrenadante de PBMC estimulado com quercetina e RecTax. ....	124
Figura 38 - Correlação de Spearman entre as citocinas TNF e IFN- $\gamma$ (A), IL-4 (B), IL-10 (C), IFN- $\gamma$ e IL-4 (D), IL-10 (E) e IL-10 e IL-4 (F). ....	126
Figura 39 - Correlação de Spearman entre as citocinas TNF e IFN- $\gamma$ e a razão IL-4/IL-10. B: Razão entre a expressão de IFN- $\gamma$ e TNF em relação à expressão de IL-4 nas amostras controle (primeira barra), estimuladas com RecTax (segunda e quarta barra) e estimuladas com quercetina (terceira e quarta barra). ....	128
Figura 40 – Impacto de quercetina na proliferação de PBMC de indivíduos soronegativos saudáveis, indivíduos assintomáticos, pacientes portadores de HAM/TSP e indivíduos soropositivos.....	131
Figura 41 – Proliferação celular de PBMC, avaliada pelo ensaio de MTT, de indivíduos soronegativos saudáveis, indivíduos assintomáticos, pacientes portadores de HAM/TSP e indivíduos soropositivos.....	132
Figura 42 – Inibição da proliferação celular de PBMC, avaliada pelo ensaio de MTT, de indivíduos assintomáticos, pacientes portadores de HAM/TSP e indivíduos soropositivos. ....	134
Figura 43 – Viabilidade celular de PBMC, avaliada pelo ensaio de MTT, de indivíduos soronegativos saudáveis, indivíduos assintomáticos, pacientes portadores de HAM/TSP e indivíduos soropositivos. ....	135
Figura 44 – Representação esquemática de hipóteses para explicar a morte celular verificada pelo ensaio de viabilidade e por Microscopia de Força Atômica. ....	141

Figura 45 – Representação esquemática de hipóteses para explicar a atividade antiviral de kaempferol no ciclo de multiplicação do HTLV-1.. .....	147
Figura 46 – Representação esquemática de hipóteses para explicar a atividade imunomodulatória de quercetina, após indução com estímulo inespecífico (PMA) ou específico (proteína Tax recombinante – RecTax).....	153
Figura 47 – Interatoma de Tax e RecTax com proteínas de vias de sinalização celular. O retângulo pontilhado representa a região representativa de RecTax constituída da sequência de aminoácidos das posições 240 a 350.....	157
Figura 48 – Representação esquemática de hipótese para explicar a atividade anti-proliferativa de quercetina em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1. ....	159

#### LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Percentual da viabilidade de PBMC soronegativos controle na presença de RecTax e quercetina por 24 horas avaliada por Azul de Trypan. ....	123
---	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ANVISA** – Agência de Vigilância Sanitária  
**ATL** – *Adult T cell Leukemia*  
**CBP** - CREB binding Protein  
**CD** – *Cluster of Differentiation*  
**COEP** – Comitê de Ética em Pesquisa  
**CREB** - *cyclic AMP-responsive element-binding protein*  
**ELISA** – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*  
**GIPH** – Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em HTLV-1/2  
**Gp** – Glicoproteína  
**HAM/TSP** – *HTLV-1 Associated Mielopathy / Tropical Spastic Paraparesis*  
**HDAC** - Histona desacetilase  
**HIV** – *Human Immunodeficiency Virus*  
**HLA-A2** – Antígeno Leucocitário Humano –A2  
**hnRNP-A1** – Ribonucleoproteína A1  
**HTLV** – *Human T-lymphotropic virus*  
**HSPG** - Proteoglicanas de heparan sulfato  
**IFN** - Interferon  
**IgE** – Imunoglobulina E  
**IgG** – Imunoglobulina G  
**IgG1** - Imunoglobulina G da subclasse 1  
**IgG3** - Imunoglobulina G da subclasse 3  
**IgM** – Imunoglobulina M  
**IL** – Interleucina  
**LDH** – Desidrogenase Láctica  
**LFA-3** – Antígeno associado a função leucocitária -3  
**LTR** – Terminação Longa Repetida  
**MHC** – Complexo de histocompatibilidade Principal

**MT-2** – Linhagem celular (CD4<sup>+</sup>) permanentemente infectada pelo HTLV-1  
**NF-κB** – *Nuclear Factor -κB*  
**PBMC** – *Peripheral Blood Mononuclear Cells*  
**PBS** – Tampão Fosfato salínico  
**PCR** – *Polimerase Chain Reaction*  
**RDC** – Resolução da Diretoria Colegiada  
**SDS** – *Sodium dodecyl sulfate* (Dodecil Sulfato de Sódio)  
**SDS-PAGE** – *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*  
**SFB** – Soro Fetal Bovino  
**SNC** – Sistema Nervoso Central  
**TCR** – Receptor de células T  
**TLR-4** – Toll like receptor -4  
**TNF** – *Tumoral Necrosis Factor*  
**TRE** – *Tax Responsive Elements*  
**USA** – *United States of America*  
**WB** – Ensaio de Western Blot

---

# Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	15
1.1 VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS – CARACTERÍSTICAS E ESTRUTURA	15
1.2 INTERAÇÃO DO VÍRUS HTLV E HOSPEDEIRO: MULTIPLICAÇÃO E DISSEMINAÇÃO	23
1.3 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO HTLV	30
1.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS ASSOCIADAS À INFECÇÃO PELO HTLV-1	33
1.5 IMUNOLOGIA NO CONTEXTO DA INFECÇÃO PELO HTLV-1	36
1.6 DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HTLV	42
1.7 TRATAMENTO NO ÂMBITO DA INFECÇÃO PELO HTLV-1	45
1.8 ESTUDO DE DROGAS ANTIVIRAIS NA INFECÇÃO PELO HTLV-1	46
1.9 COMPOSTOS POLIFENÓLICOS: QUERCETINA E KAEMPHEROL	51
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	60
<b>3 OBJETIVOS</b>	64
3.1 OBJETIVO GERAL	64
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	64
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	67
4.1 ESTRATÉGIA METODOLÓGICA	67
4.2 REAGENTES	68
4.3 TIPOS CELULARES	70
4.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR - ENSAIO DE TRYPAN BLUE	74
4.6 AVALIAÇÃO DE MRNAs VIRAIS E HUMANOS	74
4.7 ENSAIO DE WESTERN PARA A AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS VIRAIS NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE QUERCETINA E KAEMPHEROL	79
4.8 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	80
4.9 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TNF, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5 E IL-10	83
4.10 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	86
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	87
<b>5 RESULTADOS</b>	90
5.1 VIABILIDADE DE PBMC, CÉLULAS MT-2 E CÉLULAS THP-1 NA PRESENÇA DOS COMPOSTOS POLIFENÓLICOS QUERCETINA E KAEMPHEROL	90
5.2 EFEITO DE QUERCETINA E KAEMPHEROL NA ACUMULAÇÃO DE MRNAs VIRAIS EM CÉLULAS MT-2	95
5.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS VIRAIS EM CÉLULAS MT-2 APÓS INCUBAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE QUERCETINA E KAEMPHEROL	99
5.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL TOPOGRÁFICO DE CÉLULAS MT-2 NA PRESENÇA DE QUERCETINA E KAEMPHEROL, UTILIZANDO MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	106
5.5 AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE QUERCETINA NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM PBMC E CÉLULAS THP-1 FRENTE À ESTIMULAÇÃO INESPECÍFICA E ESPECÍFICA PARA O HTLV-1	119
5.6 AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE QUERCETINA NA PROLIFERAÇÃO CELULAR DE PBMC PROVENIENTE DE INDIVÍDUOS NÃO INFECTADOS E INFECTADOS PELO HTLV-1, ASSINTOMÁTICOS E PORTADORES DE HAM/TSP	130
<b>6 DISCUSSÃO</b>	138
<b>7 CONCLUSÕES</b>	164
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	166
<b>9 ANEXOS</b>	200
9.1 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO (MARÇO DE 2008 A ABRIL DE 2010)	200
9.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	211
9.3 ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	212

---



---

*“The haven all memes (as retroviruses) depend on reaching  
is the human mind, but a human mind is itself an artifact  
created when memes restructure a human brain  
in order to make it a better habitat for memes.  
What they provide in return to the organisms  
in which they reside is  
an incalculable store of advantages  
with some Trojan horses  
thrown in for good measure...”*

***Adaptado de Daniel Dennett, Consciousness Explained***

## ***Introdução***

---

## 1 INTRODUÇÃO

### ***1.1 Vírus Linfotrópico de células T humanas – características e estrutura***

O HTLV (*Human T-lymphotropic virus*) foi o primeiro retrovírus associado a doença em humanos (GALLO, 2005). A primeira detecção e isolamento do HTLV ocorreram em 1979 em linhagens de células T provenientes de pacientes com linfoma cutâneo de células T. Em 2008, Majorovits e colaboradores demonstraram a presença de vírus em sinapses virais, passando de uma célula infectada para uma célula não infectada, como mostra a figura 1.

O HTLV pertence à família *Retroviridae*, sub-família *Orthoretrovirinae* e gênero *Deltaretrovirus*. Existem dois principais tipos de HTLV: HTLV-1, que apresenta importância clínica significativa e HTLV-2, que eventualmente é associado com manifestações clínicas. Em 2005, dois novos tipos de HTLV (HTLV-3 e HTLV-4) foram identificados em indivíduos residentes em uma zona rural ao sul de Camarões (WOLFE *et al.*, 2005).

## HTLV-1 em fendas sinápticas visto por tomografia eletrônica

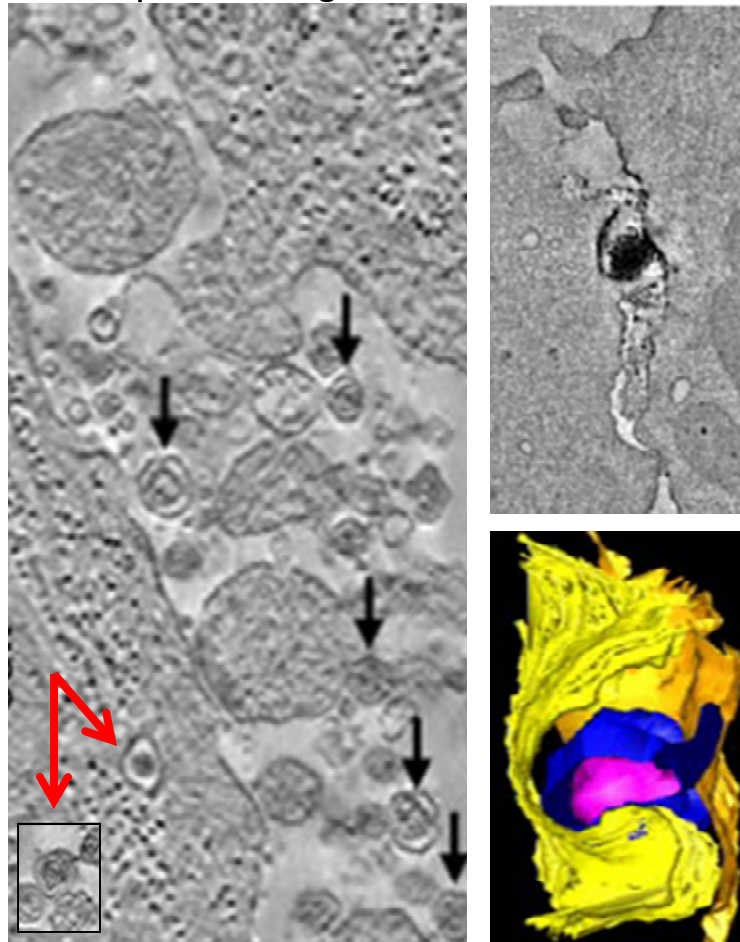


Figura 1 – Tomografia eletrônica de célula infectada pelo HTLV-1 de linhagem contínua (MS9) em contato com linfócitos não infectados (figura da esquerda). Os vírus livres (indicados pelas setas pretas) se encontram em “sinapses virais” entre uma célula e outra. As setas vermelhas indicam uma estrutura semelhante a vírus na superfície da célula infectada MS9. Na figura da direita é possível verificar um vírus cercado pelas membranas das duas células. (Fonte: Adaptado de Majorovits et al., 2008 – PLoS One)

O HTLV, representado na figura 2, possui uma estrutura semelhante à de outros retrovírus, apresentando um envelope lipoprotéico com a proteína transmembrana gp21 e a glicoproteína de superfície gp46, importantes no diagnóstico da infecção. O capsídeo constitui o cerne da partícula viral, que

abriga no seu interior o genoma viral de 9 Kb, representado por duas cópias de RNA de fita simples (ss).

## Partícula do HTLV-1

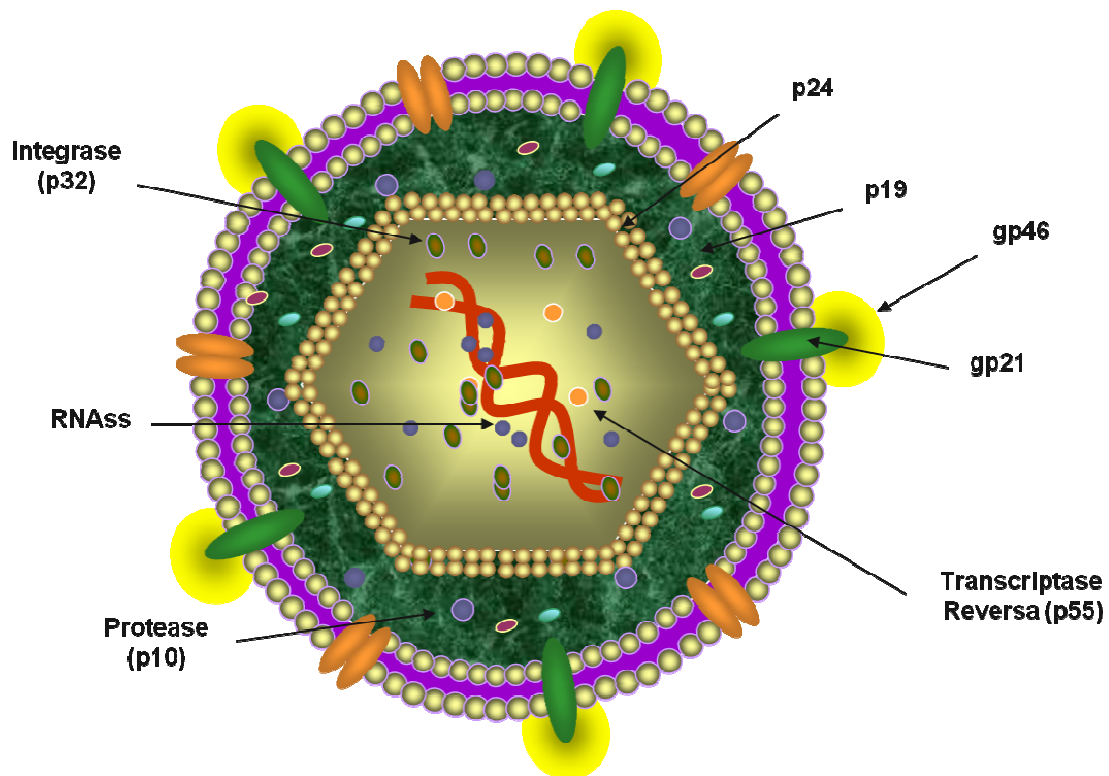


Figura 2 – Representação esquemática da estrutura do HTLV-1 (Fonte: Do próprio autor).

No interior deste capsídeo se encontram também proteínas virais como a transcriptase reversa, protease e a integrase, essenciais no processo de transcrição do RNA viral em DNA complementar e na integração do DNA proviral no genoma da célula hospedeira.

O genoma do HTLV (figura 3) é caracterizado pelas regiões *gag*, *pol* e *env*, flanqueadas por duas terminações longas repetidas (LTRs) localizadas nos finais 5' e 3' do genoma viral. O HTLV também possui outra região, chamada

---

de pX, responsável pela codificação de proteínas regulatórias virais, relacionadas à patogenicidade, como Tax e Rex.

A região de terminação longa repetida (***Long terminal repeat - LTR***) do HTLV está localizada na porção terminal 5' e 3' do genoma viral, que contém promotores virais e outros elementos regulatórios (figura 3). A LTR é dividida em regiões U3, R e U5. A região U3 contém elementos que controlam a transcrição proviral e os sinais de poliadenilação e terminação de mRNA. Nesta região podem-se encontrar elementos responsáveis a Tax (TRE), uma região com repetições de 21 pares de base que são necessárias para a ativação transcricional pela proteína Tax (FRANCHINI, 1995; JOHNSON *et al.* 2001).

Em semelhança com outros retrovírus, o mRNA viral completo (*gag-pro-pol*) codifica a proteína Gag (p53), que é posteriormente clivada pela protease viral dando origem as proteínas p19, de matriz, p24, do capsídeo viral e p15, do nucleocapsídeo. A protease é codificada por uma sequência que vai da região 3' de *gag* até a 5' de *pol* (JOHNSON *et al.* 2001). Outros subprodutos de Gag, ou seja, produtos intermediários como a proteína p28, também são encontrados em células de linhagem contínua infectadas com HTLV-1, sendo visualizadas com forte reatividade em Western blot e Imunoblot (LAL *et al.*, 1993).

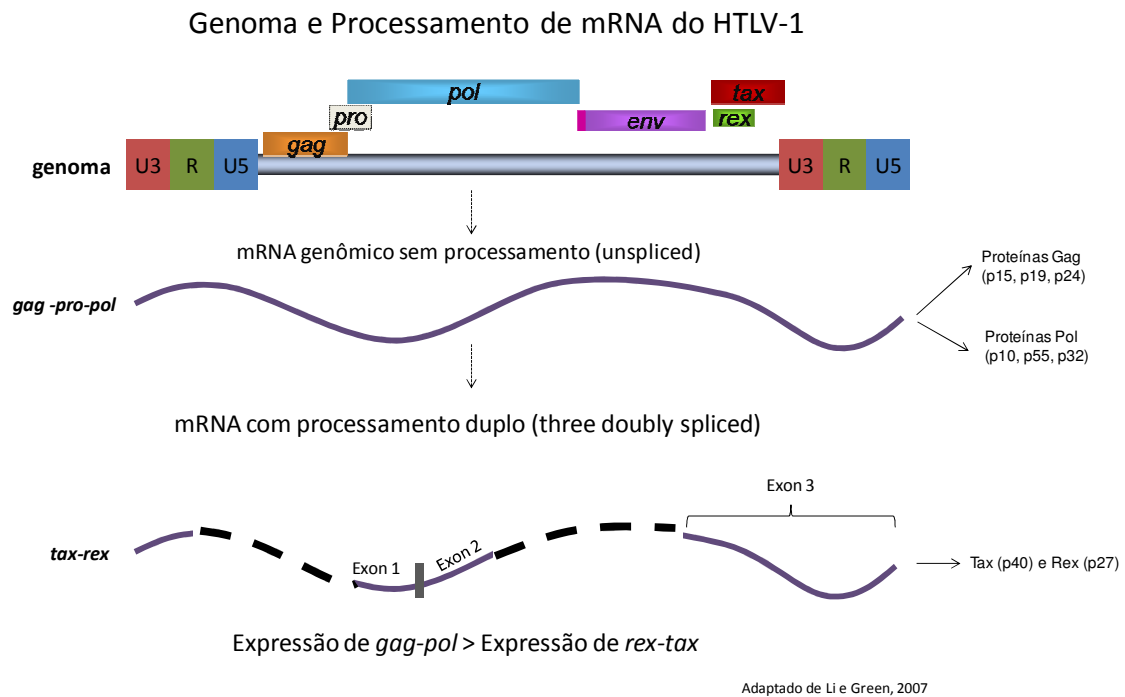


Figura 3 – Representação esquemática do genoma e do processamento de mRNAs do HTLV-1 e as proteínas que cada gene codifica. O gene *gag* codifica a produção das proteínas estruturais indicadas pela seta. O gene *pol* codifica a produção das proteínas p10 (protease), p32 (integrase) e p55 (transcriptase reversa). O gene *env* codifica a produção das glicoproteínas do envelope gp46 (superfície) e gp21 (transmembrana). O HTLV-1 tem 8 transcritos processados (*spliced*) ou não, sendo que os dois principais e mais expressos são o mRNA de *gag-pro-pol* e o mRNA de *tax-rex*. O mRNA de *gag-pro-pol* é um transcrito longo que representa o mRNA mais expresso na célula infectada pelo vírus e codifica a produção das proteínas Gag, Pol e Pro. O mRNA de *tax-rex* é o segundo transcrito mais expresso e codifica a produção das proteínas regulatórias Tax e Rex. Adaptado de Franchini, 1995 e, Li e Green, 2007 .

Adicionalmente, o mRNA viral completo também codifica a produção da proteína Pol, que é sintetizada por resultado de uma mudança de fase na sequência. No entanto, a proteína Env e as proteínas regulatórias Tax e Rex são originadas de mRNAs previamente processados. A proteína Env dará



---

origem as proteínas gp46 e gp21 do envelope viral (KASHANCHI AND BRADY, 2005; JOHNSON *et al.* 2001).

A proteína Tax (40 kDa) tem papel fundamental na replicação viral, podendo ainda regular a expressão de vários genes celulares e estando envolvida na imortalização e transformação das células T infectadas, e, portanto, na patogênese da leucemia/linfoma (ATL) e igualmente na patogênese da HAM/TSP. Tax atua como fator transativador tanto da replicação quanto da transcrição do genoma viral. Tem sido demonstrado que a ativação da expressão de genes virais se dá via LTR, envolvendo para tal a região TRE (KASHANCHI e BRADY, 2005; JOHNSON *et al.* 2001). Assim, Tax se associa ao TRE via interação com o fator de transcrição celular CREB - proteína ligante do elemento responsivo ao AMP cíclico (*cyclic AMP-responsive element-binding protein*). A formação do complexo Tax-CREB é fundamental uma vez que funciona como um sítio de alta afinidade de ligação para recrutamento de coativadores celulares multifuncionais como CBP (proteína ligante de CREB), p300 e PCAF (Fator associado à proteína ligante de CREB/p300) como pode ser visto na figura 4. A formação deste complexo ativa a transcrição por acetilação de histonas e remodelamento da cromatina (KASHANCHI e BRADY, 2005; JOHNSON *et al.* 2001)

## Região promotora de LTR do HTLV-1

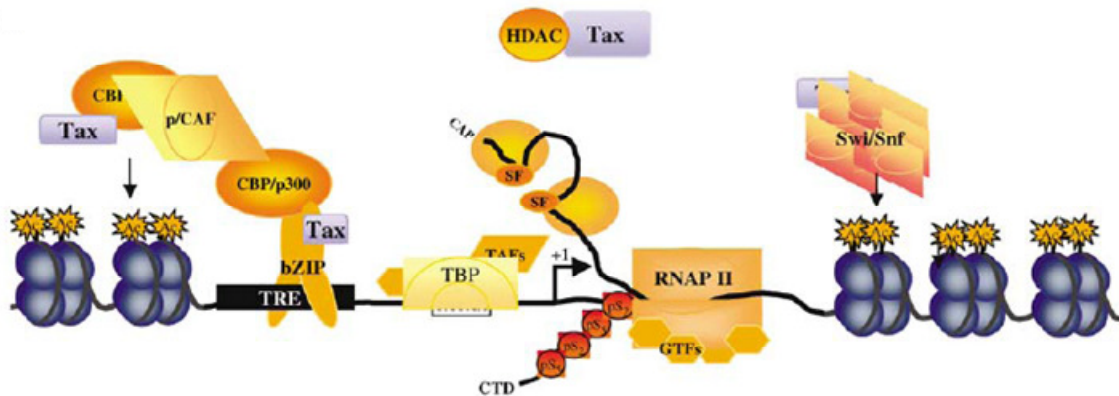


Figura 4 – Representação esquemática do promotor do LTR do HTLV-1. Tax facilita a ligação de CREB e CBP/p300 ao TRE. Posteriormente, a interação de Tax com CBP/p300 e SWI/SNF (complexo remodelador de nucleossomo - *Switch/Sucrose Non Fermentable*) promove a acetilação de histonas e remodelamento da estrutura da cromatina. Adaptado de Kashanchi e Brady, 2005.

Tax pode se ligar igualmente a enzimas desacetilases como a histona desacetilase (HDAC) para inibir a desacetilação de coativadores que estarão participando da ativação da transcrição (KASHANCHI e BRADY, 2005).

Desta forma, a proteína Tax tem grande importância nos processos de regulação da transcrição e expressão de genes virais e celulares, uma vez que ela opera ativando e inibindo o maquinário da célula hospedeira (KASHANCHI e BRADY, 2005; JOHNSON et al. 2001). Estes processos têm consequência direta no que tange a patogênese tanto de ATL quanto de HAM/TSP. Alguns estudos têm demonstrado que Tax atua ainda na ativação de NF- $\kappa$ B, o que está associado tanto ao processo de transformação celular que ocorre em ATL

---

(SUN e YAMAOKA, 2005), quanto ao desenvolvimento de processo inflamatório presente em HAM/TSP adicionado à ativação da imunidade inata e adaptativa (BONJARDIM, 2005; AKIRA e TAKEDA, 2004).

Outra proteína que tem grande importância no processo de regulação viral é a proteína Rex, de 27 kDa. Esta proteína se localiza no núcleo da célula hospedeira e tem a propriedade de se ligar ao RNA e atuar no processamento (*splicing*) e transporte do mRNA viral. Apesar de não ser necessária para a imortalização celular, Rex irá atuar em nível pós transcricional, sendo de grande importância para o processamento da mensagem viral pela célula hospedeira (KASHANCHI e BRADY, 2005).

Existem ainda proteínas codificadas pela região pX, até então pouco estudadas, como p12, p13 e p30, mas que apresentam funções importantes no processo de regulação e patogênese viral. A proteína p12 é codificada pela ORF I do genoma do HTLV-1 e se localiza nas endomembranas na célula infectada (JOHNSON et al. 2001). Embora pouco estudada, já é sabido que p12 é necessária para primo-infecção de linfócitos in vitro. As proteínas p13 e p30 são codificadas pela ORF II do genoma viral e se localizam nas mitocôndrias e nos nucléolos, respectivamente. Ambas as proteínas estão associadas com a manutenção de uma elevada carga proviral no hospedeiro.

A proteína p13 está associada a possíveis danos em mitocôndrias. Já a proteína p30 também está envolvida em processo de modulação da transcrição gênica dentro da célula. Estudos atuais (DATTA, et al, 2006) demonstram

---

ainda que a p30 pode interferir na sinalização de receptores do tipo Toll, como o TLR-4, modulando a liberação de citocinas anti e pró-inflamatórias por macrófagos humanos, o que poderia estar relacionado com infecções secundárias por patógenos oportunistas associadas à infecção pelo HTLV-1, como *Pneumocystis carinii*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Mycobacterium avium*, *Aspergillus*, *Cytomegalovirus* e *Strongyloides stercoralis* (GOON, et al., 2004; BRAGA et al., 2006; VERDONCK et al., 2007).

## **1.2 Interação do vírus HTLV e hospedeiro: multiplicação e disseminação**

### **1.2.1 Células susceptíveis a infecção pelo HTLV-1**

No que diz respeito ao tipo celular, o HTLV potencialmente pode infectar qualquer célula do organismo humano, no entanto, o vírus tem tropismo preferencial por linfócitos T CD4<sup>+</sup>, sendo também encontrado em outras populações linfocitárias como linfócitos T CD8<sup>+</sup> (MACATONIA *et al.*, 1992) ou em células da linhagem monocítica/macrofágica como as células dendríticas (JONES, et al., 2008, JAIN, et al., 2009).

### **1.2.2 Ciclo de Multiplicação**

O ciclo de multiplicação do HTLV é característico dos retrovírus, como ilustrado na figura 5.

### Ciclo de Multiplicação do HTLV-1

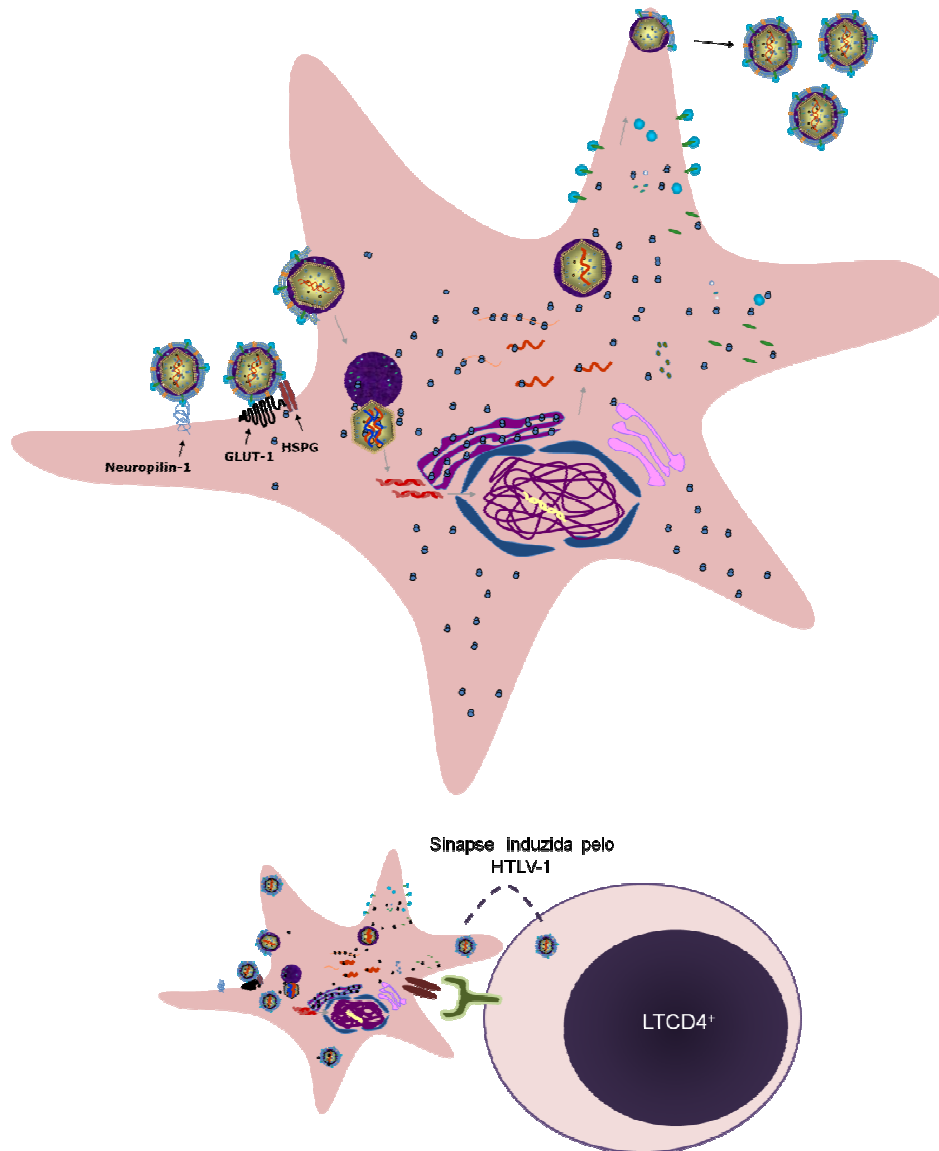


Figura 5 – Representação esquemática do ciclo de multiplicação do HTLV-1 em uma célula dendrítica. O vírus interage com o receptor Neuropilina 1 através da glicoproteína de superfície gp46 que sofre uma mudança conformacional. Após esta mudança, a gp46 se liga ao GLUT-1 e utiliza como co-receptor moléculas de Heparan Sulfato (HSPG) e o seu capsídeo é liberado no interior da célula. Ocorre a transcrição reversa do material genético que é integrado ao genoma da célula. O vírus estabelece uma infecção permanente. Pode, então, dirigir a produção de proteínas e genoma viral para produzir novas partículas virais que sairão da célula

---

por brotamento ou infectar células T CD4<sup>+</sup> através de sinapses celulares induzidas pelo vírus. (TAKENOUCI *et al.*, 2007; JONES *et al.*, 2008; JAIN P., *et al.*, 2009; WILLEMS L., *et al.*, 2009). Fonte: do próprio autor.

A glicoproteína transmembrana gp46 do envelope viral do HTLV interage com o receptor GLUT-1, transportador de glicose presente na superfície celular do hospedeiro (MANEL *et al.*, 2005, KINET *et al.*, 2007). Algumas moléculas da membrana do hospedeiro poderiam atuar como co-receptores para o vírus, como as ICAMs, VCAMs e proteoglicanas de heparan sulfato (HSPG) (MANEL *et al.*, 2005), no entanto estudos tem indicado que a HSPG seria a molécula auxiliar que promove a entrada do vírus na célula (JONES *et al.*, 2005). Ocorre, então, a fusão do envelope viral com a membrana plasmática e o capsídeo viral é introduzido na célula.

Dentro do capsídeo, a transcriptase reversa (p55) realiza a transcrição do genoma RNA em cDNA e este é duplicado. Posteriormente, esse DNA é integrado no genoma da célula hospedeira formando o provírus, por ação da integrase viral. Ocorre a transcrição de um longo transcrito de RNA, tendo como fita molde o DNA proviral, utilizando-se o maquinário celular. Este transcrito pode ser processado, ou não (KASHANCHI e BRADY, 2005; JOHNSON *et al.*, 2001), em mRNAs que codificam proteínas virais específicas e, igualmente, RNA genômico viral. Ocorre a montagem e empacotamento dos novos vírus que são liberados por brotamento na região extracelular (GOFF, 2004; KROON *et al.*, 2006).



---

### 1.2.3 Infecção primária

Várias controvérsias em relação ao estabelecimento de infecção primária em células do hospedeiro surgem, uma vez que partículas virais livres dificilmente infectam os principais tipos celulares onde o vírus é encontrado, como as células T CD4<sup>+</sup> (JONES et al., 2008; MOROZOV e WEISS, 1999) e, adicionalmente, o HTLV-1 apresenta baixa taxa de liberação de partículas virais por brotamento (GALLO, 2008 e VAHLNE, 2009).

Desta forma, vários autores propõem que o vírus infecta outro hospedeiro a partir de compartilhamento de células infectadas pelo vírus de um hospedeiro infectado pelo HTLV-1, como por exemplo, em transfusões de sangue, aleitamento materno, compartilhamento de seringas e agulhas infectadas e por aleitamento materno (KAJIYAMA et al., 1986; HINO et al., 1985; NOMURA et al., 2006).

Recentemente, estudos que tem como foco preencher várias lacunas no entendimento do processo de infecção do HTLV no hospedeiro verificaram que partículas virais livres são capazes de infectar células dendríticas e estas, por sua vez, levam a infecção de células T CD4<sup>+</sup> pelo vírus (JONES, et al., 2008).

A infecção de células T CD4<sup>+</sup> via células dendríticas e a própria infecção das células dendríticas é mediada pelo receptor Neuropilina-1 e HSPG, contrapondo a idéia de que o receptor GLUT-1 seria o receptor inicial e

---

principal. Segundo este e ainda outros estudos, o GLUT-1 está associado com a infecção pelo HTLV-1, no entanto, ele está envolvido na internalização viral após a ligação da gp46 em Neuropilina-1 que é facilitada por HSPG (JONES et al., 2008; LAMBERT et al., 2009). Posteriormente, ocorre a ligação desta glicoproteína de superfície (gp46) ao GLUT-1 e internalização do vírus (TAKENOUCI et al., 2007; JONES et al., 2008). Em células dendríticas, o receptor DC-SIGN, uma lectina do tipo C, também parece estar associado com a infecção pelo HTLV-1 (JAIN P., et al., 2009; WILLEMS L., et al., 2009).

Este poderia ser um mecanismo paralelo ou alternativo para a infecção do hospedeiro, uma vez que o brotamento viral é escasso em células infectadas não transformadas (JONES et al., 2008; MOROZOV e WEISS, 1999). Entretanto, estudos mais aprofundados ainda precisam ser conduzidos, no intuito de esclarecer a adesão e internalização do HTLV-1 nas células hospedeiras, em especial nas células dendríticas e células T CD4<sup>+</sup>.

#### *1.2.4 Disseminação viral no hospedeiro*

Como já descrito anteriormente, o HTLV apresenta baixa taxa de brotamento viral e partículas livres do HTLV-1 apresentam baixa infectividade (GALLO, 2008 e VAHLNE, 2009) contrastando com outros retrovírus, o que gera um debate intenso em relação a sua *disseminação dentro do hospedeiro*. Desta forma, várias hipóteses já foram propostas e investigadas no intuito de entender os processos pelos quais o vírus se dissemina. As duas principais

---

hipóteses de disseminação do vírus que aqui serão discutidas são: sinapses celulares ou sinapses virais e a expansão clonal de linfócitos T CD4<sup>+</sup>.

As sinapses celulares induzidas pelo HTLV-1 têm sido intimamente estudadas desde o descobrimento do vírus, no intuito de se entender o processo pelo qual o vírus induz o contato célula-célula. Este contato ainda não se apresenta completamente elucidado, mas já foi descrito que este ocorre via receptores celulares, em especial o receptor GLUT-1 e proteínas do envelope viral, sendo necessária a polarização do citoesqueleto para concentrar receptores celulares e partículas virais em regiões próximas para disseminar o vírus (IGAKURA *et al.*, 2003; BARNARD *et al.*, 2005).

Majorovits e colaboradores (2008) realizaram estudos de tomografia eletrônica com o intuito de retratar e explicar as sinapses celulares induzidas pelo HTLV-1, demonstrando que o contato célula infectada - célula alvo acontece naturalmente, no qual partículas envelopadas do HTLV-1 entram em contato com a membrana da célula alvo antes de se desligarem da membrana da célula de origem. A membrana da célula infectada fica em aposição a membrana da célula alvo fazendo com que o HTLV-1 fique confinado em espaços intercelulares. Ocorre a interação de moléculas do envelope com a célula alvo e internalização do vírus (MAJOROVITS *et al.*, 2008).

Pais-Correa e colaboradores (2010) descreveram o mais novo e bem detalhado modelo de sinapses celulares que, de acordo com os autores, ocorre via a

---

formação de um biofilme extracelular mediado pelo HTLV-1. Neste processo, o vírus induz a produção de componentes da matriz extracelular e proteínas de adesão, como colágeno, agrina, teterina, galectina-3 e moléculas de Heparan Sulfato que além de criar um suporte extracelular para o vírus estão presentes na própria partícula viral e auxiliam na adesão e infecção da células-alvo. O aumento da expressão de moléculas de adesão em células infectadas pelo vírus auxilia igualmente a aposição das membranas, aumentando as chances de sucesso de transmissão viral nas sinapses celulares. Segundo Meekings e colaboradores (2008), a sinapse celular induzida pelo HTLV-1 seria a via de disseminação mais importante em fases recentes da infecção.

A expansão clonal induzida pelo HTLV-1 é uma das hipóteses mais bem aceitas para explicar a disseminação viral tardia e manutenção da carga proviral estável durante o curso da infecção (WATTEL et al., 1995; TAYLOR e MATSUOKA, 2005; MEEKINGS et al., 2008; UMEKI et al., 2009). Após a infecção e ativação de células T CD4<sup>+</sup> pelo HTLV-1, estas células se multiplicam por mitose na expansão clonal carregando consigo provírus do HTLV-1 e disseminando, desta forma, o vírus por todo o organismo do hospedeiro, já que linfócitos T CD4<sup>+</sup> são células circulantes do sangue (WATTEL et al., 1995). Segundo Umeki e colaboradores (2009), a expansão clonal induzida pelo vírus tem início logo na infância em indivíduos infectados via aleitamento materno, contribuindo especialmente para a disseminação do vírus ainda na infância.

---

O brotamento viral em células não-transformadas pode eventualmente contribuir para a disseminação do HTLV, mesmo que de forma branda e vaga (GALLO, 2008, JONES, 2008). Já o brotamento viral em células transformadas pelo HTLV-1, aparentemente, é mais abundante e freqüente (MOROZOV et al., 1999; MIYOSHI et al., 1981; MAJOROVITS et al., 2008), o que sugere que nos indivíduos nos quais ocorre malignização das células infectadas pelo vírus, o brotamento viral poderia ser um fator que contribui mais para a *disseminação tardia* do HTLV-1 no hospedeiro do que a expansão clonal (WATTEL et al., 1995).

No entanto, as *sinapses celulares*, nos estágios recentes da infecção e a *expansão clonal*, após estabelecimento de infecção produtiva, que se apresenta como assintomática na maioria dos casos de indivíduos infectados são as principais formas de disseminação do vírus no hospedeiro (MEEKINGS et al., 2008).

### **1.3 Epidemiologia da infecção pelo HTLV**

A infecção pelo HTLV abrange milhões de pessoas em todo o mundo. Áreas endêmicas se caracterizam por uma soroprevalência variando entre 0,5 a 20 % na população geral, dependendo da idade e sexo. Como regiões endêmicas do HTLV-1, podem ser citadas as ilhas do sudeste do Japão, com algumas áreas com até 37% da população soropositiva, as ilhas do Caribe, com 3,9% de prevalência em afro-descendentes de Trinidad-Tobago, 4,25% em Barbados e 5 a 6% na Jamaica, regiões africanas (área do sub-Saara), Melanésia, região

---

sudeste dos Estados Unidos, e regiões da América Central e do Sul (CARNEIRO-PROIETTI *et al.*, 2002).

No Brasil, estima-se que cerca de 2,5 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HTLV-1 (CARNEIRO-PROIETTI *et al.*, 2002; CATALAN-SOARES *et al.*, 2005). Em estudos de rastreamento sorológico nas principais capitais brasileiras, foi possível encontrar presença de infecção em todos os estados com prevalências variando de 0,08% em Manaus e Florianópolis a 1,8% em Salvador. Assim, o Brasil se caracteriza como o país com maior número absoluto de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (CARNEIRO-PROIETTI *et al.*, 2002).

Apesar da elevada taxa de erros na replicação de retrovírus, o HTLV-1, diferentemente do HIV, apresenta baixa variabilidade de seqüências intra e inter individuais (DAENKE, *et al.*, 1990; GESSAIN *et al.*, 1996). Esta baixa variabilidade tem sido explicada pela baixa taxa de replicação do genoma viral, e pelas vias preferenciais de disseminação do vírus no hospedeiro, a expansão clonal e sinapses celulares (MEEKINGS *et al.*, 2008). Ainda assim, o HTLV tem sido classificado em alguns subtipos, baseado em diferenças em seqüências de *env* e LTR do DNA proviral. O gene *env* está submetido a uma maior pressão seletiva, exercida principalmente pelo sistema imunológico dos hospedeiros que abrigam o vírus, e, portanto, este gene está sujeito a uma maior probabilidade de mutações. Considerando a região *env*, estudos atuais caracterizaram isolados seqüenciados de HTLV-1, em três grupos bem definidos, corroborando estudos anteriores: Cosmopolita (subtipo A)

---

predominante na maioria das regiões endêmicas como Japão e América do Sul, centro-africano (subtipos B, D e F) e um novo subtipo chamado de “Maroni” presente em Maroni Basin, Guinéa Francesa e no Oeste da Índia (CAPDEPONT *et al.*, 2005). Estudos anteriores relataram existência do subtipo E no sul da África (SLATTERY *et al.*, 1999, Apud PROIETTI *et al.*, 2005) e do subtipo C presente na Melanésia (GESSAIN *et al.*, 1991, Apud PROIETTI *et al.*, 2005). No Brasil, o grupo predominante é o cosmopolita, do subtipo A.

A transmissão do HTLV acontece por meio de intercuro sexual, no canal do parto, aleitamento materno, transfusões sanguíneas e compartilhamento de agulhas e seringas contaminadas (KAJIYAMA *et al.*, 1986; HINO *et al.*, 1985; NOMURA *et al.*, 2006). Devido ao risco de transmissão parenteral, os testes de triagem para HTLV 1/2, em bancos de sangue, foram introduzidos em diversos países, sendo no Brasil a triagem obrigatória desde 1993, através da portaria nº 1376 do Ministério da Saúde, ratificada pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 153 de 14 de julho de 2004 da ANVISA.

A probabilidade de um indivíduo infectado pelo HTLV-1 desenvolver HAM/TSP varia conforme a localidade: no Japão esta probabilidade é estimada em 0,25% (KAPLAN, *et al.*, 1990) enquanto que no Reino Unido, na África, no Caribe e nos Estados Unidos a probabilidade aumenta de 1,7 a 7% (JEANNEL, *et al.*, 1993; TAYLOR, 1998). No Brasil, a maioria dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 evolui para o quadro clínico de HAM/TSP ao invés de ATL, no entanto, ainda são necessários maiores estudos para estimar a probabilidade de

---

desenvolvimento da doença. Acredita-se que esta probabilidade está em torno de 5 e 10% (CATALAN-SOARES, *et al.*, 2006).

#### **1.4 Manifestações Clínicas associadas à infecção pelo HTLV-1**

Do ponto de vista clínico, a grande maioria (95%) dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 pode permanecer em estado assintomático durante toda a vida, enquanto 1 a 5% poderá desenvolver manifestações clínicas do tipo hematológica ou inflamatória (OSAME, 1999).

As duas principais síndromes associadas ao HTLV-1 são a ATL - Linfoma e Leucemia de células T do Adulto, e a HAM/TSP - Mielopatia Associada ao HTLV / Paraparesia Espástica Tropical. Outras entidades clínicas (figura 6), de ordem inflamatória, associadas ao vírus já foram descritas, são elas: tireoidite, polimiosite, dermatites, uveíte, alveolite pulmonar, artropatias e síndrome de Sjögren (GOTUZZO *et al.*, 2004; DE CASTRO-COSTA *et al.*, 2006; VERDONCK *et al.*, 2007). Algumas complicações infecciosas podem acometer indivíduos infectados pelo HTLV-1 como dermatite infecciosa, estrongiloidíase, equistossomose, (BRAGA *et al.*, 2006) escabiose, hanseníase e tuberculose (VERDONCK *et al.*, 2007). Desta forma, um único indivíduo infectado pelo HTLV-1 pode apresentar mais de uma manifestação clínica, ou ainda, ser assintomático para HAM/TSP ou ATL, mas apresentar complicações infecciosas como a estrongiloidíase ou complicações inflamatórias como a uveíte e a dermatite (GOTUZZO *et al.*, 2004; DE CASTRO-COSTA *et al.*, 2006; VERDONCK *et al.*, 2007).



## Manifestações clínicas associadas ao HTLV-1

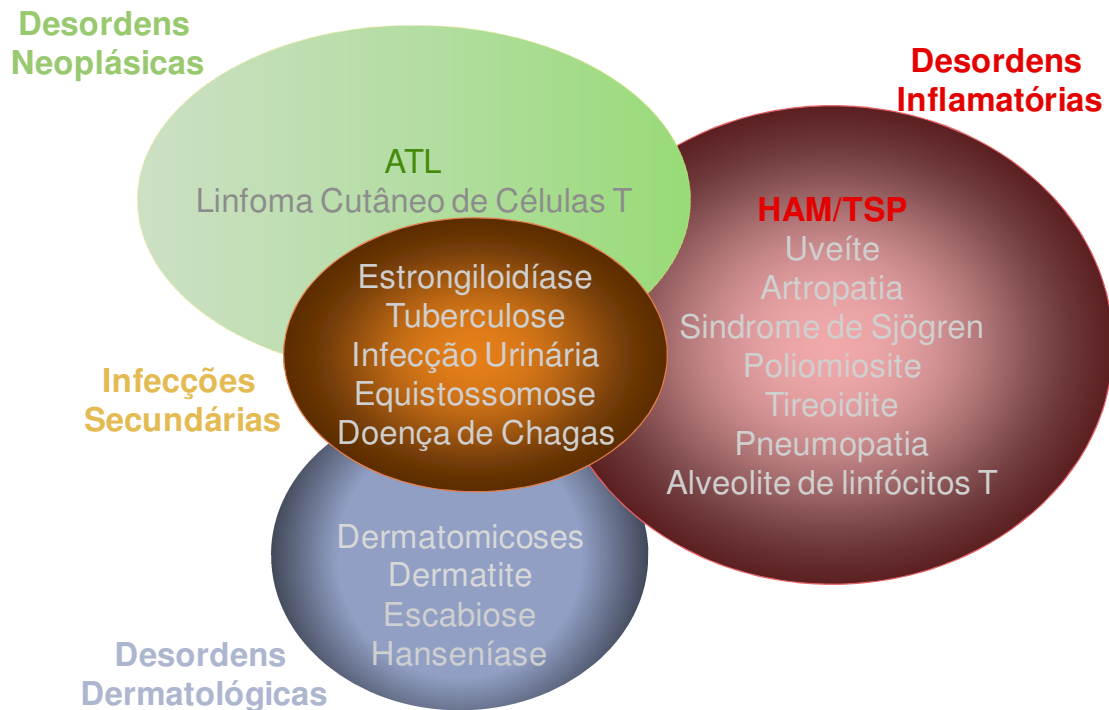


Figura 6 – Representação esquemática das manifestações clínicas associadas a infecção pelo HTLV-1 segundo Verdonck e colaboradores (2007) e Braga e colaboradores (2006). No círculo vermelho, as manifestações de ordem degenerativo-inflamatórias. Na elipse verde, estão as manifestações clínicas de ordem neoplásica. No círculo laranja, estão as complicações infecciosas decorrentes da infecção pelo vírus e no círculo azul estão as desordens dermatológicas que podem acometer indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos ou não para outras desordens. Os círculos se sobrepõem para ilustrar que pacientes infectados pelo HTLV-1 podem apresentar mais de uma manifestação clínica, sejam elas neoplásicas, inflamatórias, dermatológicas ou infecciosas.

A Leucemia/Linfoma de células T do Adulto associada à infecção pelo HTLV-1, desenvolve em 1 a cada 1.000 - 2.000 indivíduos soropositivos por ano. A doença possui um longo período de latência, (SHIMOYAMA *et al.*, 1991), sendo classificada em pelo menos 4 subtipos clínicos: aguda, crônica, latente e

---

linfoma. Esta classificação é baseada no número de células T anormais no sangue periférico, nos níveis de Desidrogenase Láctica (LDH), de  $\beta$ 2-microglobulina e de receptores solúveis para IL-2 nas lesões do tumor em diversos órgãos e no curso clínico do paciente (YAMAGUCHI *et al.*, 1993; NICOT *et al.*, 2005).

Um achado hematológico que auxilia no diagnóstico de pacientes portadores de Leucemia/Linfoma de células T no Adulto são *Flower cells* ou células em flor. São células neoplásicas, transformadas com o genoma do HTLV-1, com o fenótipo de CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, além de expressar moléculas de ativação e adesão (VERDONCK *et al.*, 2007). Provavelmente, por apresentarem fenótipo de células T reguladoras que se tornaram neoplásicas, devem ter um papel importante no desenvolvimento da leucemia.

Em 1985, Gessain e colaboradores relataram a existência de pacientes com Paraparesia Espástica Tropical apresentando elevados níveis de anticorpos anti-HTLV-1. Em 1986, Osame e colaboradores reportaram uma nova entidade clínica: a Mielopatia Associada ao HTLV-1, na qual pacientes apresentando paraparesia espástica também apresentavam elevados níveis de anticorpos anti-HTLV-1.

Em 2006, Castro-Costa e colaboradores revisaram o critério clínico para o diagnóstico de HAM/TSP, sendo eles: presença de sintomas mielopáticos tais como, paraparesia espástica não remissiva, fraqueza nos membros inferiores, hiperreflexia com clônus, sinal de Babinski; detecção de anticorpos anti-HTLV-1

---

no soro ou no fluido cérebro-espinhal e detecção de carga proviral do HTLV-1, com exclusão de outras desordens.

Na HAM/TSP, o processo patológico envolve, como principal característica, desmielinização perivascular e degeneração axonal, acompanhada de uma resposta inflamatória na região afetada e por um infiltrado de células mononucleares e destruição de fibras nervosas no foco inflamatório levando à perda da capacidade motora-sensorial (KOPROWSKI *et al.*, 1985; IZUMO *et al.*, 1988; OSAME, 1999).

A progressão da doença é lenta, com maior frequência de mulheres, sendo que o estabelecimento do processo degenerativo irreversível se dá entre 30 e 40 anos de idade (CATALAN-SOARES, *et al.*, 2001). Os sintomas mais comuns são: dor lombar, disfunção urinária, impotência sexual, hipo e hiperreflexias, parestesias e paraparesia espástica (OSAME, 1986; TAYLOR, 1998). Depois do estabelecimento de HAM/TSP, a estimativa é que 50% dos indivíduos serão dependentes de cadeiras de rodas (TAYLOR, 1998), o que caracteriza esta doença como de alta gravidade.

### **1.5 Imunologia no contexto da infecção pelo HTLV-1**

No que tange a infecção pelo HTLV-1, é inquestionável a participação do sistema imunológico na disseminação do vírus no hospedeiro e no desenvolvimento e manutenção dos processos patológicos, em especial as desordens inflamatórias induzidas pelo vírus. Dentre as desordens

---

inflamatórias de mais destaque, alguns trabalhos têm classificado a HAM/TSP, no contexto da resposta imunológica, como uma síndrome de estado hiperimune de maior gravidade no contexto da infecção, no qual ambas as imunidades celular e humoral estão exacerbadas (NAGASATO, *et al.*, 1991; LAL, *et al.*, 1993; MATSUI, *et al.*, 1995; BRITO-MELO, *et al.*, 2002). Várias hipóteses têm sido sugeridas para explicar o mecanismo que leva ao dano tecidual. Taylor, em 1998, propôs que existiriam três principais hipóteses que explicariam o dano tecidual. São elas: a toxicidade direta de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, a autoimunidade e a hipótese de dano indireto.

No entanto, Bangham, em 2003, sugere que a hipótese da toxicidade direta por células efectoras do sistema imune seria pouco provável de acontecer, uma vez que poucas células residentes do SNC estariam infectadas pelo HTLV-1 (LEHKY *et al.*, 1995; MATSUOKA *et al.*, 1998, apud BANGHAM, 2003). Adicionalmente, seriam necessários outros mecanismos para explicar o dano no sistema nervoso periférico principalmente na região lombar. Osame, em 2002, propõe que haveria ação de células CD4<sup>+</sup> T *helper* e CD8<sup>+</sup> citotóxicas na produção de citocinas que causariam o dano indireto, sugerindo uma hipótese conciliadora. Assim, as duas hipóteses (figura 7), de autoimunidade e do dano indireto, que são corroboradas por Osame, serão discutidas, juntamente com os aspectos imunológicos no contexto da infecção pelo HTLV-1 envolvidos na proteção do hospedeiro ao desenvolvimento de doença.

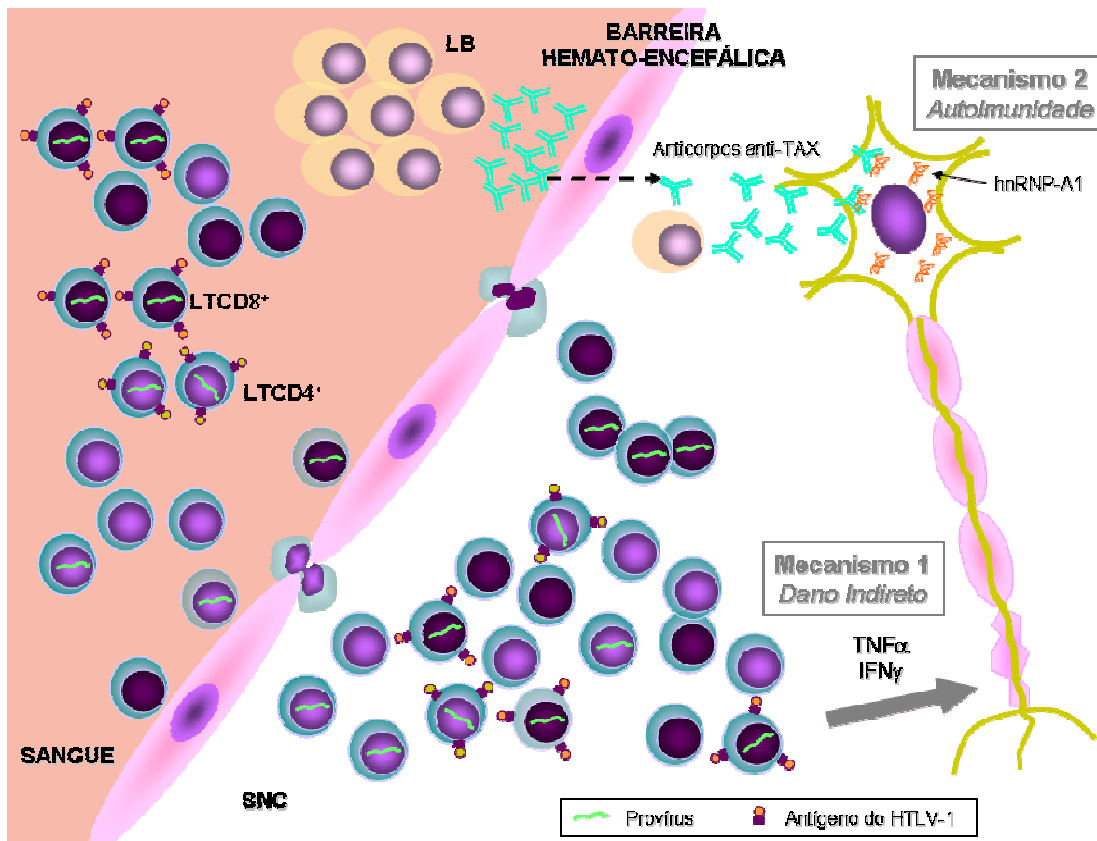


Figura 7 – Representação esquemática dos mecanismos 1 (Dano Indireto) e 2 (Autoimunidade) que levam ao desenvolvimento de HAM/TSP. No mecanismo do dano indireto, Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> atravessam a barreira hemato-encefálica e liberam citocinas neurotóxicas, como TNF e IFN- $\gamma$ , que promoverão o dano a mielina. No mecanismo de autoimunidade, anticorpos anti-Tax solúveis produzidos por linfócitos B reagem cruzadamente com uma proteína do corpo neuronal, a proteína hnRNP-A1, promovendo a destruição do neurônio. O mecanismo pelo qual os anticorpos entram no neurônio ainda é desconhecido. LB – Linfócitos B. LTCD4<sup>+</sup> - Linfócitos T CD4<sup>+</sup> (helper). LTCD8<sup>+</sup> - Linfócitos T CD8<sup>+</sup> (citotóxicos). Adaptado de Osame, 2002.

No mecanismo de **dano indireto**, células T CD4<sup>+</sup> (T *helper*) e T CD8<sup>+</sup> (citotóxicas) exercem sua função anti-células infectadas, secretando citocinas essenciais para a manutenção da resposta inflamatória, como IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-9 e IL-13 (JACOBSON *et al*, 1990; KOENIG *et al*, 1993;

---

TAYLOR, 1998; LIM *et al.*, 2000; GOON, *et al.*, 2002; GOON, *et al.*, 2003; CHUNG, *et al.*, 2003).

Mais especificamente, células T CD4<sup>+</sup> são o principal reservatório de provírus, sendo preferencialmente infectadas pelo HTLV-1, embora outras células do sistema imunológico já tenham sido encontradas apresentando infecção pelo vírus (BANGHAM, 2003). Goon e colaboradores em 2002 relataram um aumento na produção de IFN- $\gamma$  por células T CD4<sup>+</sup>, em resposta as proteínas Env e Tax, em pacientes portadores de HAM/TSP em relação aos indivíduos assintomáticos e não infectados pelo HTLV-1. Estas células não expressavam antígenos do HTLV-1, portanto, provavelmente não estavam infectadas pelo vírus. O mesmo resultado não foi observado para IL-4, indicando que uma resposta do tipo Th1 é predominante e pode contribuir para a patogênese de HAM/TSP e ainda de outras desordens inflamatórias associadas à infecção pelo vírus. Os mesmos autores, em 2003, relatam a existência de uma elevada freqüência de células T CD4<sup>+</sup> específicas para HTLV-1 produtoras de TNF- $\alpha$  e IL-2 em pacientes portadores de doença neurológica associada à infecção pelo vírus (GOON *et al.*, 2003). Assim, células T CD4<sup>+</sup> produtoras de citocinas neurotóxicas como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  poderiam estar associadas ao dano à mielina, uma vez que altas concentrações destas citocinas são encontradas no fluido cerebro-espinhal de pacientes com HAM/TSP (NAKAMURA *et al.*, 1993; KURODA *et al.*, 1993; KUBOTA *et al.*, 2002).

Adicionalmente, outros autores (CHUNG *et al.*, 2003) relatam que outras citocinas como IL-9 e principalmente IL-13 atuam como citocinas auxiliares

---

no processo de patogênese de HAM/TSP, uma vez que se verificou elevada produção de mRNA destas citocinas em células T de pacientes infectados portadores de doença. IL-13, ainda, apresenta uma alta correlação direta com os níveis de Tax expressos em células T CD4<sup>+</sup> recentemente infectadas.

Quanto às células T CD8<sup>+</sup>, os estudos atuais têm buscado entender a funcionalidade destas células e até onde elas participam da patogênese e/ou da proteção à infecção pelo HTLV-1. Em vários trabalhos já foi demonstrado o aumento de células T CD8<sup>+</sup> específicos para HTLV-1 no sangue circulante de pacientes portadores de HAM/TSP em relação a indivíduos assintomáticos (TAYLOR, 1998; LIM *et al.*, 2000; ASQUITH e BANGHAM, 2000; NAGAI *et al.*, 2001; OSAME, 2002; BRITO-MELO *et al.*, 2002; BANGHAM, 2003).

Asquith and Bangham, em 2000, propuseram uma teoria conciliadora entre as hipóteses de dano e proteção proporcionada por células T CD8<sup>+</sup> específicas para HTLV-1, baseada na carga proviral. Assim, enquanto a carga proviral estiver até um determinado limiar, os TCR das células T CD8<sup>+</sup> ainda são capazes de proceder à lise de células infectadas, mas como a estimulação antigênica é baixa, a produção de IFN- $\gamma$  também é baixa. Já quando a carga proviral atravessa um determinado limiar, o estado de ativação de células T CD8<sup>+</sup> se modifica de tal forma que o perfil de lise celular não altera, mas a produção de IFN- $\gamma$  é elevada abruptamente. Desta maneira, o perfil de ativação de células T CD8<sup>+</sup> muda de parcialmente a totalmente ativado, alterando, assim, seu papel de puramente protetor para tanto protetor quanto patogênico.

---

Em relação a produção de citocinas, Brito-Melo e colaboradores propuseram que IL-10 produzida por células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> exerceria um papel fundamental de imunoregulação, contrabalanceando o papel de TNF $\alpha$  produzido por monócitos e linfócitos e garantindo o perfil clínico assintomático durante a infecção pelo HTLV-1. Estudos anteriores propuseram que IL-10 poderia ter um potencial uso terapêutico na HAM/TSP (SANTOS, *et al.*, 2004).

Em relação ao mecanismo de **autoimunidade** (figura 7 – Mecanismo 2), Levin e colaboradores, em 2002, demonstraram que anticorpos anti-HTLV-1 identificaram autoantígenos no SNC em pacientes com HAM/TSP. Imunoglobulinas G isoladas de pacientes portadores de HAM/TSP identificaram a ribonucleoproteína hnRNP-A1 em células Betz. Lee e colaboradores, em 2006, corroboraram este resultado demonstrando que os anticorpos que reagiram cruzadamente com hnRNP-A1 foram IgG específicos para Tax de HTLV-1, impedindo o disparo do estímulo nervoso nas células afetadas. Este mimetismo molecular só foi observado, até então, em camundongos, mas já há indício de um mecanismo auxiliar no processo de patogênese de HAM/TSP (WUCHERPFENNIG, 2002).

No contexto imune humoral, anticorpos do tipo IgM são os primeiros anticorpos a serem desenvolvidos na fase aguda da infecção e, ao passar do tempo, vão desaparecendo da corrente sanguínea e sendo substituídos por IgG, em especial IgG1 e IgG3 (LAL *et al.*, 1993), anticorpos mais específicos, característicos de fase crônica da infecção por vírus. No entanto, IgM é persistentemente detectada em parte dos pacientes infectados pelo HTLV-1,



---

indicando uma provável, porém não comprovada, replicação viral constante durante a fase crônica da infecção (NAGASATO *et al.*, 1991, LAL *et al.*, 1993).

Embora Tax tenha sido constantemente considerada a proteína mais imunogênica do HTLV-1 e que é primariamente reconhecida por células T CD8<sup>+</sup> (BANGHAM, 2003), a glicoproteína de superfície gp46 é a primeira a ser reconhecida por anticorpos neutralizantes. No entanto, apenas anticorpos anti-gp46 que identificam porções que contêm epítomos conformacionais não imunodominantes predominam em indivíduos assintomáticos, ou seja, são capazes de neutralizar a partícula viral (HADLOCK, *et al.*, 1999).

### ***1.6 Diagnóstico e prognóstico da infecção pelo HTLV***

No Brasil, o diagnóstico da infecção pelo HTLV-1/2 foi incluído como obrigatório para a triagem sorológica de doadores de bancos de sangue através da Portaria nº 1376 do Ministério da Saúde, ratificada pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 153 de 14 de julho de 2004 da ANVISA.

Recentemente, foi promulgada a lei estadual 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. Este mesmo serviço será oferecido para todas as gestantes atendidas nas regiões do estado onde se verifique grande incidência dos vírus HTLV-1/2. A nova lei também garante ao paciente diagnosticado como soropositivo, aconselhamento

---

clínico e familiar e aquele que manifestar doença decorrente da infecção pelo vírus HTLV receberá tratamento em centros especializados, devendo entrar em vigor em um prazo de noventa dias.

O diagnóstico da infecção pelo HTLV-1/2 apresenta duas etapas principais. A primeira é a etapa de triagem sorológica, no qual são utilizados testes com elevada sensibilidade, ou com elevado valor preditivo negativo, como os ensaios imunoenzimáticos, incluindo ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) e ensaios de aglutinação em látex, usando, em sua maioria, lisado viral, proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos como fonte de antígenos. Atualmente, os ensaios sorológicos não utilizam apenas lisado viral, mas também, proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos, no intuito de aumentar a sensibilidade da técnica e de diminuir a reatividade cruzada com antígenos de outros vírus como HIV e HCV (BRASIL, 2004). Os testes de aglutinação, outro teste de triagem, se baseiam na adsorção de antígenos do HTLV em superfície de partículas de látex ou gelatina que funcionam com suporte antigênico para a reação com soro de indivíduos a serem triados (BRASIL, 2004).

Na segunda etapa, é feita a confirmação do diagnóstico de infecção utilizando, para tal, testes com elevada especificidade, ou com elevado valor preditivo positivo, como o *western blot*, o ensaio de imunofluorescência indireta em lâmina, ou ainda, testes moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Em bancos de sangue e em laboratórios de saúde pública, um dos kits comerciais mais utilizados para *western blot* (HTLV Blot 2.4, Genelabs

---

Diagnostics) usa como antígeno, o lisado viral do HTLV-1 e proteínas recombinantes do envelope do HTLV-1 e do HTLV-2 (Coelho-dos-Reis et al., 2009; *HTLV-I/II*, 1998). As proteínas utilizadas neste kit estão na forma nativa e inativada, segundo protocolo do fabricante. As proteínas do HTLV usadas no critério de positividade para *western blot* são a gp46, gp21, p24 e p19. Existem, ainda, proteínas recombinantes utilizada pelos kits disponíveis no mercado como a rgp46 e a gd21 que são adicionadas ao testes para aumentar a sensibilidade da técnica e também participam do critério de positividade para infecção pelo HTLV.

O *western blot* também possui a característica de tipagem para HTLV-1 e/ou HTLV-2. As proteínas utilizadas para a tipagem do HTLV são a rgp-46-I (para HTLV-1) e a rgp-46-II (para HTLV-2). A tipagem do HTLV é extremamente importante, uma vez que o HTLV-1 está associado com uma série de entidades clínicas sendo mais patogênico, enquanto que o HTLV-2 não apresenta o mesmo histórico de doenças associadas a sua infecção (*HTLV-I/II*, 1998).

Em bancos de sangue, apenas a triagem sorológica já seria suficiente para descartar a possibilidade de utilização dos hemoderivados com sorologia positiva para HTLV. Os resultados indeterminados podem ser repetidos por PCR ou poderão ser reavaliados posteriormente em um período de 3 a 6 meses, caso o resultado indeterminado persista.

Em relação ao prognóstico de infecção, vários estudos têm revelado que a carga proviral, mais do que para o diagnóstico, estaria associada com o

---

processo de evolução para doença, podendo então, ser utilizada para o acompanhamento de pacientes portadores de HAM/TSP ou ATL (NAGAI *et al.*, 1998; MONTANHEIRO *et al.*, 2005; KUBOTA *et al.*, 1993; KUBOTA *et al.*, 2003).

Montanheiro e colaboradores, em 2005, encontraram diferença estatisticamente significativa na carga proviral de indivíduos infectados pelo HTLV-1, assintomáticos, em relação a pacientes portadores de HAM/TSP. A carga proviral também se correlaciona com outros fatores sabidamente associados como progressão clínica para HAM/TSP, como o percentual de células T citotóxicas (CD8<sup>+</sup>) específicas para HTLV-1 e a produção de citocinas pró-inflamatórias em resposta ao antígeno viral, como IFN $\gamma$  e TNF (ASQUITH e BANGHAM, 2000; KUBOTA *et al.*, 2003).

### ***1.7 Tratamento no âmbito da infecção pelo HTLV-1***

Apesar do grande avanço dos estudos que têm o intuito de entender os mecanismos imunopatogênicos envolvidos em ATL e HAM/TSP, a busca de drogas e medidas terapêuticas para estas manifestações clínicas associadas ao HTLV-1 tem trazido resultados ainda muito incipientes.

Não existe um consenso sobre o tratamento específico para HAM/TSP até o atual momento. A maioria dos tratamentos para HAM/TSP tem sido direcionada no sentido de reduzir o processo inflamatório nos tecidos afetados tanto diretamente, com o uso de corticoterápicos quanto indiretamente com heparina

---

e IFN- $\alpha$  (TAYLOR, 1998). Terapias antiretrovirais já foram igualmente testadas, no entanto, nenhum antiretroviral disponível foi eficaz na redução da carga proviral de pacientes portadores de HAM/TSP (NAKAMURA et al., 2009).

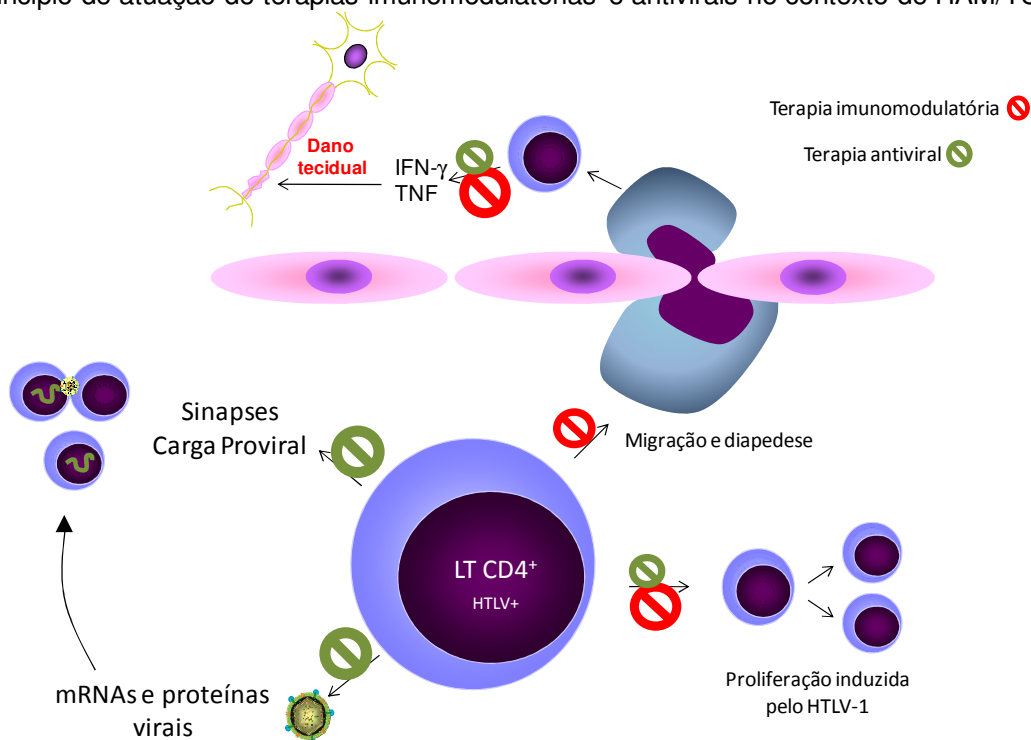
Para ATL, várias abordagens terapêuticas já foram utilizadas ao longo destas duas décadas e meia de descobrimento do HTLV, sem sucesso, como a quimioterapia tradicionalmente utilizada para outros casos de leucemia (utilizando ciclofosfamida, vincristina, adriamicina, prednisona), transplante, análogos de nucleosídeos, inibidores de topoisomerase, interferon- $\alpha$ , bloqueadores de NF- $\kappa$ B, ácido trans-retinóico, anticorpos monoclonais para células malignas e ainda combinações de alguns destas terapias (TAYLOR e MATSUOKA, 2005).

A quimioterapia utilizando ciclofosfamida, vincristina, adriamicina, prednisona e ainda outras drogas é a abordagem terapêutica padrão para o tratamento de pacientes ATL. No entanto, a terapia convencional leva a seleção clonal de células transformadas resistentes ao tratamento e a mediana de sobrevivência de pacientes sob tratamento com quimioterapia constatada por estudos no mundo inteiro varia de 5,5 a 13 meses (TAYLOR e MATSUOKA, 2005; BAZARBACHI e HERMINE, 2001). Esta abordagem, segundo Taylor e Matsuoka, não oferece prospecção de cura para ATL.

### ***1.8 Estudo de drogas antivirais na infecção pelo HTLV-1***

Mesmo após 30 anos da descoberta do HTLV, são escassos os estudos de novas drogas buscando compostos com atividade antiviral para tratamento de manifestações clínicas associadas à infecção pelo HTLV-1. Na maioria dos estudos que existem, não há a avaliação da atividade de compostos com atividade antiviral associada a uma ação antiinflamatória, conforme mostra a figura 8, que seria essencial em casos de HAM/TSP e outras desordens inflamatórias (OH e JACOBSON, 2008; NAKAMURA et al., 2009).

Princípio de atuação de terapias imunomodulatórias e antivirais no contexto de HAM/TSP



*Adaptado de Nakamura et al., 2009*

Figura 8 – Representação esquemática do princípio de atuação de terapia imunomodulatória e antiviral no contexto de HAM/TSP. Linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados e infectados pelo HTLV-1 atravessam a barreira hemato-encefálica e liberam citocinas neurotóxicas, como TNF e IFN- $\gamma$ , que promoverão o dano a mielina. A terapia imunomodulatória ideal atuaria na diminuição da proliferação, migração celular e produção de citocinas. A terapia antiviral ideal atuaria na diminuição das sinapses celulares, da carga proviral, de mRNAs e proteínas virais e, desta forma, inibiria os estímulos que induzem a proliferação celular e a produção de citocinas.

---

No contexto das drogas antiretrovirais, todos os 13 antiretrovirais inibidores de transcriptase reversa disponíveis para tratamento foram modelados especificamente para a transcriptase reversa do HIV (BOYER *et al.*, 2006). Destes antiretrovirais, nenhum é especificamente modelado para a transcriptase reversa do HTLV-1 e poucos foram aplicados em estudos *in vitro* para avaliar a aplicabilidade destes no contexto da infecção pelo HTLV (BALESTRIERI *et al.*, 2008).

Harvey e colaboradores (2009) avaliaram a atividade de GSK983, um composto tetrahydrocarbazole, que apresenta amplo espectro de atividade antiviral. Este composto foi capaz de impedir o crescimento de células infectadas e imortalizadas pelo HTLV-1, dentre outros vírus, em concentrações extremamente baixas, de 10 a 40 nM, via apoptose ou citoestase. A presença de atividade antiviral desta droga em outros vírus indica que provavelmente o seu alvo é algum componente das vias celulares, como a via de interferon, e não dos vírus.

BALESTRIERI e colaboradores em 2008 descreveram a ação antiviral de compostos da família de nucleosídeos fosfonados, 2-oxa-3-aza-nucleosídeo carboxílico fosfonado. Estes compostos foram capazes de inibir a acumulação de mRNA de *pol*, *rex-tax* e *tax* de maneira dose resposta em linhagens celulares permanentemente infectadas pelo HTLV-1. Adicionalmente, estas drogas apresentaram melhores resultados na inibição de crescimento de células infectadas pelo vírus em relação à antiretrovirais consagrados para o

---

tratamento de HIV e alternativos para HTLV-1, como o AZT e o Tenofovir (BALESTRIERI et al., 2005; BALESTRIERI et al., 2008).

Buscando estudar alvos para drogas e antiretrovirais específicas para o HTLV-1 e ainda de alvos vacinais, Schlecht-Louf e colaboradores (2010) delinearum um domínio altamente conservado da proteína Env de retrovírus humanos e murinos que é capaz de induzir uma imunossupressão no hospedeiro e permitir o escape da resposta imune inata (células NK) e da resposta imune adaptativa através do escape de células efetoras que exercem a atividade antiviral (células T CD8<sup>+</sup> ativadas). O estudo com vírus mutados e depletados deste domínio demonstrou que estes vírus não eram capazes de infectar e escapar do sistema imune indicando que este domínio poderia ser um alvo importante na modelagem molecular de drogas antiretrovirais, bem como um alvo vacinal com potencial para futuros estudos (SCHLECHT-LOUF et al., 2010).

Os estudos em drogas naturais com atividade anti-HTLV-1 são ainda mais incipientes, com poucos relatos de atividade significativa e comprovada. Romanos e colaboradores (2002) relataram que extratos de algas marinhas da região costeira do sudeste do Brasil foram capazes de inibir a formação de sincício induzido pelo HTLV-1 em células HeLa após co-cultivo com células infectadas pelo HTLV-1 de linhagem contínua. Os quatro extratos testados apresentaram atividade em baixas concentrações e baixa citotoxicidade para as células testadas, no entanto, esta ação antiviral não pode ser atribuída a



---

uma molécula específica e sim a mistura de compostos presentes no extrato das algas testadas.

Mansouri e colaboradores (2009) realizaram um estudo mais detalhado, demonstrando a atividade anti-HTLV-1 exercido pela proteína PAP (*Pokeweed Antiviral Protein*), uma N-glicosidase derivada da planta *Phytolacca americana* (Erva-de-Laca ou Erva-dos-Cachos-da-Índia) com extenso poder antiviral já descrito, devido a sua potente atividade de depuração.

Neste estudo foi demonstrado que PAP é capaz de inibir a expressão gênica de HTLV-1 em nível transcricional e traducional, através de indução da degradação de mRNAs virais e inibição da tradução de mRNAs de proteínas Gag em células Jurkat transfectadas transientemente com clone proviral do HTLV-1. No entanto, este efeito de PAP foi observado em menor magnitude em células MT-2 que são permanentemente infectadas pelo HTLV-1.

Em 2004, Sonoda e colaboradores realizaram um estudo com extrato de chá verde que foi ministrado a pacientes infectados pelo HTLV-1 assintomáticos, por ingestão diária de cápsulas deste extrato de chá verde por 5 meses. Os pacientes foram acompanhados mensalmente e classificados como de alta e baixa carga proviral. Após o quinto mês, houve uma diminuição estatisticamente significativa da carga proviral de pacientes assintomáticos do grupo de alta carga proviral.

---

Os autores avaliaram igualmente o perfil cromatográfico do extrato de chá verde utilizado neste estudo e verificaram uma alta concentração de **compostos polifenólicos** (SONODA et al, 2004).

Em estudo anterior (LI *et al.*, 2000), foi demonstrado que **compostos polifenólicos** provenientes do extrato de chá verde induziam apoptose de linfócitos T provenientes de pacientes com ATL. Os mecanismos pelos quais estes compostos polifenólicos atuam ainda não foram completamente elucidados, no entanto, permanece a hipótese de uma possível atividade antiviral destes compostos no contexto da infecção pelo HTLV-1.

### **1.9 Compostos Polifenólicos: Quercetina e Kaempherol**

A 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one (quercetina) e 3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one (kaempherol) são compostos polifenólicos classificados no grupo dos flavonóides que têm sido amplamente estudados no intuito de avaliar seu potencial terapêutico em vários processos patológicos como câncer, doenças cardiovasculares, aterosclerose e distúrbios hepáticos (MOREIRA *et al.*, 2004 apud CRESPO *et al.*, 2008).

Estes compostos podem ser encontrados naturalmente em frutas e vegetais, componentes da dieta humana. Os três grupos químicos associados com o seu poder antioxidante são: (1) o grupo catecol, que consiste em duas hidroxilas (OH) na posição *orto* (uma ao lado do outra) ligadas a um anel benzênico; (2) o grupo C=O, que consiste no carbono do anel ligado duplamente ao oxigênio e (3) os grupos hidroxilas (OH) próximos ao grupo C=O (WANG *et al.*, 1999).

---

## Estrutura química dos compostos polifenólicos

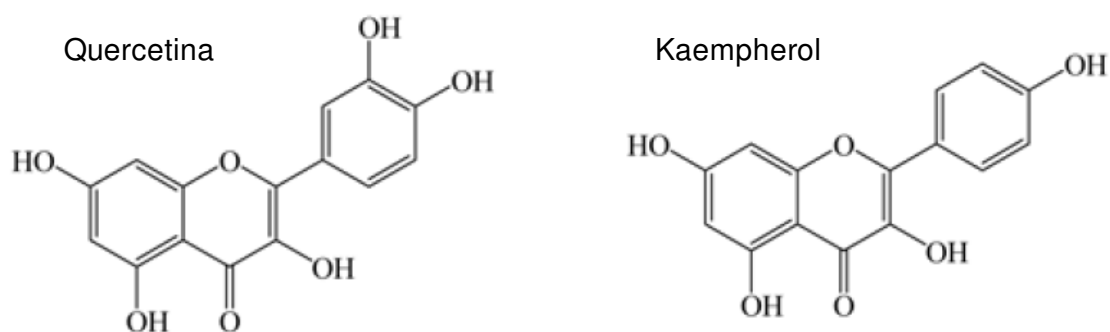


Figura 9 – Estrutura química da quercetina e do kaempferol .

Vários estudos têm verificado as ações terapêuticas dos flavonóides quercetina e kaempferol, que se destacam por seu poder antioxidativo, antiinflamatório, imunomodulatório e, ainda, antiviral.

Um estudo realizado por Oliveira e colaboradores em 1999 buscou avaliar a capacidade antioxidante de diversos compostos polifenólicos flavonóides. Dentre os flavonóides pesquisados, os melhores resultados foram obtidos com a quercetina metilada e a acetilada. Crespo e colaboradores em 2008 observaram que tanto a quercetina quanto o kaempferol atuam na regulação de enzimas antioxidantes como a superóxido desmutase (SOD) que é capaz de catalizar a neutralização do radical superóxido ( $O_2^*$ ) e, igualmente, a catalase e a glutathiona peroxidase que transformam  $H_2O_2$  em  $H_2O$ . A quercetina, em especial, foi capaz de aumentar a expressão de SOD em células hepáticas. O kaempferol e a quercetina foram capazes de diminuir a geração de espécies reativas ao oxigênio e nitrogênio (ROS/RNS) em células hepáticas,

---

demonstrando sua elevada capacidade antioxidante. Este resultado foi corroborado por outros estudos que também confirmaram o potencial antioxidante destes compostos polifenólicos em astrócitos e macrófagos humanos (SHARMA, *et al.*, 2007; HÄMÄLÄINEN *et al.*, 2007; KAWAI, *et al.*, 2008).

Apesar de sua potente atividade antioxidante, ainda não está claro se os flavonóides são absorvidos após a ingestão e distribuídos aos locais do organismo onde são necessitados. A microbiota indígena parece ter participação no metabolismo dos flavonóides, convertendo-os em metabolitos que chegam a circulação sanguínea (KUBO *et al.*, 2006). Segundo Olthof e colaboradores, quercetina geralmente é metabolizada em ácidos fenilacéticos (ácido 3-hidroxifenilacético, ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilacético e ácido 3,4-dihidroxifenilacético) que não apresentam as propriedades antioxidantes que quercetina apresenta. Assim, a ingestão de flavonóides não seria a melhor via de administração.

No entanto, uma vez na corrente sanguínea, quercetina é capaz de exercer sua atividade antioxidante, imunomodulatória e neuroprotetora no cérebro uma vez que este composto e seus conjugados (glicosilado e glucoronizado) apresentam alto índice de hidrofobicidade, ou seja, são extremamente lipofílicos, permitindo a sua passagem pela barreira hemato-encefálica (YOU DIM *et al.*, 2004a, YOU DIM *et al.*, 2004b, DAJAS *et al.*, 2003).

---

Os flavonóides quercetina e kaempherol têm mostrado igualmente atividade como agentes antiinflamatórios atuando na inibição da biossíntese de eicosanóides envolvidos em processos inflamatórios via atividade anti-radicalar e antiperoxidante (LARSON, 1988 apud SHARMA *et al.*, 2007). Min e colaboradores em um estudo atual (2007) verificaram que a ação antiinflamatória da quercetina estaria associada à atenuação de NF- $\kappa$ B e p38 MAPK, moléculas importantes na regulação de expressão de citocinas e conseqüentemente, fundamentais para o processo inflamatório. Neste estudo, foi observado que a quercetina foi capaz de diminuir a expressão de genes de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 em mastócitos humanos. Estes resultados são extremamente relevantes uma vez que TNF- $\alpha$  está comprovadamente associada à imunopatogênese de HAM/TSP (OSAME, 2002) e IL-1 $\beta$ , ao dano neuronal em diversas enfermidades neurológicas (SHARMA, *et al.*, 2007).

Resultados semelhantes aos observados por Min e colaboradores foram confirmados em outros estudos (SHARMA, *et al.*, 2007; HÄMÄLÄINEN *et al.*, 2007). Sharma e colaboradores em 2007 desafiaram astrócitos humanos com IL-1 $\beta$ , no intuito de simular uma lesão neuronal. Ao mesmo tempo, os astrócitos desafiados foram submetidos a tratamento na presença e ausência de flavonóides, dentre eles a quercetina. Os flavonóides foram capazes de modular a resposta imune de astrócitos humanos, diminuindo: a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-8, a expressão de IP-10 (Proteína indutora de interferon) e a expressão de MCP-1 (Proteína quimiotática de monócitos) e RANTES.

---

Assim, foi possível verificar que os flavonóides foram capazes de induzir proteção para o dano neuronal induzido por IL-1 $\beta$  em astrócitos humanos. Hämäläinen e colaboradores, em 2007, verificaram que a quercetina e o kaempferol são os mais potentes compostos polifenólicos do grupo dos flavonóides com atividade antiinflamatória, inibindo em 90% STAT-1, 80% de NF- $\kappa$ B, 89% a produção de óxido nítrico (NO) e acima de 80% de óxido nítrico sintase induzível (iNOS).

Tribolo e colaboradores, em 2007, avaliaram o efeito da quercetina e seus metabólitos na expressão de moléculas de adesão e algumas quimiocinas em células endoteliais vasculares humanas ativadas (HUVEC). A quercetina e seus metabólitos foram capazes de diminuir significativamente a expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 em células HUVEC, que podem estar com a expressão aumentada na superfície celular em processos inflamatórios.

A quimiocina MCP-1 também teve a expressão de seu mensageiro diminuída pela presença de quercetina, indicando que este flavonóide tem o potencial de diminuir o recrutamento de monócitos para o foco inflamatório. Em modelo experimental de asma alérgica murina, a quercetina também demonstrou um potencial na diminuição do recrutamento de eosinófilos e neutrófilos para o foco inflamatório, evidenciando igualmente uma modulação da resposta Th2 através da diminuição de IL-5 e IFN- $\gamma$  (ROGERIO, *et al.*, 2007).

Compostos polifenólicos também têm sido pesquisados no sentido de avaliar sua atividade antiviral. Já se demonstrou atividade antiviral de flavonóides

---

(quercetina e kaempferol) para HHV-1 (*Human herpesvirus 1* – herpes simplex 1) (CHIANG *et al.*, 2003; BRUM, 2006) e HAdV-3 (*Human adenovirus 3*) (CHIANG *et al.*, 2003), para o vírus da cinomose canina (BRUM, 2006) e para o retrovírus HIV-1 (HU *et al.*, 1994). Chiang e colaboradores avaliaram que a ação antiviral da quercetina observada para HHV-1 e HAdV-3 era direcionada para as fases precoces da infecção por estes vírus. Estudos de modelagem molecular, utilizando a relação estrutura/atividade de compostos polifenólicos já demonstraram que estes compostos apresentam potencial atividade na inibição da integrase do HIV-1 (LAMEIRA, *et al.*, 2006).

Considerando os diversos efeitos principalmente antiinflamatórios e antioxidantes da quercetina e kaempferol, vários estudos têm demonstrado o papel neuroprotetor da quercetina em especial (DAJAS, *et al.*, 2003-A; DAJAS, *et al.*, 2003-B; HA, *et al.*, 2003; WANG & JOSEPH, 1999; BRUM, 2006; SHARMA, *et al.*, 2007).

Dajas e colaboradores, em 2003 (A), revisaram o papel da quercetina e seu efeito de neuroproteção. Foi demonstrado que vários mecanismos de ação estão envolvidos na proteção contra danos neuronais, os quais confluem para a inibição da peroxidação lipídica exercida pela quercetina. Na figura 10, é possível visualizar os efeitos até então conhecidos da quercetina em algumas vias que levarão a peroxidação de fosfolípidos de membrana e conseqüente rompimento de células com dano do tecido neuronal (DAJAS *et al.*, 2003a).

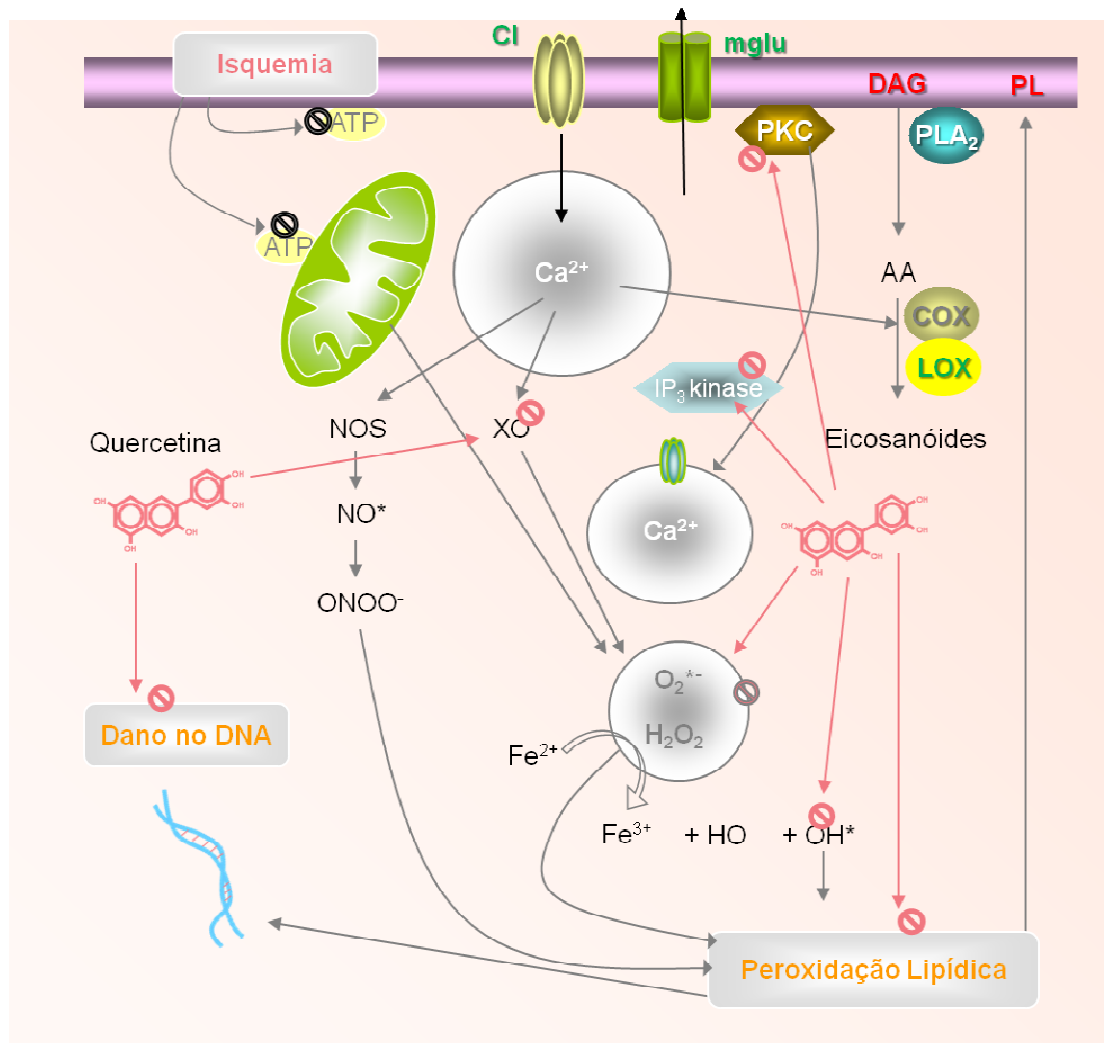


Figura 10 – Representação esquemática de um processo isquêmico representando o dano neuronal no nível celular e a atuação de quercetina para converter este processo. A falha inicial que ocorre no metabolismo mitocondrial (ATP) leva a desregulação do funcionamento das bombas iônicas na membrana plasmática e uma liberação massiva de glutamato e consequentemente aumentando a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Ocorre então uma ativação das enzimas XO, NOS, COX, LOX. Espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (ROS/RNS) são produzidas em larga escala como  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{NO}^{\bullet}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  levando a peroxidação lipídica e ao dano ao DNA nuclear. Flavonóides atuam na inibição de várias vias deste processo como demonstrado em vermelho na figura (XO,  $\text{IP}_3$  kinase, LOX, COX, PKC, radicais *scavengers* e consequentemente na peroxidação lipídica). AA = ácido araquidônico; COX = ciclooxigenase; DAG = diacylglycerol;  $\text{IP}_3$  kinase = fosfatidilinositol-3 kinase; LOX = lipoxigenase; mglu = receptores metabotrópicos de glutamato; NO = óxido nítrico; NOS = óxido nítrico sintase; PKC = proteína kinase C; PL = fosfolípides;  $\text{PLA}_2$  = fosfolipase A<sub>2</sub>; XO = xantina oxidase; Cl = canal iônico.



---

No contexto da infecção pelo HTLV-1, apenas o estudo de Sonoda e colaboradores, em 2004, avaliaram o efeito de compostos polifenólicos (*in vivo*) na carga proviral de indivíduos infectados pelo vírus. É necessário lembrar que a carga proviral é mantida ou aumentada parcialmente pela proliferação de células infectadas pelo HTLV-1, bem como por sinapses celulares na qual o vírus passa via receptor GLUT-1 de uma célula infectada para uma célula não infectada. A atuação dos compostos polifenólicos, portanto, pode estar relacionada com uma possível atividade antiviral direta como a inibição de proteínas virais, mas igualmente na imunomodulação do sistema imune que regula a proliferação celular e, conseqüentemente, a carga proviral dos indivíduos infectados pelo HTLV-1.

No entanto, estes compostos estavam acompanhados de outras moléculas que compunham o extrato de chá verde ministrado aos pacientes, impossibilitando a atribuição da atividade moduladora da carga proviral destes pacientes a estes compostos. Faz-se necessário, desta forma, a realização de estudos com compostos polifenólicos isolados e purificados para verificar a real contribuição destes compostos no contexto da infecção pelo HTLV-1.

Considerando estes achados, no presente estudo foi avaliado o potencial antiviral e antiinflamatório (imunomodulatório) dos compostos polifenólicos quercetina e kaempferol na infecção pelo HTLV-1.

---

*"When choosing between two dilemma,  
I always like to try the one I've never tried before."  
Mae West (1892-1980)*

***Justificativa***

---

## 2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, a infecção pelo HTLV-1 (*Human T-lymphotropic virus 1*) atinge milhões de pessoas em todo o mundo, sendo o Brasil um dos países mais acometidos por casos de infecção pelo vírus. A grande maioria dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 pode permanecer assintomática por toda a vida. Já uma parcela destes indivíduos pode desenvolver doença de natureza neoplásica, a Leucemia/Linfoma de células T do Adulto (ATL), ou ainda, pode desenvolver doença de natureza degenerativa inflamatória, a Mielopatia Associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP). Apesar de uma pequena parcela dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentarem manifestações clínicas características de ATL ou HAM/TSP, ambas apresentam morbidade inquestionável, tendo a primeira uma expectativa de vida muito baixa para o paciente com o quadro instalado e a segunda, seqüelas graves. A HAM/TSP apresenta algumas características iniciais que podem permanecer por longo tempo, como distúrbios sensoriais, disfunção esfinteriana, “fraqueza”, inflexibilidade, dor lombar, impotência sexual e principalmente manifestações neuronais e motoras, como hiper e hiporreflexias além de paraparesia espástica, com conseqüente comprometimento ou perda de movimento dos membros inferiores (Osame,1986). Depois do estabelecimento de HAM/TSP, a estimativa é que 50% dos indivíduos serão dependentes de cadeiras de rodas (TAYLOR, 1998), o que caracteriza esta doença como de alta gravidade.

---

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, faz-se necessário buscar respostas para os questionamentos atuais sobre os mecanismos imunopatogênicos envolvidos no processo de cronificação e evolução clínica da infecção pelo HTLV-1. Especialmente é imprescindível o estudo de drogas que possam atuar em tratamentos eficazes para HAM/TSP que tenham atuação tanto antiviral quanto antiinflamatória, bem como neuroprotetora.

Contrastando com a gravidade desta doença, há uma escassez marcante de estudo com o objetivo de avaliar novas abordagens terapêuticas anti-HTLV-1, sendo estudos clínicos de teste de drogas ainda incipientes. Os poucos testes clínicos desenvolvidos recentemente não têm revelado resultados esperançosos para uma terapia anti-HTLV-1. Assim, entre os grandes desafios encontrados pelos pesquisadores envolvidos na pesquisa do HTLV-1, destaca-se a busca por tratamentos eficazes para o acompanhamento clínico de pacientes infectados pelo HTLV-1 portadores de enfermidade, uma vez que a intervenção terapêutica em estágios recentes de manifestação clínica pode ser crucial para sua qualidade de vida e sobrevivência destes pacientes.

Adicionalmente, estudos sobre os mecanismos imunopatogênicos envolvidos no processo de tratamento de HAM/TSP não estão elucidados com detalhe. Alguns estudos têm relatado a eficácia terapêutica de compostos polifenólicos no tratamento de doenças com envolvimento inflamatório, auto-imune e ainda com dano neuronal. O estudo de flavonóides como o kaempferol e a

---

quercetina tem demonstrado que estes compostos polifenólicos apresentam atividade antiinflamatória, antiviral, antioxidante e ainda, neuroprotetora. No entanto, são escassas e incipientes as informações sobre a atividade anti-HTLV-1 destes compostos. Um dos únicos trabalhos desenvolvidos até o momento com polifenólicos e HTLV-1 verificou o efeito da ingestão diária de cápsulas de chá verde na carga proviral de indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos apresentando diferentes magnitudes de carga proviral. Neste estudo, pacientes assintomáticos apresentando elevada carga de DNA proviral apresentaram uma diminuição de sua carga proviral após o quinto mês de ingestão do extrato de chá verde.

No intuito de responder a diversos questionamentos que surgem acerca da infecção pelo vírus, em especial o HTLV-1, o GIPH vem desenvolvendo vários estudos multidisciplinares. No presente estudo, foi avaliada a atividade antiviral e antiinflamatória dos compostos polifenólicos quercetina e kaempherol em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes infectados pelo HTLV-1 assintomáticos e com HAM/TSP e ainda a sua atividade antiviral em células permanentemente infectadas pelo HTLV-1, a linhagem celular MT-2.

---

*"A pessimist sees the difficulty in every opportunity;  
an optimist sees the opportunity in every difficulty."  
**Sir Winston Churchill (1874-1965)***

## ***Objetivos***

---

## **3 OBJETIVOS**

### ***3.1 Objetivo Geral***

Avaliar a atividade antiviral e imunomodulatória dos compostos polifenólicos quercetina e kaempherol no contexto da infecção pelo HTLV-1.

### ***3.2 Objetivos Específicos***

3.2.1 Avaliar a viabilidade de células mononucleares do sangue circulantes (PBMC), células MT-2 e células THP-1, na presença dos compostos polifenólicos quercetina e kaempherol, para avaliar a citotoxicidade destes compostos.

3.2.2 Avaliar a acumulação de mRNAs virais e a expressão de proteínas virais em células MT-2, permanentemente infectadas pelo HTLV-1 na presença dos compostos polifenólicos quercetina e kaempherol, no intuito de verificar sua atividade antiviral.

3.2.3 Avaliar o perfil da superfície de células MT-2 na presença de quercetina e kaempherol utilizando Microscopia de Força Atômica, no intuito de buscar alterações promovidas pelas drogas, incluindo o brotamento de partículas virais.

---

3.2.4 Avaliar o impacto da quercetina na produção de citocinas e na proliferação de PBMC e células THP-1 estimuladas, para avaliar o potencial imunomodulatório deste composto.



---

*"Make everything as simple as possible,  
but not simpler."  
Albert Einstein (1879-1955)*

## ***Material e Métodos***

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Estratégia Metodológica

Estratégia metodológica utilizada para atingir os quatro objetivos propostos neste trabalho

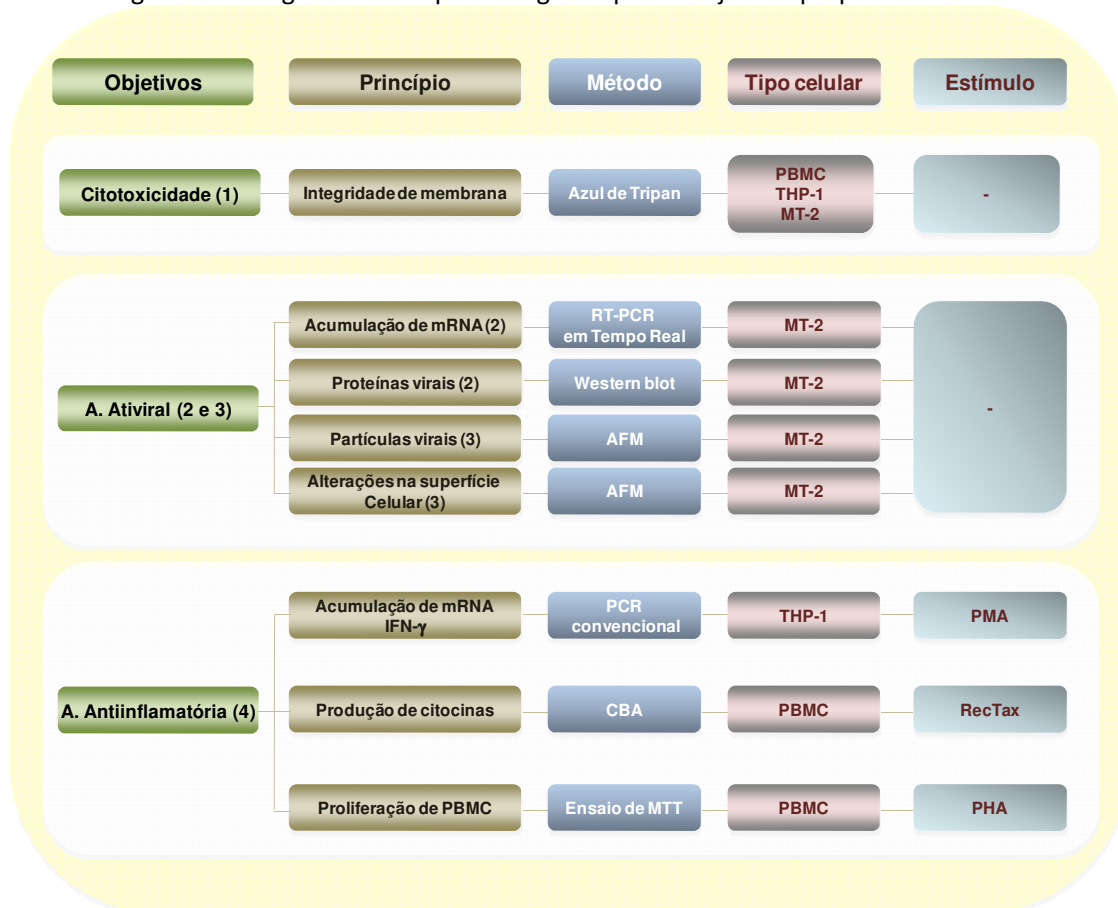


Figura 11 – Representação esquemática da estratégia metodológica para o desenvolvimento dos 4 objetivos específicos desta tese de doutorado. Para alcançar o objetivo específico 1, a citotoxicidade dos compostos polifenólicos quercetina e kaempherol foi avaliada através da verificação de integridade de membrana pelo método de azul de trypan. Para alcançar o objetivo específico 2, foi avaliada a acumulação de mRNAs e proteínas virais em células MT-2 tratada com quercetina e kaempherol por PCR em tempo real e western blot, respectivamente. Para atingir o objetivo específico 3, foi avaliada a presença de partículas virais em brotamento e alterações na superfície de células MT-2 tratada com quercetina e kaempherol por Microscopia de Força Atômica (AFM). Para atingir o quarto e último objetivo específico, foi avaliada a acumulação de mRNA de IFN- $\gamma$  por PCR convencional em THP-1 estimuladas com

---

PMA, a produção de citocinas por Cytometric Bead Array (CBA) em PBMC estimulados com RecTax e a proliferação celular pelo ensaio de MTT em PBMC estimulados com PHA.

## **4.2 Reagentes**

### *4.2.1 Quercetina e Kaempherol*

Para a avaliação da atividade de quercetina e kaempherol (Sigma-Aldrich, S.L., Missouri, USA), estas drogas foram diluídas em dimetil sulfóxido (DMSO – Merck, Alemanha) em solução estoque de 100mM, alíquotadas em volumes de 50 µL cada alíquota e mantidas a -20°C. No momento da incubação com os três tipos celulares aqui testados (ver item 4.3), uma alíquota da solução estoque de quercetina e kaempherol (100mM) foram diluídas em RPMI e empregadas nas concentrações propostas (0,001 – 100 µM). A concentração de DMSO nas culturas não ultrapassou a 0,05%, o que é considerado como não tóxico para cultura de células humanas.

### *4.2.2 Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) - Estimulação inespecífica do sistema imune*

Para a avaliação da atividade imunomodulatória de quercetina, especificamente na acumulação de mRNA codificador de IFN- $\gamma$  em células THP-1 (ver item 4.4 e 4.6.3), foi utilizado um estímulo inespecífico do sistema imune capaz de induzir IFN- $\gamma$ , o forbol-12-miristato-13-acetato (PMA). O PMA (Sigma-Aldrich, S.L., Missouri, USA) foi diluído em solução salina fosfatada

---

(PBS), solução estoque de 1 µg/mL e mantidas a -20°C. No momento do uso, PMA foi diluído em RPMI e empregado na concentração de 10 ng/ml de cultura de células THP-1.

#### *4.2.3 RecTax – Estimulação específica do HTLV-1*

Para verificar a produção de citocinas IFN-γ, TNF, IL-10, IL-5, IL-4 e IL-2 (ver item 3.8) frente à estimulação específica do HTLV-1, foi utilizado um antígeno recombinante da proteína Tax produzido em nosso laboratório por Martins e colaboradores (2008). Este antígeno recombinante é resultado da clonagem da porção C-terminal da proteína Tax do HTLV-1 (sequência de aminoácidos de 240 to 350) que foi expressa em vetor pQE32-His (Qiagen, Alemanha) em *E. coli* M15. O produto da expressão foi fracionado por cromatografia em coluna de quelato de níquel (Qiagen, Alemanha) e posteriormente foi confirmada a presença da proteína denominada RecTax (14 KDa.) por western blot. RecTax foi mantida a – 20°C em solução estoque à 844ng/mL. No momento do uso, alíquotas da proteína foram descongeladas em gelo e diluídas em RPMI a 250 ng/ml na cultura de PBMC na hora da incubação.

#### *4.2.4 Fitohemaglutinina (PHA)*

Para a indução da proliferação celular, foi utilizada a Fitohemaglutinina (PHA), um conhecido indutor de proliferação celular. O PHA (Sigma-Aldrich, S.L., Missouri, USA) foi diluído em solução salina fosfatada (PBS) e mantido a –

20°C em solução estoque à 1,25mg/mL. Para a realização dos experimentos, o PHA foi empregado na concentração de 2,5µg/ml na cultura de PBMC em meio RPMI.

### 4.3 Tipos celulares

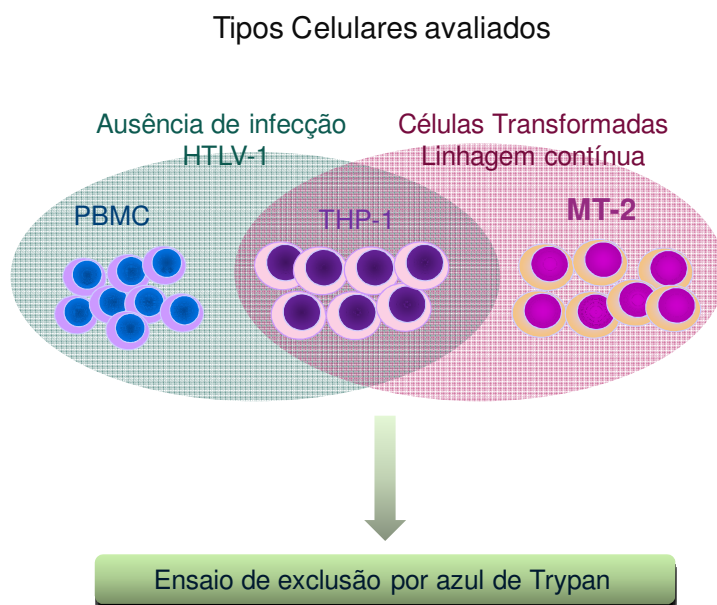


Figura 12 – Representação esquemática dos tipos celulares estudados neste trabalho para o ensaio de viabilidade pelo método de azul de trypan. O foco deste trabalho são células MT-2, que se apresentam permanentemente infectadas pelo HTLV-1 de linhagem contínua. As células THP-1 são células que tem como origem a linhagem monocítica/macrofágica e não são infectadas ou transformadas pelo HTLV-1. Estas células foram utilizadas como controle de viabilidade para células de linhagem contínua. Células mononucleares do sangue circulantes (PBMC) de indivíduos não infectados também foram incluídas para avaliar a citotoxicidade das drogas em células não-transformadas e não infectadas.

#### 4.3.1 MT-2 e THP-1

---

A linhagem celular MT-2 é composta por uma população de linfócitos derivada de células linfloblastóides de cordão umbilical co-cultivadas com células leucêmicas provenientes de um indivíduo infectado pelo HTLV-1 portador de ATL (ROMANOS et al., 2002, MIYOSHI et al., 1981). A linhagem celular THP-1 é uma linhagem monocítica humana derivada de neoplasia sanguínea (ATCC). A manutenção das células MT-2 e THP-1 foi feita por repiques semanais. Ambas as linhagens crescem em suspensão.

De forma resumida, as células foram semeadas em frascos de cultura de tecido de 75cm<sup>2</sup>, com meio RPMI contendo 20% de Soro Fetal Bovino (SFB), 50 µg/ml de gentamicina, 100 UI/ml de penicilina e 0,5 µg/ml de anfotericina B para MT-2 e RPMI contendo 10% SFB, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de streptomina e 0,5 µg/ml de anfotericina B para THP-1. As células foram mantidas em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de umidade por 72h para favorecer a sua multiplicação. Após o tempo de 72 horas, a suspensão celular foi homogeneizada para a eliminação dos grumos e centrifugada por 10 minutos. As células foram empregadas na concentração de 1 x 10<sup>6</sup> células/ml para a realização dos experimentos com as drogas.

#### *4.3.3 Critérios de inclusão e classificação de indivíduos para a obtenção de amostras de sangue*

Foram empregadas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos que foram submetidos à avaliação clínico-laboratorial 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 apresentaram sorologia positiva para qualquer dos itens citados, com exceção do HTLV-1, bem como mulheres grávidas e indivíduos utilizando cortico-terápicos não foram incluídos no estudo. Os indivíduos que foram classificados como infectados pelo HTLV-1 foram submetidos a uma avaliação clínica na fundação HEMOMINAS sendo posteriormente classificados como Assintomáticos (n=3) ou como portadores de HAM/TSP (n=3) (figura 13). Os indivíduos que apresentaram sorologia negativa para todos os patógenos acima na triagem realizada na Fundação HEMOMINAS foram classificados como não infectados e representam o grupo controle para os ensaios de avaliação de proliferação celular (n=4) (figura 13). O PBMC de outros dois indivíduos soronegativos para o HTLV-1 foram também avaliados neste estudo para análise do perfil de citocinas após a estimulação com RecTax e quercetina (ver item 4.8.1).

#### Pacientes avaliados no ensaio de proliferação induzida por PHA

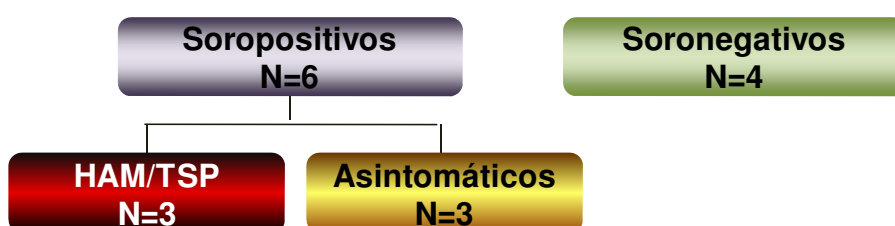


Figura 13 – Fluxograma dos indivíduos avaliados pelo ensaio de proliferação celular induzido pelo PHA (ver item 3.9). Os indivíduos soropositivos para HTLV-1 foram submetidos a uma avaliação clínica na fundação HEMOMINAS sendo posteriormente classificados como Assintomáticos (n=3) ou como portadores de HAM/TSP (n=3). Os indivíduos que apresentaram sorologia negativa para todos os patógenos testados na triagem realizada na Fundação HEMOMINAS foram classificados como não infectados (n=4).

---

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais e da Fundação HEMOMINAS (anexo 7.3). Todos os indivíduos que preencheram os critérios acima foram convidados para participar desta pesquisa, assinando necessariamente o Termo de Consentimento Livre Esclarecido – TCLE (anexo 7.2). Os indivíduos que assinaram o TCLE ficam livres para retirar sua participação da pesquisa a qualquer momento do desenvolvimento do trabalho.

#### *4.3.4 Obtenção de Células Mononucleares Circulantes do Sangue (PBMC).*

A partir de 5ml de sangue total dos participantes do estudo, a separação de linfócitos foi feita através do gradiente de Ficoll-Paque® (Pharmacia Biotech). Brevemente, o sangue foi coletado em heparina e após a separação do plasma por centrifugação, ao restante, foi acrescentado volume suficiente de RPMI para completar o volume para 6 ml. Este sangue foi então adicionado a um tubo contendo 6 ml de Ficoll-Paque®, e centrifugado à 3000 rpm por 30 minutos à temperatura ambiente.

Após a separação das fases pelo gradiente de Ficoll-Paque®, a fase correspondendo ao PBMC foi aspirada por pipeta *Pasteur* e transferida para outro tubo limpo. Para a lavagem, foi acrescentado RPMI numa quantidade igual a três vezes do volume de PBMC obtido. O PBMC foi homogeneizado nessa solução e, então, nova centrifugação foi feita para a sedimentação das células.



---

#### **4.5 Avaliação da viabilidade celular - Ensaio de Trypan Blue**

Cada poço de uma placa de 96 poços foi semeado com 200.000 células (THP-1, MT-2 e PBMC) em 100µL de meio RPMI a 10% de SFB suplementado com 2 mM de L-Glutamina, 50 µg/mL de gentamicina, 100 UI/mL de penicilina e 0,5 µg/ml de anfotericina B para MT-2 e meio RPMI a 10% de SFB suplementado com 2 mM de L-Glutamina adicionado de 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de streptomina e 0,5 µg/mL de anfotericina B para THP-1 e PBMC. As células foram colocadas na presença e na ausência (controle) dos compostos polifenólicos quercetina e kaempferol na concentração final de (0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0; 50,0; 100,0 µM). A placa foi mantida por 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C.

Após 24 horas de cultivo, as células foram diluídas em reagente de *Trypan* a 0,2% na proporção de 1:10. As células não coradas de azul foram contadas como viáveis para as diferentes amostras testadas utilizando câmara de Neubauer. Os resultados foram expressos em percentual de viabilidade em relação ao controle sem drogas.

#### **4.6 Avaliação de mRNAs virais e humanos**

##### **4.6.1 Cultura de MT-2 na presença das drogas**

---

Células MT-2 (1.000.000 células) foram incubadas em meio RPMI a 10% de SFB suplementado com 2 mM de L-Glutamina, 50 µg/ml de gentamicina, 100 UI/ml de penicilina e 0,5 µg/ml de anfotericina B em poços de placa com 24 poços na presença e na ausência (controle) dos compostos polifenólicos quercetina e kaempferol na concentração final de (0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0; 50,0; 100,0 µM). A placa foi mantida por 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C. Após o período de incubação, foi feita a extração de macromoléculas: RNA total para a avaliação de acumulação de mRNAs virais (item 3.6.2 e 3.6.3) e proteína total para avaliação da reatividade de proteínas virais por western blot (item 4.7).

Para a extração, as células foram lavadas duas vezes em PBS 1X com o uso de centrifugação (800 X g, 10 minutos a 4°C) e descarte do sobrenadante. Após a última lavagem o sedimento foi ressuscitado em reagente Trizol (Invitrogen, Auckland, Nova Zelândia), seguindo-se rigorosamente o protocolo fornecido nas instruções do fabricante para extração de RNA e proteínas.

#### *4.6.2 Cultura de THP-1 na presença das drogas e PMA*

Células THP-1 (1.000.000 células) foram incubadas em meio RPMI a 10% de SFB suplementado com 2 mM de L-Glutamina adicionado de 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de streptomomicina e 0,5 µg/mL de anfotericina B em poços de 24 poços na presença e na ausência (controle) de PMA a uma concentração final de 10 ng/mL no poço. Após 4 horas de incubação em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C, o sobrenadante foi retirado e as células foram novamente incubadas

---

em meio RPMI suplementado na presença e na ausência (controle) de quercetina na concentração final de (0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0; 50,0; 100,0  $\mu$ M). A placa foi mantida por 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C. Após o período de incubação, foi feita a extração de macromoléculas: RNA total para a avaliação de acumulação de mRNA codificador de IFN- $\gamma$ . A extração foi feita conforme descrito para células MT-2.

#### *4.6.3 Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase*

As amostras de RNA de MT-2 e THP-1 ( $1,0 \times 10^6$  células) foram extraídas com reagente de Trizol (Invitrogen, Auckland, New Zealand) conforme o protocolo do fabricante. RNA total de MT-2 e THP-1 foi utilizado como molde para a produção de cDNA das amostras tratadas com as diferentes concentrações de flavonóides. O RNA (5 $\mu$ L) foi incubado com o iniciador Oligo-DT15 (Promega, WI, USA) a 70°C por 10 minutos e, logo em seguida, incubado em gelo por 5 minutos. Subsequentemente, foi adicionado às amostras água livre de nuclease (tratada com Dimetil pirocarbonato), MgCl<sub>2</sub> 2,5mM, dNTP's 1 mM, inibidor de RNase 20UI, Transcriptase Reversa e tampão InProm-II (Promega, WI, USA), sendo as amostras incubadas em Termociclador (PTC-100<sup>TM</sup> - MJ Research, Inc) de acordo com o programa a seguir: 5 minutos à 25°C, 60 minutos à 42°C, 15 minutos à 70°C. O cDNA foi armazenado à 4°C até o momento do uso.

---

#### 4.6.3 PCR em tempo real para avaliação da acumulação de mRNA de *gag-pol* e *tax-rex*.

Para a avaliação dos mRNAs virais, foi feita a avaliação de mRNA de *gag-pol* e *tax-rex* conforme descrito por Li e Green (2007). O cDNA das amostras de MT-2 foram amplificados utilizando iniciadores específicos para a amplificação dos genes virais *gag-pol* e *tax-rex* por PCR em tempo real. O cDNA (200 ng) de cada amostra foi adicionado de uma mistura para a reação de PCR em tempo real, o POWER SYBR GREEN PCR MASTER MIX (Applied Biosystems, USA) e os iniciadores (5pM): *gag-pol* 5' – GAG GGA GGA GCA AAG GTA CTG -3' e 5' – AGC CCC CAG TTC ATG CAG ACC – 3'; *tax-rex* 5' – ACC AAC ACC ATG GCC CA - 3' e 5' – GAG TCG AGG GAT AAG GAA C - 3'; *gapdh* 5' – ACG ACC AAA TCC GTT GAC TC - 3' e 5'- ACA GTC AGC CGC ATC TTC TT - 3'. A PCR em tempo real foi realizada utilizando o aparelho APPLIED – BYOSISTENS, 7300 Real Time PCR System (Fundação HEMOMINAS), com as seguintes condições: 50° C por dois minutos, 95° C por 5 minutos, seguido de 45 ciclos de 95° C por 30 segundos, 57° C por 30 segundos e 72° C por 45 segundos.

Após análise dos dados, os valores relativos ao controle de DMSO de acumulação de mRNA virais para cada amostra foram obtidos. O valor relativo obtido para cada amostra foi dividido pelo valor de GAPDH (normalizador) de cada amostra.

---

#### 4.6.4 PCR convencional para avaliação da acumulação de mRNA de $\beta$ -actina e *inf- $\gamma$* .

Para os genes humanos  $\beta$ -actina e *inf- $\gamma$* , 2 $\mu$ l do cDNA obtido de THP-1 e MT-2 (só  $\beta$ -actina) foi adicionado de uma mistura para a reação de PCR composta por água livre de nuclease, 2,0mM de MgCl<sub>2</sub> para *inf- $\gamma$*  e 3,5mM de MgCl<sub>2</sub> para  $\beta$ -actina, 1mM de dNTP (Promega, WI, USA), 2UI deTaq polimerase, tampão 1x de Taq polimerase e os iniciadores para  $\beta$ -actina: ACT A(5' – TCA CCC AGA GTG TGC CCA TCT ACG A - 3') and ACT B(5' – CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G - 3'); e para a reação de *inf- $\gamma$* : IFN A (5'- AGT TAT ATC TTG GCT TTT CA- 3') and IFN B (5'- AAG CTG ACT AAT TAT TCG GT- 3'). A mistura da reação para *inf- $\gamma$*  foi incubada em termociclador (PTC-100<sup>TM</sup> - MJ Research,Inc) de acordo com o programa a seguir: 3 minutos à 95°C, 35 ciclos de 60 segundos à 95°C, 60 segundos à 45°C, 60 segundos à 72°C e um passo final de extensão de 10 minutos à 72°C. Para  $\beta$ -actina o mesmo termociclador foi utilizado de acordo com o seguinte programa: 5 minutos à 95°C, 25 ciclos de 30 segundos à 95°C, 30 segundos à 60°C, 30 segundos à 72°C e um passo final de extensão de 7 minutos à 72°C.

O gene codificador da  $\beta$ -actina humana foi aqui utilizado como normalizador para a avaliação da acumulação de mRNA humano e virais. O produto da PCR foi armazenado à 4°C e avaliado em gel de agarose (1,2%) seguida da coloração por brometo de etídeo. A densitometria das bandas capturadas em sistema fotográfico foi feita utilizando o programa *Imagequant* versão 3.0. O

---

valor de intensidade de banda obtido para inf- $\gamma$  para cada amostra foi dividido pelo valor de  $\beta$ -actina desta mesma amostra.

#### ***4.7 Ensaio de Western para a avaliação da expressão de proteínas virais na presença de diferentes concentrações de quercetina e kaempferol.***

##### *4.7.1 Fracionamento eletroforético e transferência das proteínas.*

Células MT-2, após incubação com diferentes concentrações de quercetina e kaempferol, foram coletadas e processadas para a obtenção de proteínas totais, conforme descrito no item 4.6.1.

Cerca de 20 $\mu$ g de proteínas totais de cada amostra foram fracionados em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% a 100V por 1,5h e transferidos para membrana de nitrocelulose, conforme protocolo de “*Kit Bio-Rad transferency*” (Bio-Rad laboratories, USA). Foi igualmente aplicado no SDS-PAGE, um padrão de massa molecular para a identificação das proteínas (*Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers*, Amershan, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Após a transferência, as membranas foram bloqueadas por 18 a 20 horas a 4°C, utilizando TBS 1X contendo 5% de leite em pó desnatado.

---

#### *4.7.2 Reação com anticorpos e revelação.*

Para a reação com anticorpos primários, as membranas foram primeiramente lavadas três vezes em TBS 1X contendo 0,05% de Tween-20 (solução TBS/Tween). As incubações com o anticorpo anti-antígenos do HTLV-1 foi feita com o uso de uma mistura de soros de indivíduos soropositivos para HTLV-1 conhecidamente reatores no ensaio de western blot aqui utilizado. Esta mistura de soros foi diluída à 1:200 de acordo com padronização prévia e incubada por 12 a 14 horas a 4°C. Após a incubação, as membranas foram incubadas com anticorpos anti-IgG anti-humano conjugado com fosfatase alcalina diluído à 1:30.000 (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram reveladas com substrato para fosfatase alcalina (Promega, Wisconsin, USA) por no máximo 30 minutos. A densitometria foi realizada utilizando o programa *ImageQuant* versão 3.0.

#### **4.8 Microscopia de Força Atômica**

##### *4.8.1 Cultura de MT-2 na presença de quercetina e kaempferol e preparação de lâminas para Microscopia de Força Atômica.*

Células MT-2 (1.000.000 células) foram incubadas em meio RPMI a 10% de SFB suplementado com 2 mM de L-Glutamina, 50 µg/ml de gentamicina, 100 UI/ml de penicilina e 0,5 µg/ml de anfotericina B em poços de placa com 24 poços na presença e na ausência (controle) dos compostos polifenólicos

---

quercetina e kaempferol na concentração final de 100,0  $\mu$ M. A placa foi mantida por 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C.

Após o período de incubação, as células foram homogeneizadas dentro do poço e transferidas para um aparato de citospin. Lâminas redondas de 13 mm de diâmetro (Marca) foram exaustivamente lavadas e tratadas com poli-L-Lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e deixadas para secar sobre fluxo laminar. O aparato de citospin foi preparado com estas lâminas antes da transferência das células MT-2 para o aparato. As células foram centrifugadas sobre a lâmina (1000 X g, 15 minutos, 18°C) e posteriormente foram desidratadas com concentrações sucessivas de etanol (30, 50 e 70%). As células foram fixadas com metanol 100% a 4°C e deixadas para secar sobre fluxo laminar.

#### *4.8.2 Análise de Imagens obtidas por Microscopia de Força Atômica.*

As imagens foram realizadas utilizando-se a técnica de Microscopia de Força Atômica, operando o equipamento Nanoscope IIIa AFM (Veeco) no modo de contato intermitente (tapping mode) e imagiamento de fase (figura 14). Foram utilizadas sondas de silício comerciais (Nanosensors<sup>TM</sup>, Schaffhausen, Suíça), com raio de curvatura nominal de 10nm.



## Estratégias de obtenção da imagem na Microscopia de Força Atômica

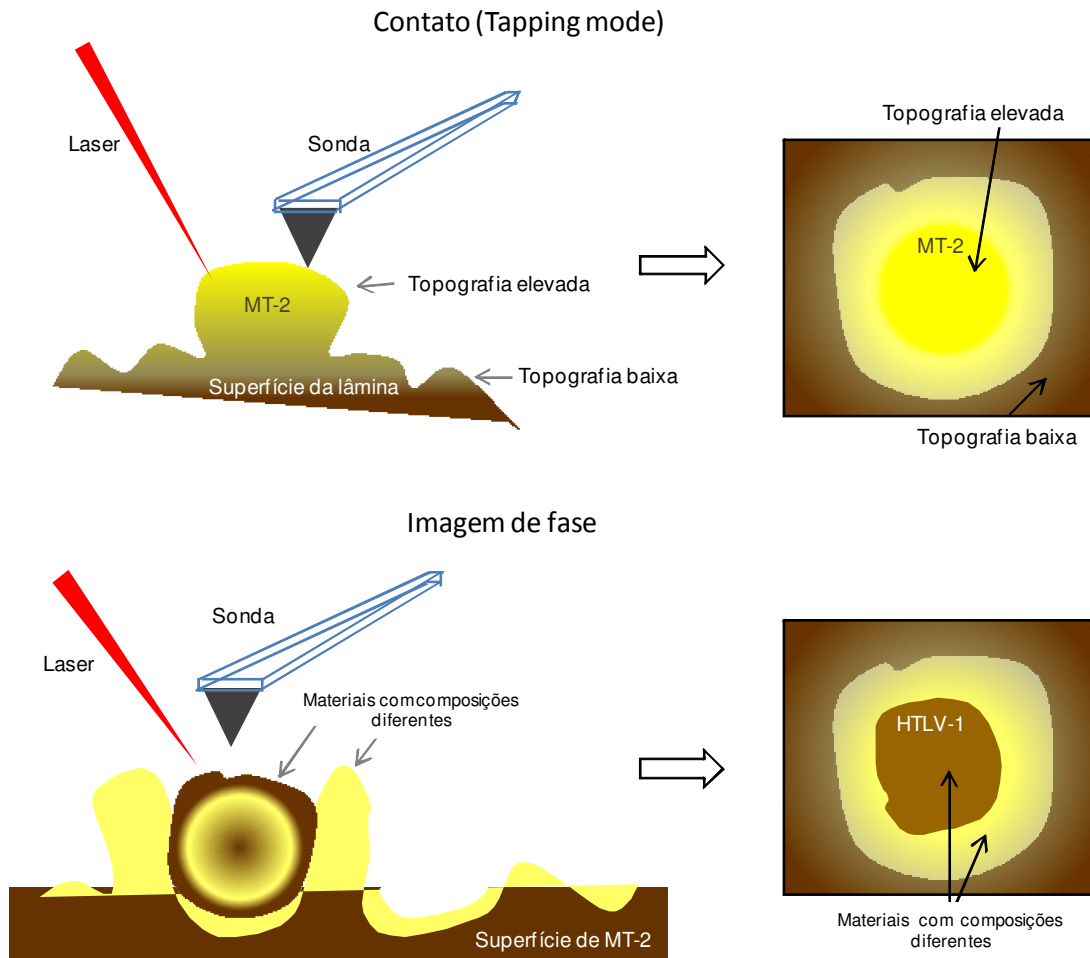


Figura 14 – Estratégia de formação de imagem por microscopia de força atômica. O modo de contato (tapping mode) avalia a topografia da amostra através de oscilações da sonda longitudinalmente, dando origem a imagem de altura, que representa diferentes desníveis na superfície da amostra. A imagem de fase representa as diferentes composições de materiais presentes na amostra que são avaliadas pelo contato da sonda. São avaliadas a dureza, adesão, fricção e viscoelasticidade, que em conjunto, são representadas na figura com cores distintas (HONG-QIANG LI, 1997).

---

## **4.9 Avaliação da produção de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10**

### **4.9.1 Cultura de PBMC na presença de RecTax e quercetina**

Após a obtenção do PBMC conforme descrito nos itens 4.3.3 e 4.3.4, células (200.000) provenientes de dois indivíduos soronegativos foram incubadas em meio RPMI a 10% de SFB suplementado com 2 mM de L-Glutamina adicionado de 100 UI/mL de penicilina, 100  $\mu$ g/mL de streptomina e 0,5  $\mu$ g/mL de anfotericina B em poços de placa de 96 poços na presença de RecTax a uma concentração final no poço de 250 ng/mL. Concomitantemente, quercetina foi incubada com PBMC na concentração final de 100  $\mu$ M no poço. Controles na ausência de RecTax e quercetina foram igualmente avaliados para comparação na presença de ambos os estímulos. Após 24 horas de incubação a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>, as células foram avaliadas em sua viabilidade pelo ensaio de azul de trypan (ver item 4.5) e o sobrenadante foi coletado para a avaliação das citocinas por CBA.

### **4.9.2 Cytometric Bead Array - CBA**

Para avaliar as citocinas - IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-4, IL-5 e IL-2 – no sobrenadante de PBMC cultivado na presença de RecTax (250 ng/ $\mu$ L) e quercetina (100  $\mu$ M), o kit “*human Th1/Th2 Cytometric Bead Array kit*” (BD Biosciences, California, USA) foi utilizado, seguindo o protocolo indicado pelo fabricante.

---

Brevemente, o recipiente contendo as esferas marcadas com anticorpos anti-citocinas foi homogeneizado vigorosamente e 15  $\mu\text{L}$  de cada uma dos seis tipos de esferas foi adicionado para formar o *master mix* das esferas. Desta mistura, 50  $\mu\text{L}$  foram adicionados a 50  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cultura do PBMC testado com RecTax e quercetina, com posterior homogeneização vigorosa e incubação por 3 horas a temperatura ambiente. As amostras foram lavadas por adição de 1 mL de tampão de lavagem (kit) e centrifugadas a 200 X g por 5 minutos a 18 °C. O sobrenadante foi aspirado e 50  $\mu\text{L}$  do reagente de detecção contendo ficoeritrina foram adicionados a cada tubo contendo as esferas. Os tubos foram homogeneizados e posteriormente incubados por mais 30 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram novamente lavadas e aspiradas como descrito anteriormente e homogeneizadas em volume final de 300  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem (kit).

A leitura de fluorescência foi feita e analisada em citometro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) com interface com *Apple FACStation*. A análise dos dados foi feita utilizando o software de análise para citometria FlowJo (FlowJo, Stanford, USA). Como está ilustrado na figura 14, as seis citocinas testadas foram diferenciadas de acordo com a fluorescência emitida no canal de fluorescência 3 (figura 15 A). Avaliando a intensidade média de fluorescência (MFI) apresentada no canal de fluorescência 2 (FL2 – figura 15 B) obtida em cada tubo da diluição seriada dos padrões das citocinas, uma curva de calibração foi contruída (figura 15C) e com o valor de MFI em FL2 obtido para cada amostra, foi possível estimar a concentração de cada sobrenadante de cultura de PBMC que foi expressa em pg/mL.

Estratégia de aquisição e análise da fluorescência obtida por *Cytometric Bead Array* (CBA) para os sobrenadantes de cultura de PBMC estimulados com RecTax e quercetina

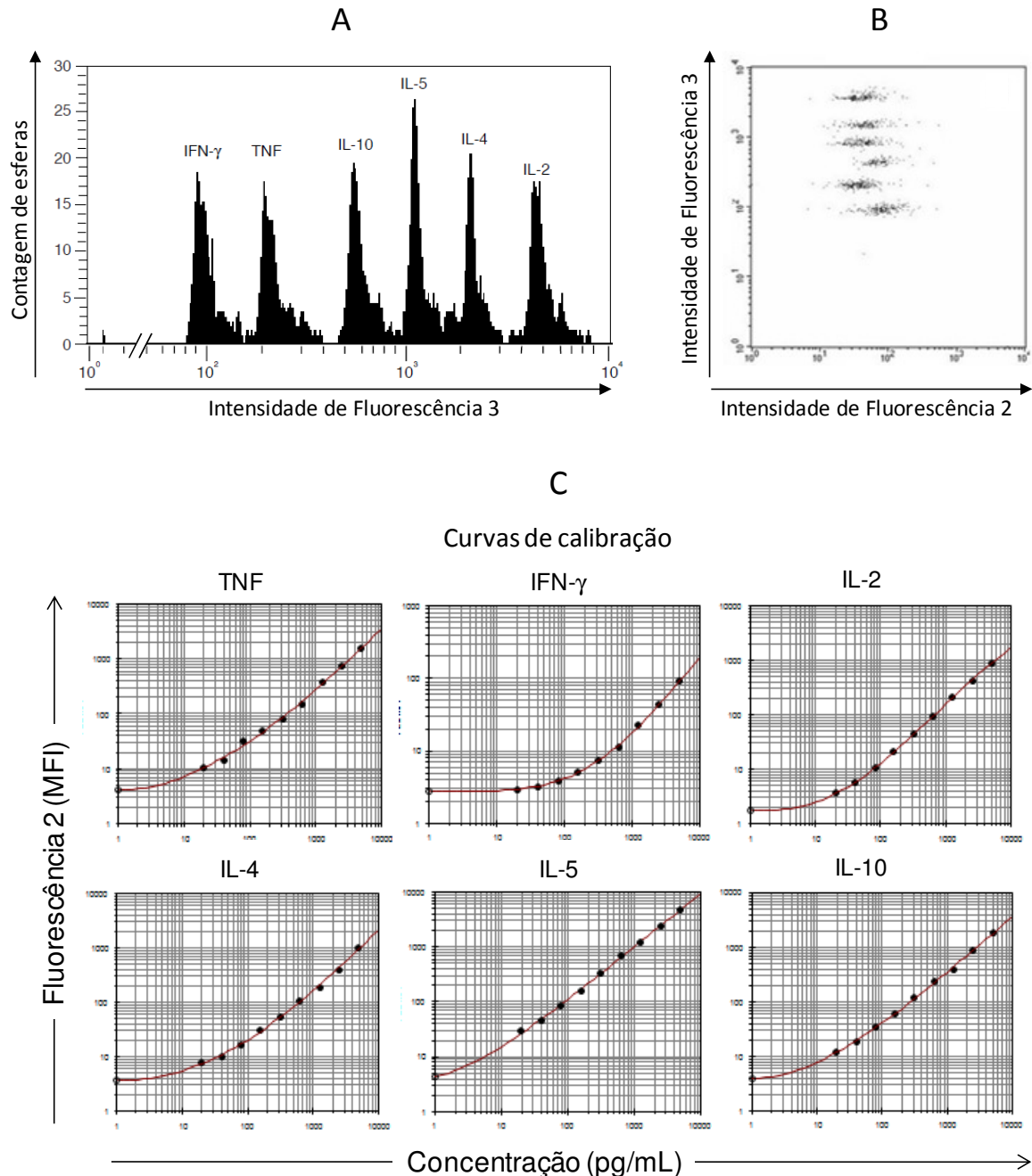


Figura 15 – Estratégia de aquisição e análise da fluorescência obtida para cada amostra de sobrenadante de PBMC, para as seis citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-4, IL-5 e IL-2 avaliadas por *Cytometric Bead Array* (CBA). A: As seis citocinas são diferenciadas em histogramas de fluorescência que representam a contagem das esferas em função da fluorescência 3 (FL3). B:

---

Gráficos de *dot plot* representando a intensidade de fluorescência 3, que diferencia as citocinas em função da intensidade de fluorescência 2 que corresponde ao reatividade de citocinas com as esferas. Uma vez obtida a intensidade de fluorescência (em FL2) para cada citocina, a concentração destas citocinas no sobrenadante é estimada, em pg/mL, utilizando a curva de calibração (C).

#### **4.10 Ensaio de Proliferação celular**

##### *4.10.1 Cultura de PBMC na presença de PHA e quercetina*

Após a obtenção do PBMC conforme descrito no item 3.3.4, 200.000 células provenientes de 10 indivíduos (figura 13): 4 soronegativos e 6 soropositivos (3 assintomáticos e 3 HAM/TSP) foram incubadas em quadruplicata em meio RPMI suplementado em poços de placa de 96 poços na presença de PHA a uma concentração final no poço de 2,5 µg/mL e concomitantemente na presença de quercetina à 100 µM. Controles na ausência de PHA e quercetina foram igualmente avaliados para comparação na presença de ambos os estímulos. Após 72 horas de incubação a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>, as células foram avaliadas pelo ensaio de MTT.

##### *4.10.2 Ensaio de MTT*

Após 72 horas de cultivo, foram adicionados 20µl da solução de MTT (5mg/ml) a cada poço. A placa foi, então, re-incubada por 4 horas em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C, ao abrigo da luz. Após o tempo de incubação com o MTT, os sobrenadantes dos poços foram retirados e repostos com 150µl/poço de Isopropanol em 0,04N de HCl. Em seguida, os cristais intracitoplasmáticos

---

foram solubilizados cuidadosamente por pipetagem (30 vezes). A absorbância dos cristais solubilizados no isopropanol foi lida no espectrofotômetro em comprimento de onda de 595nm. O percentual de proliferação e inibição da proliferação foi calculado através da densidade óptica (D.O.) das amostras que foram empregadas nas seguintes fórmulas:

$$\% \text{ Proliferação celular} = \frac{\text{D.O.}_{\text{PHA}} - \text{D.O.}_{\text{controle celular}}}{\text{D.O.}_{\text{controle celular}}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Inibição da Proliferação celular} = \frac{\text{D.O.}_{\text{PHA}} - \text{D.O.}_{\text{PHA e Quercetina}}}{\text{D.O.}_{\text{PHA}}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Viabilidade celular}^* = \frac{\text{D.O.}_{\text{Quercetina}}}{\text{D.O.}_{\text{controle celular}}} \times 100\%$$

\*após 72 horas

Estas fórmulas representam a regra de três que tem como 100% o controle celular, para o cálculo da viabilidade e proliferação celular. Para o cálculo da inibição da proliferação celular, considerou-se como 100%, a D.O. obtida para a amostra de PBMC na presença de apenas PHA.

#### **4.11 Análise estatística**

Para a análise dos dados foi utilizado o teste de Wilcoxon, para resultados não paramétricos que necessitam de pareamento. Para os dados que apresentaram uma distribuição normal, foi utilizado o teste T de Student para

---

dados paramétricos. Para dados que não necessitavam de pareamento foi utilizada Análise de Variância (ANOVA) para dados paramétricos e Kruskal-Wallis com pos-teste de Dunn`s para dados não-paramétricos. Para as correlações, foi utilizado o teste de correlação de Pearson, quando ambos os dados foram paramétricos e correlação de Spearman, quando um ou ambos os dados apresentaram-se não paramétricos.

O índice expresso em chance foi avaliado a partir da determinação da Razão de Verossimilhança (RV).  $RV = [\text{Média da Razão citocina 1/citocina 2}] / [\text{Média da Razão citocina 2/citocina 1}]$  (GREINER et al., 1995; JAESCHKE et al., 1994). A literatura registra que valores de RV superiores a 10 ou inferiores a 0,1 originam mudanças grandes e geralmente conclusivas. RV de 5 a 10 e de 0,1 a 0,2 originam mudanças moderadas, mas às vezes significativas; RV de 2 a 5 e de 0,2 a 0,5 geram mudanças pequenas, mas às vezes significativas e RV de 1 a 2 e de 0,5 a 1 geram mudanças muito pequenas e raramente significativas (JAESCHKE et al., 1994).

---

*"Every observation passes through three stages.  
First, it is ridiculed.  
Second, it is violently opposed.  
Third, it is accepted as being self-evident."*

***Adaptado de Arthur Schopenhauer (1788-1860)***

## ***Resultados***



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Viabilidade de PBMC, células MT-2 e células THP-1 na presença dos compostos polifenólicos Quercetina e Kaempherol.

Para a avaliação da viabilidade das amostras, as células MT-2, células THP-1 e PBMC foram incubadas por 24 horas com diferentes concentrações de quercetina e kaempherol: 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; e 100 $\mu$ M. Para a avaliação de viabilidade foi utilizado o ensaio de azul de Trypan, cujos resultados estão ilustrados na figura 16.

Viabilidade de PBMC, THP-1 e MT-2 na presença de quercetina e kaempherol

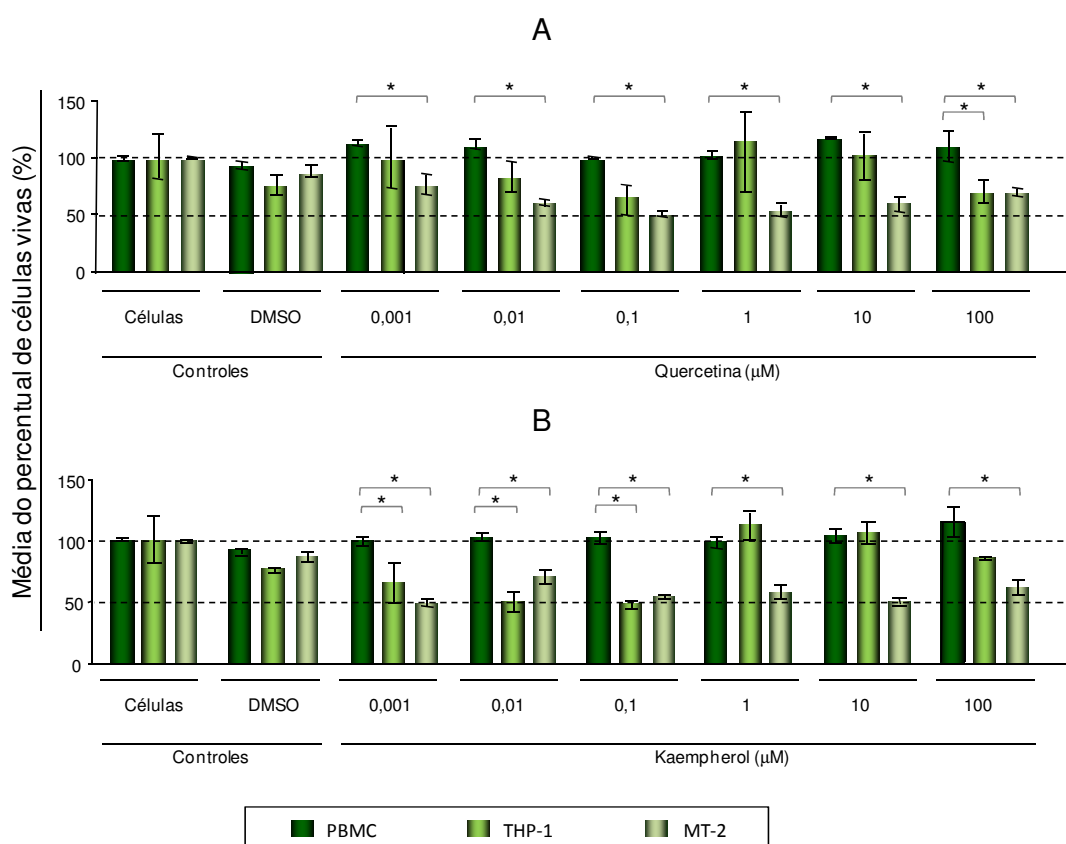


Figura 16 – Viabilidade celular de PBMC, THP-1 e MT-2 após tratamento por 24 horas com quercetina (A) e kaempherol (B) nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 e 100  $\mu$ M. A

---

viabilidade celular está expressa em percentual da média de células vivas das quadruplicatas de dois experimentos independentes, obtido pelo *ensaio de azul de trypan*, em relação ao controle não tratado com drogas. As médias estão expressas em barras com os respectivos desvios-padrão para cada tipo celular que podem ser identificados pelas cores na legenda abaixo do gráfico. O asterisco (\*) indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os dois grupos indicados na extremidade do colchete.

Foi possível observar que a viabilidade das células MT-2 foi menor que 100% em todas as concentrações de flavonóides avaliadas, contrastando com a viabilidade de PBMC que foi de quase 100% para todas as concentrações das drogas avaliadas, ou acima de 100%, mostrando leve proliferação celular. A viabilidade de MT-2 foi estatisticamente menor que a viabilidade de PBMC tanto para quercetina quanto para kaempherol em todas as concentrações testadas ( $p < 0,01$ )

As células THP-1 apresentaram viabilidade intermediária (PBMC > THP-1 > MT-2). Para quercetina, as células THP-1 apresentaram viabilidade semelhante a viabilidade de PBMC em todas as concentrações testadas com exceção da concentração de 100  $\mu\text{M}$ . Para kaempherol, concentrações mais baixas da droga apresentaram maior citotoxicidade. Houve diferença estatisticamente significativa da viabilidade de PBMC e THP-1 tratadas com kaempherol a 0,001; 0,01 e 0,1  $\mu\text{M}$ . Também foi possível verificar na viabilidade dos três tipos celulares avaliados que não houve uma diminuição na viabilidade de forma dose-resposta para nenhuma das duas drogas.

Viabilidade celular de PBMC, THP-1 e MT-2 na presença de quercetina e kaempherol em valores percentuais

A	PBMC	Viabilidade (%)	
		Quercetina	Kaempherol
	Controle celular	100,0 (97 - 102,9)	100,0 (97 - 102,9)
	Controle DMSO	92,36 (87 - 97,6)	92,36 (87 - 97,6)
	0,001	112,6 (110 - 115)	99,5 (91 - 107)
	0,01	110,2 (104 - 116)	102,6 (95 - 110)
	0,1	99,44 (97 - 101)	101,1 (91 - 111)
	1	102,3 (96,8 - 107)	98,7 (87 - 110)
	10	117,0 (118 - 116)	103,9 (90 - 117)
	100	110,5 (88 - 132)	115,5 (86 - 144)

B	THP-1	Viabilidade (%)	
		Quercetina	Kaempherol
	Controle celular	100 (87 - 112)	100 (87 - 112)
	Controle DMSO	92,36 (87 - 97,6)	95 (83 - 108)
	0,001	99 (91 - 107)	102,2 (99 - 105)
	0,01	108 (99 - 117)	52,5 (26 - 80)
	0,1	84 (76 - 93)	57,3 (55,7 - 59)
	1	96 (75 - 116)	103 (69 - 137)
	10	111 (95 - 128)	100 (70 - 130)
	100	74 (61 - 86)	83 (80 - 86)

C	MT-2	Viabilidade (%)	
		Quercetina	Kaempherol
	Controle celular	100 (98 - 102)	100 (98 - 102)
	Controle DMSO	87 (79 - 96)	87 (79 - 96)
	0,001	75 (61 - 99)	49 (43 - 55)
	0,01	60 (56 - 64)	70 (56 - 84)
	0,1	50 (47 - 53)	54 (51 - 57)
	1	54 (45 - 63)	57 (43 - 71)
	10	59 (48 - 70)	50 (43 - 57)
	100	74 (65 - 85)	62 (48 - 76)

Figura 17 – Viabilidade de PBMC (A), THP-1 (B) e MT-2 (C) em valores percentuais obtidos pelo *ensaio de azul de trypan*, após tratamento destas células por 24 horas com quercetina e kaempherol nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 e 100  $\mu$ M e DMSO (0.05%). Os valores percentuais foram calculados em relação o controle celular não tratado com as drogas. As médias de dois experimentos independentes realizados em quadruplicata foi avaliada estatisticamente com intervalo de confiança calculado utilizando desvio-padrão.

Diferença entre a viabilidade celular de PBMC e MT-2 na presença de quercetina e kaempherol

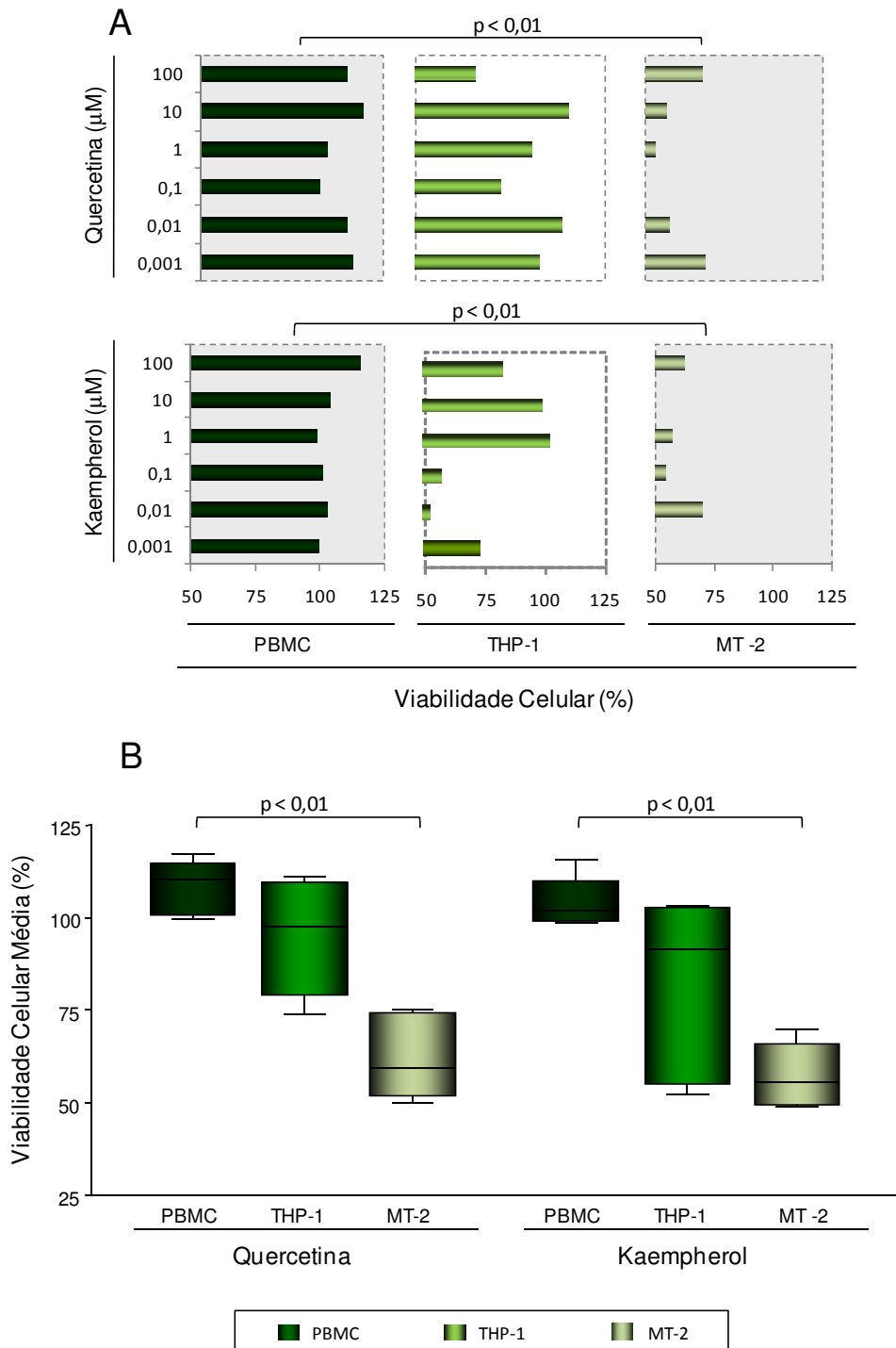


Figura 18 - Viabilidade das células avaliadas na presença de quercetina (acima) e kaempherol (abaixo) em gráficos de barra (A) e as médias das viabilidades de cada tipo celular em gráficos de box plot (B). Estes valores foram calculados considerando a contagem de células vivas realizada pelo *ensaio de azul de trypan*, após tratamento destas células por 24 horas com

---

quercetina e kaempherol nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 e 100  $\mu$ M O valor de  $p < 0,05$  indica diferença estatisticamente significativa.

As figuras 17 e 18 mostram os valores percentuais de viabilidade das células na presença das drogas testadas demonstrados em tabela (figura 17) e igualmente uma análise comparativa pareada da viabilidade apresentada pelos diferentes tipos celulares testados (figura 18). A análise dos dados demonstrou diferença estatisticamente significativa entre a viabilidade apresentada por PBMC e MT-2 tanto para quercetina ( $p < 0,01$ ) quanto para kaempherol ( $p < 0,05$ ). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre PBMC e THP-1 e MT-2 e THP-1. Estes dados confirmaram a viabilidade intermediária apresentada pelas células THP-1 visualizada na figura 18B.

Observou-se uma toxicidade de quercetina e kaempherol estatisticamente maior para as células MT-2, para ambas as drogas. Já PBMC, apresentou o maior percentual de células viáveis após incubação com as drogas e viabilidade superior a 10% em relação ao controle, após tratamento com quercetina (0,001; 0,01; 10; 100) e kaempherol (100).

---

## **5.2 Efeito de Quercetina e Kaempherol na acumulação de mRNAs virais em células MT-2.**

Para a avaliação da acumulação de mRNAs virais, as células MT-2 foram incubadas em diferentes concentrações de quercetina e kaempherol (0,001; 0.01; 0.1; 1; 10 e 100  $\mu$ M) por 24 horas. Após as incubações, foi feita a avaliação da acumulação de mRNAs virais de *gag-pol*, *rex-tax* e mRNA de *GAPDH* (normalizador) por PCR em Tempo Real.

Na figura 19 e 20, estão ilustrados os resultados da acumulação de mRNAs de *gag-pol* e *rex-tax*. Os valores são os resultados obtidos para cada um destes mRNAs em relação à acumulação do gene normalizador *GAPDH*. Os resultados foram expressos em valores relativos em relação ao controle de DMSO.

Análise da acumulação de mRNA de *gag-pol* em células MT-2 tratadas com quercetina e kaempferol

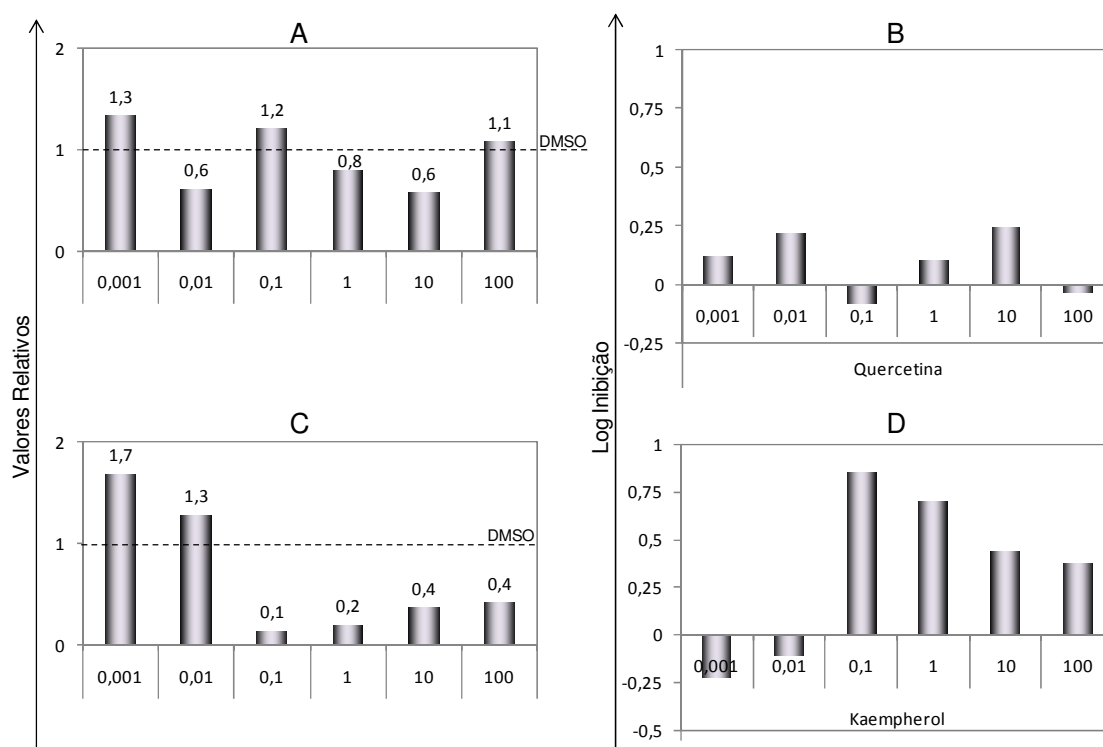


Figura 19 – Acumulação de mRNA de *gag-pol* em MT-2 após tratamento por 24 horas com diferentes concentrações (0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 e 100  $\mu\text{M}$ ) de quercetina e kaempferol por PCR em Tempo Real. As barras representam o valor relativo da acumulação de mRNA em relação ao controle de DMSO, que está representado pelas linhas pontilhadas, das duplicatas das diferentes concentrações quercetina (A) e kaempferol (B). O log da inibição na acumulação de mRNA de *gag-pol* exercida por quercetina (C) e kaempferol (D) foi calculado para as diferentes concentrações testadas. Todas as amostras apresentaram variação menor de um Ct em suas duplicatas.

Os resultados de acumulação de *gag-pol* mostram que há um aumento da acumulação dos mRNA após tratamento com quercetina 0,001; 0,1 e 100  $\mu\text{M}$  e com kaempferol nas concentrações de 0,001 e 0,01  $\mu\text{M}$ . Nas concentrações de quercetina 0,01 e 10  $\mu\text{M}$  e 0,1; 1; 10 e 100  $\mu\text{M}$  de kaempferol esta ocorre uma diminuição da acumulação de mRNAs de *gag-pol* em relação ao controle.

A análise da acumulação de mRNA de *tax-rex* (figura 20) mostra que há uma menor atividade das drogas na acumulação de mRNA de *tax-rex*, com um pequeno aumento após tratamento com quercetina 0,001; 0,1 e 100  $\mu\text{M}$  e com kaempherol nas concentrações de 0,001; 0,01; 10 e 100  $\mu\text{M}$ . Os gráficos demonstrando o Log da inibição da acumulação de mRNA confirma o que é observado no gráfico demonstrando apenas a acumulação de mRNA tanto para *tax-rex* quanto para *gag-pol*.

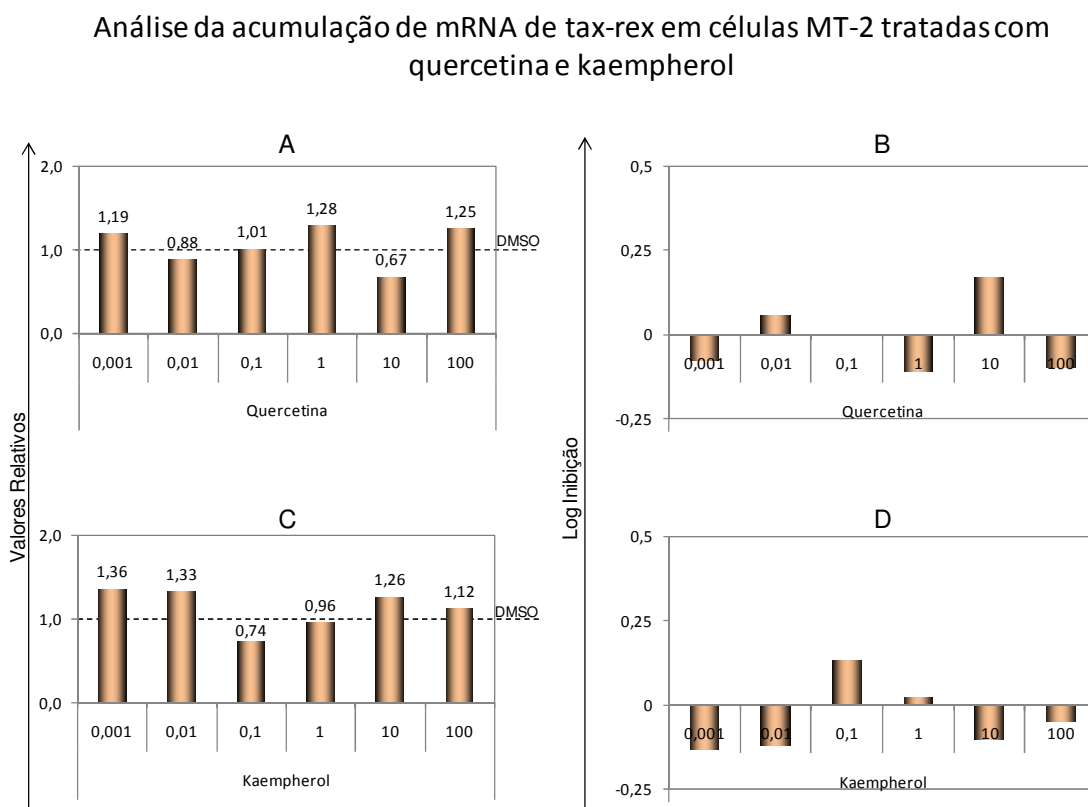


Figura 20 – Acumulação de mRNA de *tax-rex* em MT-2 após tratamento por 24 horas com diferentes concentrações (0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 e 100  $\mu\text{M}$ ) de quercetina e kaempherol por PCR em Tempo Real. As barras representam o valor relativo da acumulação de mRNA em relação ao controle de DMSO, que está representado pelas linhas pontilhadas, das duplicatas das diferentes concentrações quercetina (A) e kaempherol (B). O log da inibição na



acumulação de mRNA de *tax-rex* exercida por quercetina (C) e kaempherol (D) foi calculado para as diferentes concentrações testadas. Todas as amostras apresentaram variação menor de um Ct em suas duplicatas.

Na análise da variação de acumulação de mRNAs, quercetina e kaempherol promoveram uma redução maior na acumulação de mRNAs de *gag-pol* do que na de *tax-rex*.

A análise de correlação da acumulação de mRNA de *gag-pol* e *tax-rex* (figura 21) demonstrou que há correlação direta estatisticamente significativa entre a acumulação de mRNA virais após 24 horas de incubação com as diferentes concentrações de kaempherol, mas não para quercetina.

#### Correlação entre a acumulação de mRNA de *gag-pol* e *tax-rex* em células MT-2 tratadas com quercetina e kaempherol

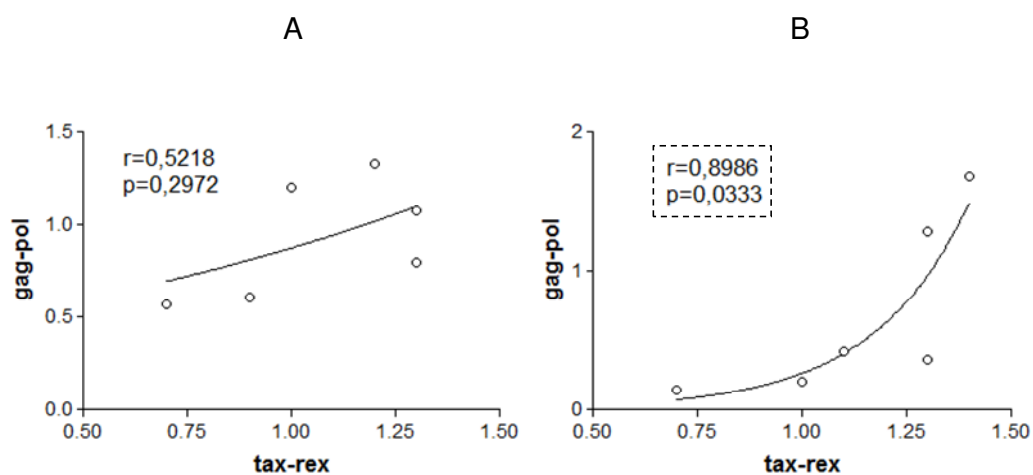


Figura 21 – Correlação entre acumulação de *gag-pol* e *tax-rex* em MT-2 após tratamento por 24 horas com diferentes concentrações (0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 e 100  $\mu$ M) de quercetina (A) e kaempherol (B) por PCR em Tempo Real.  $r$  – Coeficiente de correlação de spearman. Diferenças estatisticamente significativas são indicadas por valores de  $p < 0,05$ .

---

### **5.3 Avaliação da expressão de proteínas virais em células MT-2 após incubação com diferentes concentrações de Quercetina e Kaempferol.**

No intuito de verificar se os compostos polifenólicos quercetina e kaempferol apresentam um efeito inibitório real sobre o vírus, foi avaliada a expressão de proteínas virais para os diferentes extratos protéicos de MT-2 derivados da incubação com diferentes concentrações de quercetina e kaempferol. Foi feito um ensaio de *western blot* utilizando um *pool* de soros de pacientes infectados pelo HTLV-1 sabidamente reatores para proteínas virais derivadas de MT-2. Este *pool* de soros foi incubado com o extrato protéico das amostras testadas sendo as bandas quantificadas por densitometria. É importante destacar que foi colocada a mesma quantidade de proteínas em cada uma das canaletas para reagirem com os anticorpos diluídos.

A figura 22 apresenta o resultado do western blot na membrana de nitrocelulose. Foi possível verificar reatividade para 5 proteínas virais, sendo o seu peso identificado como: 28 KDa, 24 KDa, 21 KDa, 19 KDa e 15 KDa. A presença das bandas foi avaliada tendo como referência o controle celular não tratado com as drogas, sendo que apenas bandas com reatividade clara foram consideradas nesta análise.

## Efeito de quercetina e kaempherol na reatividade das proteínas de MT-2 em western blot

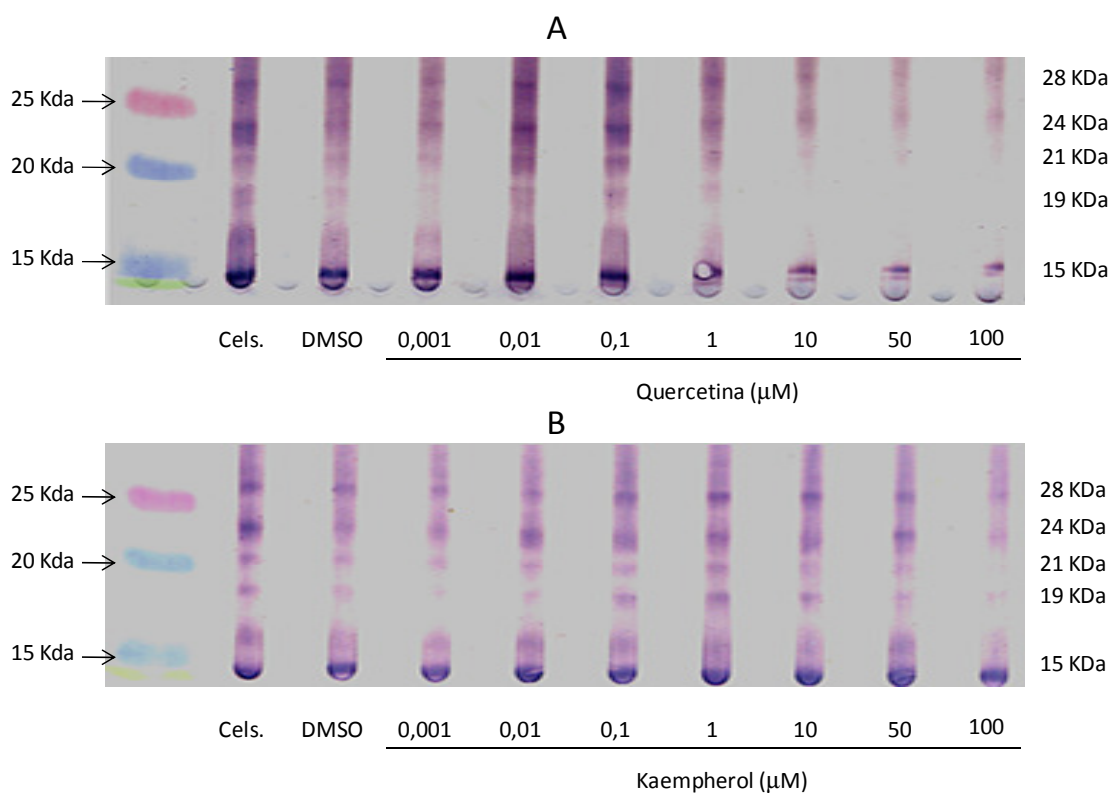
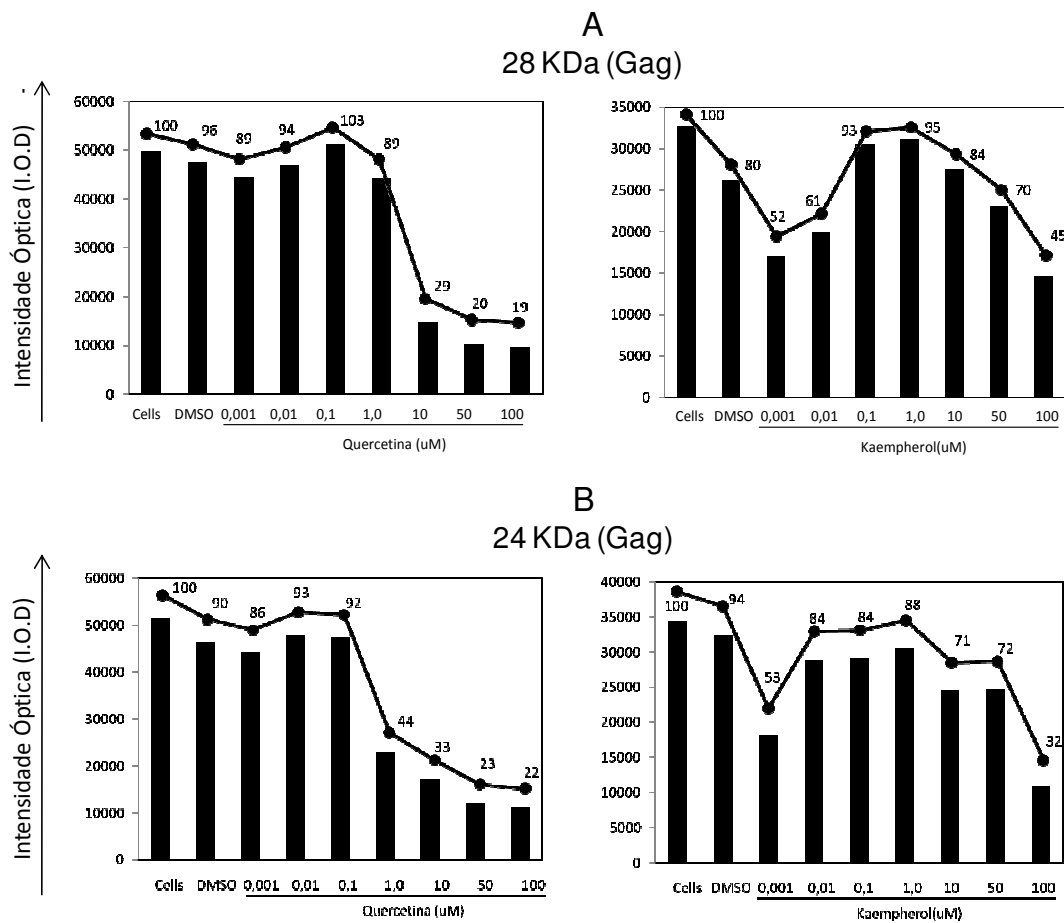


Figura 22 – Membranas de nitrocelulose do western blot. Cada canaleta na membrana representa a reatividade dos anticorpos do pool de soros reatores para proteínas Gag e Env do HTLV-1 com proteínas de MT-2 após tratamento destas células com diferentes concentrações (0,001 – 100 µM) de quercetina (A) e kaempherol (B) por 24 horas. Ao lado das membranas, está indicada por seta a massa molecular do padrão, que pode ser visto em diferentes cores a esquerda de cada membrana. Os retângulos pontilhados destacam as bandas observadas nas amostras controle e tratadas que foram identificadas de acordo com a massa molecular como as proteínas 28 KDa, 24 KDa, 21 KDa, 19 KDa e 15 KDa.

A análise das bandas (figura 23) demonstrou que a reatividade de proteínas virais foi reduzida com o aumento da concentração de quercetina. Para o kaempherol, foi relevante observar que concentrações baixas e altas da droga foram capazes de inibir a expressão de proteínas virais, mas não

concentrações intermediárias. É relevante ressaltar que a expressão de p19 foi reduzida a 0% nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$  de quercetina. Já a proteína p15 foi a que teve sua expressão menos reduzida, mesmo em altas concentrações das drogas.

### Impacto de quercetina e kaempherol na expressão de proteínas de MT-2



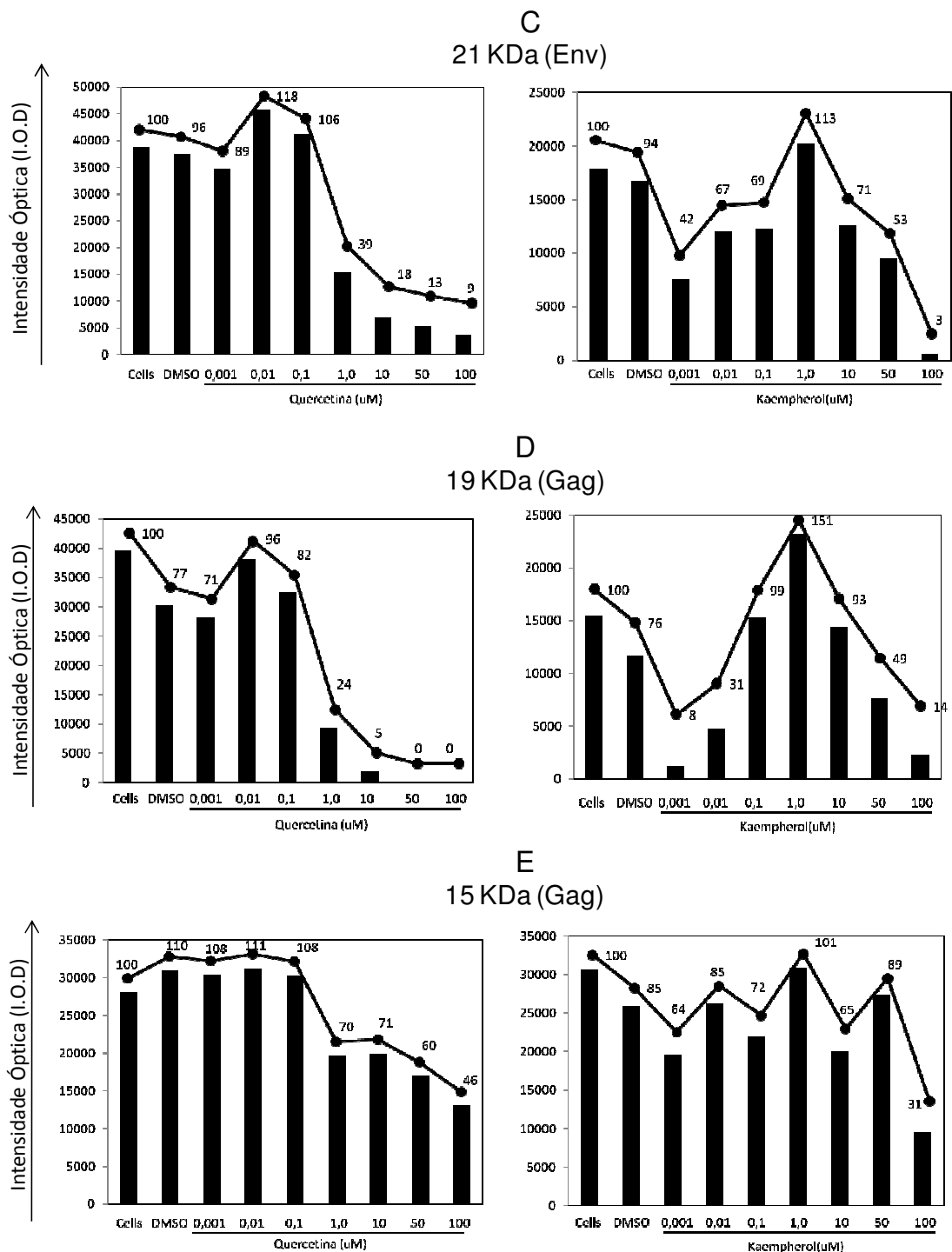


Figura 23 – Reatividade a proteínas de MT-2 após incubação por 24 horas com diferentes concentrações de quercetina e kaempferol (0,001 – 100  $\mu$ M) avaliada por western blot. As barras representam o valor da reatividade, obtidas por densitometria das bandas presentes na membrana de nitrocelulose e expressas em unidades arbitrárias de intensidade óptica (I.O.D) para as proteínas 28 KDa (A), 24 KDa (B), 21 KDa (C), 19 KDa (D) e p15 KDa (E) para cada amostra.

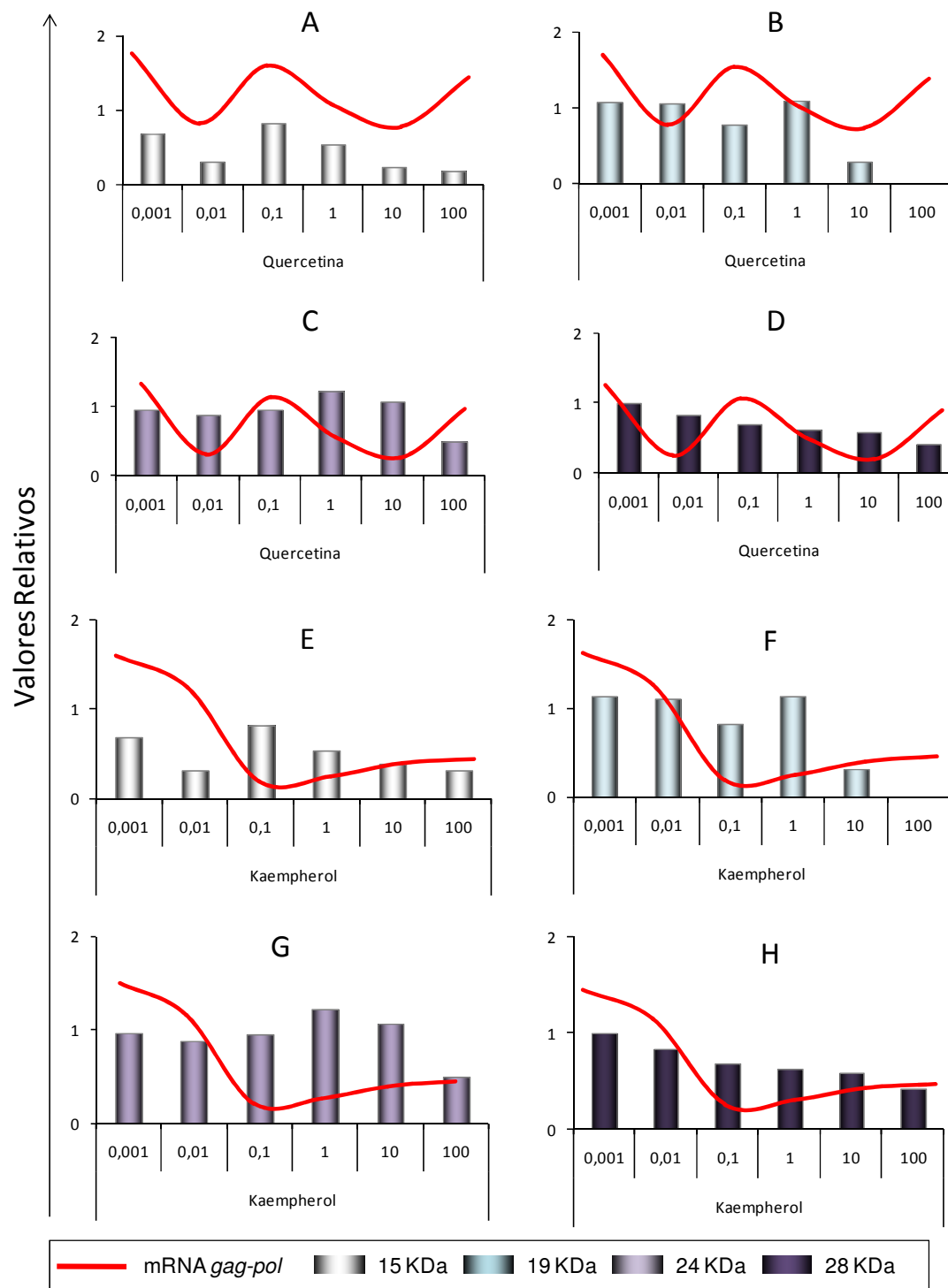


Figura 24 – Avaliação da expressão de proteínas Gag avaliada por western blot em relação à acumulação de mRNA de *gag-pol* (linha vermelha) avaliada por PCR em Tempo Real, em MT-2 tratadas com diferentes concentrações (0,001 – 100 μM) de quercetina (A, B, C e D) e kaempferol (E, F, G e H) por 24 horas. As barras representam valores relativos ao controle de

---

DMSO, das proteínas Gag: 28 KDa, 24 KDa, 19 KDa e p15 KDa, identificadas pelas cores da legenda. A linha vermelha representa a acumulação de mRNA de *gag-pol* em relação ao controle de DMSO.

A figura 24 demonstra a superposição da reatividade relativa das proteínas 15 KDa, 19 KDa, 24 KDa e 28 KDa avaliadas por Western Blot e a acumulação de mRNA de *gag-pol* avaliada por PCR em Tempo Real. É possível observar que a acumulação de mRNA para *gag-pol* em MT-2 tratada com kaempferol (0,1 a 100  $\mu$ M) parece ser inversa a reatividade relativa das proteínas Gag. Quercetina, por sua vez apresenta um perfil que sugere uma indução da diminuição de acumulação de mRNA de *gag-pol* associada com a diminuição de reatividade relativa das proteínas Gag 15 KDa, contrastando com da proteína 28KDa, na qual se observa o inverso.

Para confirmar a avaliação anterior, foi feita a correlação individual das proteínas Gag e a acumulação de mRNA para *gag-pol* em cada uma das concentrações testadas de quercetina e kaempferol.

A figura 25 demonstra que há uma correlação direta estatisticamente significativa ( $p = 0,0269$ ) em MT-2 tratada com quercetina, e uma correlação inversa estatisticamente significativa ( $p = 0,0085$ ) em MT-2 tratada com kaempferol, entre a acumulação de mRNA de *gag-pol* e a proteína Gag 15 KDa (figura 25 A e B). A proteína 15 KDa apresentou reatividade mais visível na membrana de Western Blot como pode ser observado na figura 22.

Correlação entre a acumulação de mRNA de *gag-pol* e proteínas Gag em células MT-2 tratadas com quercetina e kaempferol

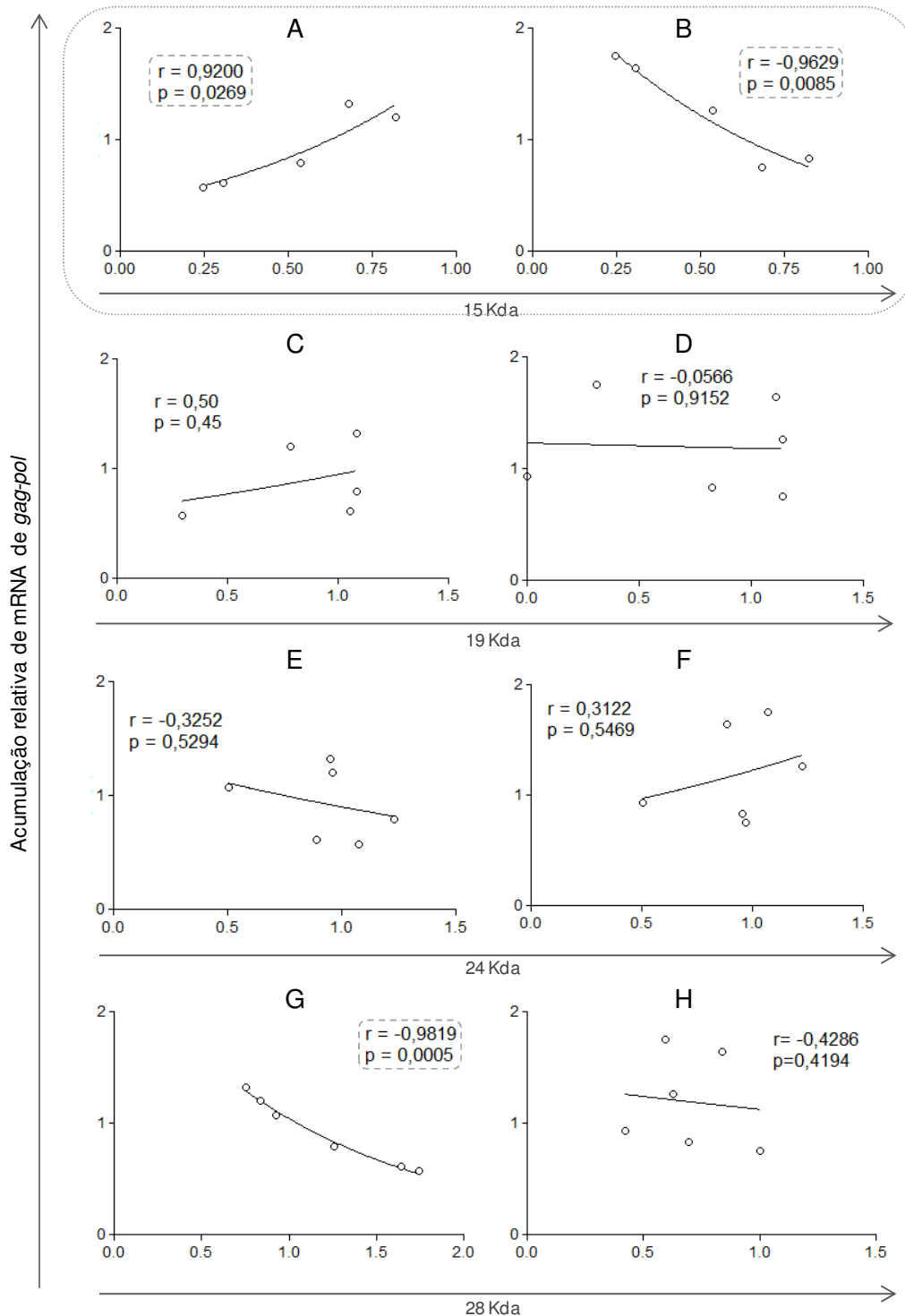


Figura 25 – Correlação de Pearson entre a reatividade relativa das proteínas 28 KDa, 24 KDa, 21 KDa, 19 KDa e 15 KDa avaliadas por Western Blot e a acumulação de mRNA para gag-pol avaliada por PCR em Tempo Real em MT-2 após tratamento com quercetina (A, C, E e G) e kaempferol (B, D, F e H). A curva nos gráficos representa a regressão não-linear que se refere



---

aos valores relativos de acumulação de mRNA de gag-pol e reatividade relativa das proteínas Gag em relação ao controle de DMSO. O valor de r representa o coeficiente de correlação (varia de 0 a 1) das amostras e o valor de p indica diferença estatisticamente significativa, caso  $p < 0,05$ .

Adicionalmente, houve correlação inversa estatisticamente significativa ( $p = 0,0005$ ) entre a acumulação de mRNA de *gag-pol* e a proteína 28 KDa em MT-2 tratada com quercetina.

Estes resultados confirmam os resultados visualizados anteriormente indicando que há uma relação direta, para quercetina e inversa, para kaempherol da acumulação de mRNA de *gag-pol* e a reatividade da proteína 15KDa, que é, provavelmente, a mais representativa da expressão de proteínas Gag, uma vez que foi a banda mais bem visualizada na membrana de nitrocelulose no Western Blot.

#### **5.4 Avaliação do perfil topográfico de células MT-2 na presença de quercetina e kaempherol, utilizando Microscopia de Força Atômica.**

Para buscar alterações na superfície das células MT-2 promovidas pela quercetina, foi utilizada uma técnica de alta sensibilidade para visualizar as estruturas e a topografia da superfície celular. Assim, para avaliar a superfície de células MT-2 na ausência e na presença de quercetina e kaempherol, foi utilizada a Microscopia de Força Atômica (AFM).

---

Célula MT-2 em aumento de 7.500 vezes rastreada por AFM

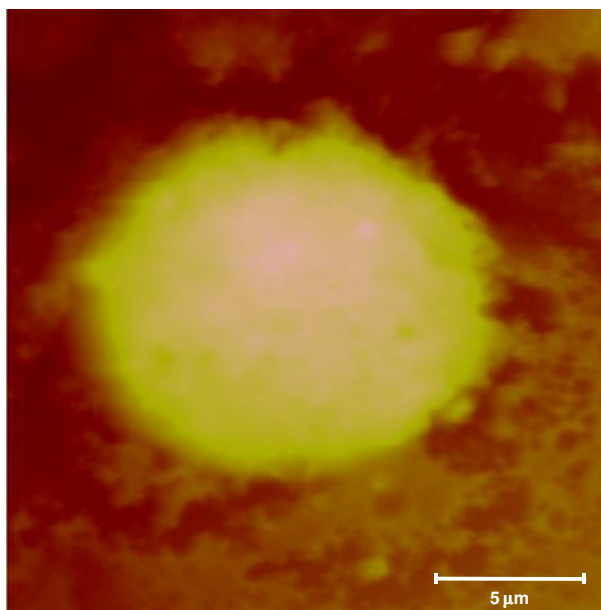


Figura 26 – Célula MT-2 rastreada com sonda de cantilever de maior comprimento por Microscopia de Força Atômica. A imagem de altura bidimensional evidencia os contornos da célula, cujo tamanho foi estimado em aproximadamente 12  $\mu\text{m}$ . As partes mais claras correspondem a regiões mais altas na imagem, enquanto que regiões escuras representam regiões mais baixas. No canto inferior direito encontra-se a escala da imagem, cujo tamanho da barra representa o tamanho de 5  $\mu\text{m}$  na imagem.

A figura 26 mostra as dimensões da MT-2 e seu aspecto obtido por Microscopia de Força Atômica. O tamanho das células MT-2 variou numa faixa de aproximadamente 10 -15  $\mu\text{m}$ .

Outras células como THP-1 e U937 também foram rastreadas por AFM para a comparação com células MT-2, como mostra a figura 27. O tamanho das células foi aproximado em relação a MT-2 como pode ser visto nas imagens de altura bidimensional, no entanto, como é possível observar nas imagens de fase da figura 26, o perfil da superfície de MT-2 demonstra-se distinto da superfície de THP-1 e U937. Aparentemente, no aumento de 7.500 vezes, a

superfície de MT-2 apresenta um perfil granuloso não visto nas outras células com característica de materiais heterogênea. As células THP-1 e U937 já apresentam um perfil de superfície celular mais homogêneo e não são visualizadas as granulosidades de superfície observadas nas células MT-2.

Células THP-1, U937 e MT-2 em aumento de 7.500 vezes rastreadas por AFM

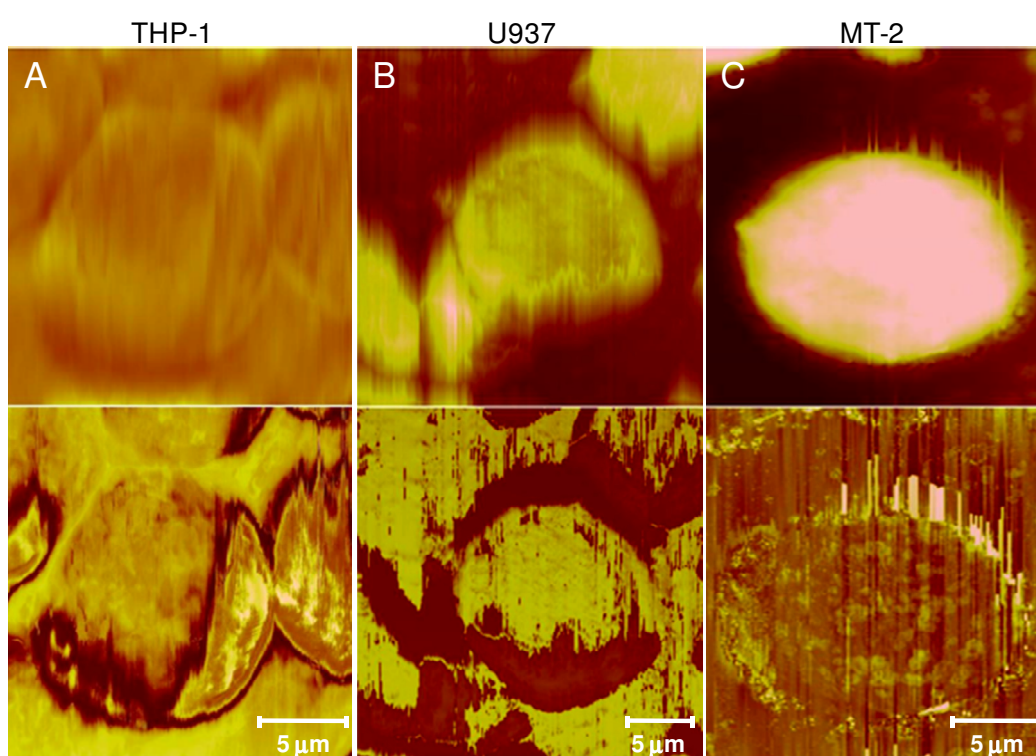


Figura 27 – Superfície de THP-1 (A), U937 (B) e MT-2 (C) rastreadas por AFM em aumento aproximado de 7.500 vezes. Acima, estão apresentadas as imagens de altura bidimensional em aumento de 7.500 vezes representando os contornos das células que apresentaram tamanhos aproximados. Abaixo estão apresentadas as imagens de fase correspondente a imagem apresentada acima, na qual é possível visualizar o perfil da superfície das células rastreadas. As barras no canto inferior direito indicam a escala de aumento das imagens acima e abaixo.

Desta forma, foi necessário visualizar a superfície de células MT-2 isoladamente para verificar o perfil granuloso observado anteriormente e a presença de estruturas na superfície das células. Ao varrer a superfície das células MT-2 em maiores aumentos, foram verificadas estruturas assemelhadas a vírus, na forma de brotamentos virais e partículas virais na superfície das células.

#### Superfície de célula MT-2 rastreada por AFM em diferentes aumentos

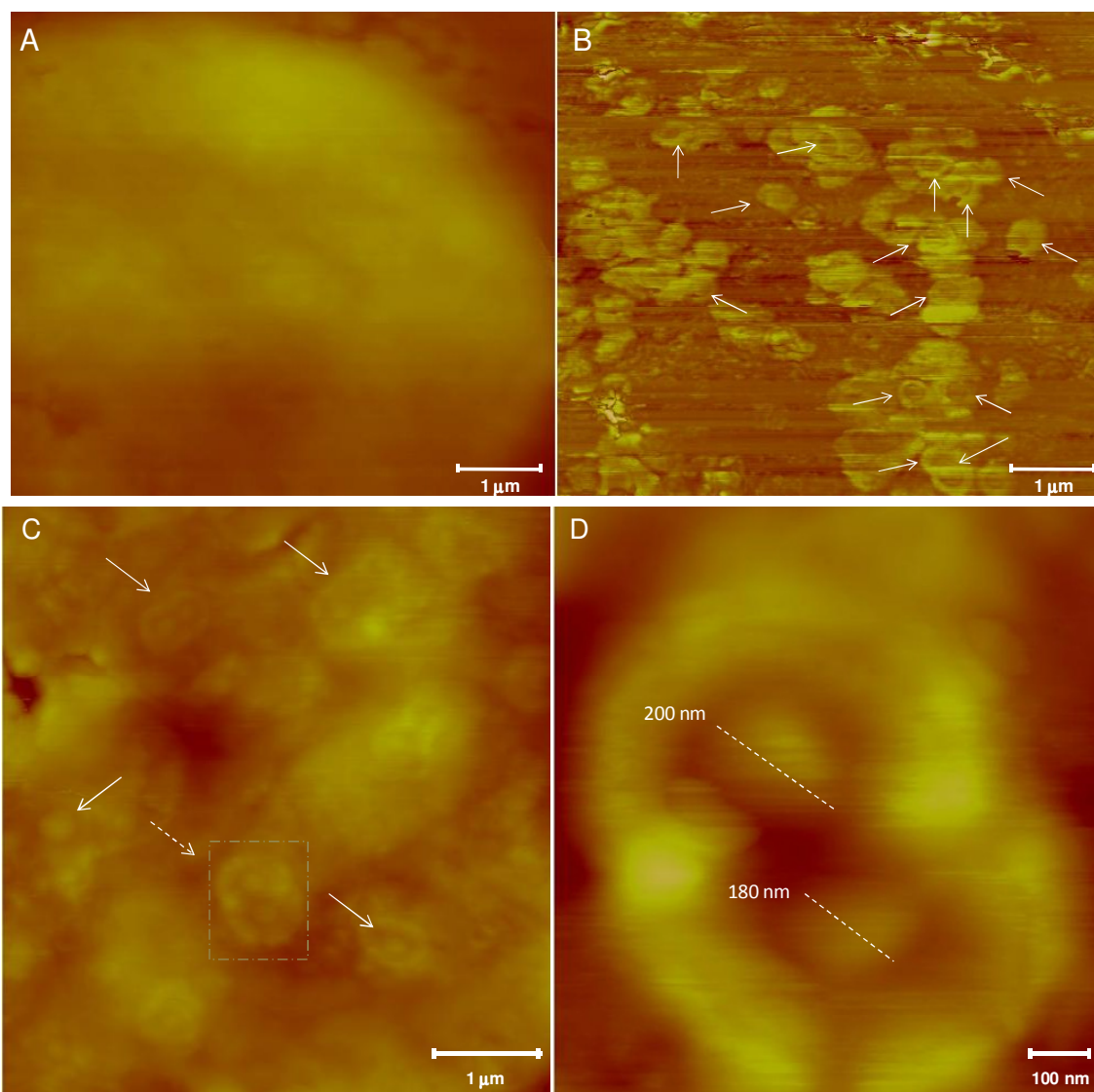


Figura 28 – Superfície de MT-2 rastreada por AFM em aumentos distintos. A: imagem de altura bidimensional em aumento de 21.430 vezes representa os contornos de MT-2. B: Imagem de

---

fase correspondente a imagem em A, representando estruturas semelhantes a vírus em brotamento na superfície de MT-2 em aumento de 21.430 vezes. C: imagem de altura bidimensional representa a superfície de MT-2 em aumento de 30.000 vezes. O retângulo pontilhado representa duas destas estruturas que estão aumentadas em D, em aumento de 150.000 vezes. As setas indicam estruturas na superfície da célula que se assemelham a vírus em brotamento e as barras no canto inferior direito indicam a escala de aumento.

Na figura 28, é possível observar imagens da superfície de células MT-2. Nas imagens que compõem esta figura (28A a 28D), é possível observar na superfície celular estruturas ovaladas com uma estrutura de material diferente no interior, de formato arredondado. Estas estruturas foram ampliadas na figura 28D, para verificar se estas estruturas ovaladas teriam tamanho correspondente ao vírus. A estrutura arredondada interna teve seu tamanho mensurado, coincidindo com o tamanho do HTLV (aproximadamente 180 nM), descrito através das técnicas de microscopia eletrônica (MOROZOV E WEISS, 1999) e tomografia computadorizada (MAJOROVITS et al., 2008).

Na figura 28E e 28D, é possível observar as esferas dentro de depressões na superfície da célula que se elevam nas bordas. As regiões mais escuras na borda da estrutura ovalada interna formam uma “depressão” ao redor da estrutura, dando formato arredondado nas três dimensões avaliadas na microscopia. Estas estruturas arredondadas internas também apresentam tamanho aproximado de 180 nm, o que pode ser um indício de brotamento do vírus HTLV-1 na superfície celular de MT-2.

Nos experimentos realizados, também foi mensurado o tamanho das estruturas visualizadas como está ilustrado na figura 29. Pode-se observar que as estruturas apresentaram maior freqüência de tamanho entre 191 e 200 nm de diâmetro.

### Avaliação do tamanho das estruturas semelhantes a vírus em brotamento presentes na superfície de célula MT-2 rastreada por AFM

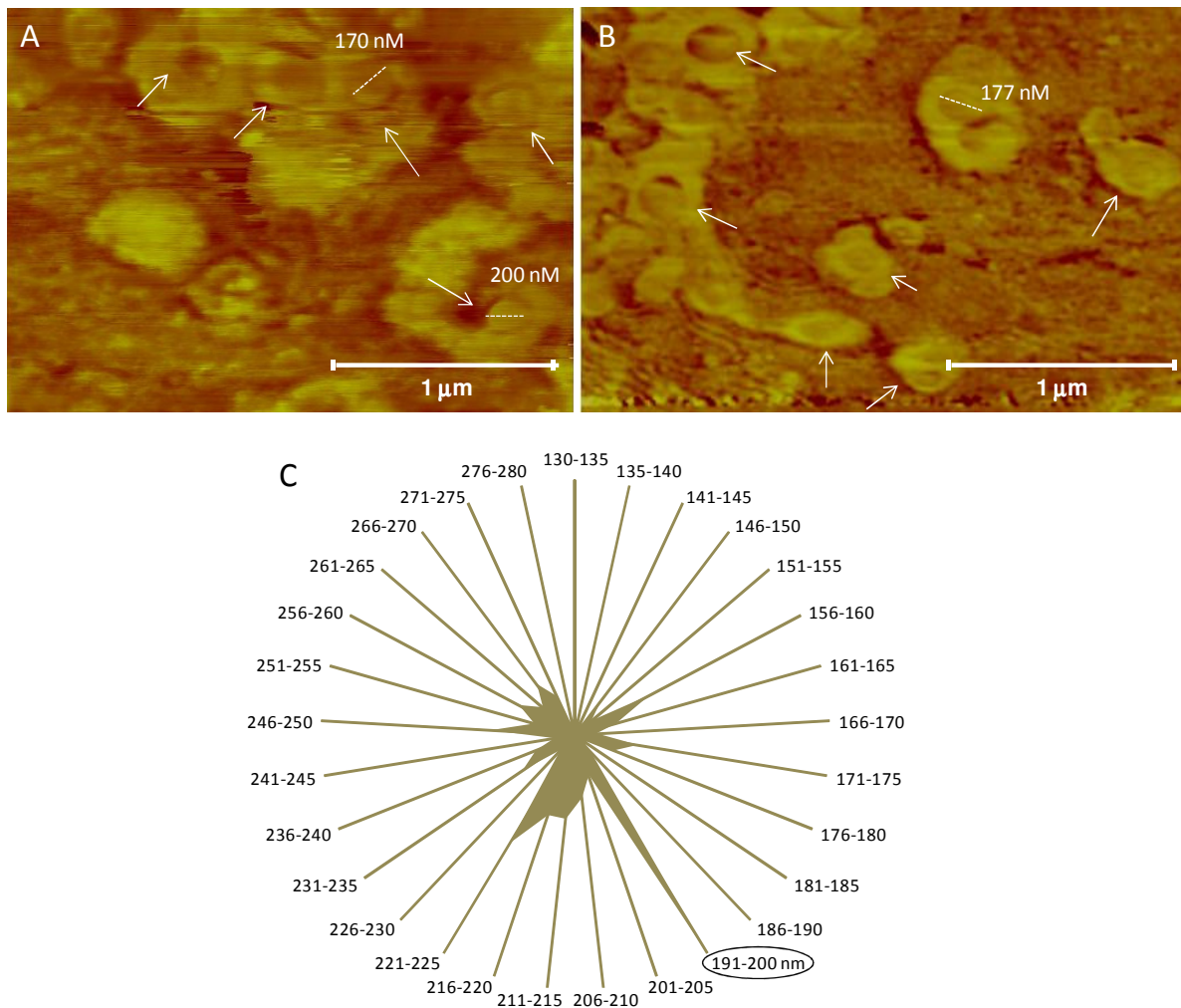


Figura 29 – A e B: Imagem de fase da superfície de MT-2 rastreada por AFM, representando estruturas semelhantes ao vírus HTLV-1 em brotamento. As estruturas estão indicadas pelas setas e os traços pontilhados representam o marcador de tamanho para mensurar as partículas arredondadas. As barras no canto inferior direito indicam a escala de aumento. C: Gráfico de



radar demonstrando as faixas de tamanho do diâmetro das estruturas observadas. As estruturas observadas apresentaram uma maior frequência de tamanho entre 191 e 200 nm de diâmetro.

A presença de partículas de HTLV-1 livres também foi evidenciada. A figura 30 ilustra a presença de várias estruturas semelhantes a partículas virais de HTLV-1. Na figura 30D, é possível observar a estrutura semelhante a uma partícula viral com uma estrutura arredondada mais escura no seu interior semelhante um capsídeo com um envoltório fino de cor mais amarelo claro, o que é indício de material distinto do material da estrutura análoga ao capsídeo.

#### Partículas livres de HTLV-1 na superfície de célula MT-2 rastreada por AFM

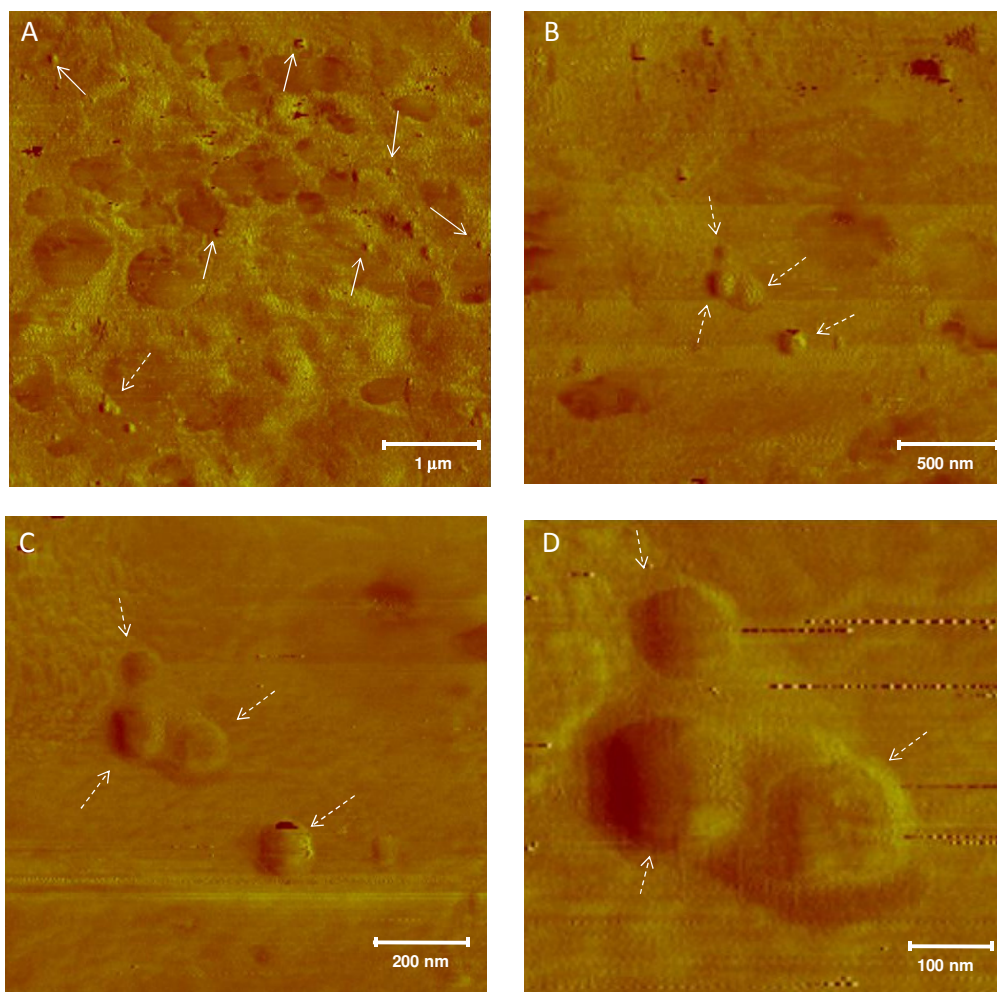


Figura 30 –Imagem de fase da superfície de Célula MT-2 rastreada por AFM em aumento de 30.000 vezes (A), 75.000 vezes (B), 150.000 vezes (C) e 300.000 vezes (D). As imagens representam estruturas semelhantes a partículas virais do HTLV-1 livres na superfície de MT-2 em aumentos sucessivos e crescentes. As setas indicam as estruturas semelhantes a vírus livres a as barras no canto inferior direito indicam a escala de aumento.

As partículas virais visualizadas também foram mensuradas conforme mostra figura 31A. Foram medidas 42 partículas virais que apresentaram uma média de tamanho de 85 nm. Na figura 31B, pode-se observar que três faixas de tamanho foram predominantes, sendo elas, da menos para a mais frequente: 30-40 nm, 51-60 nm e 71-80nm. Estes valores são inferiores aos observados para as estruturas semelhantes a brotamentos virais apresentadas na figura 27.

### Avaliação do tamanho das estruturas semelhantes a partículas de HTLV-1 livres presentes na superfície de célula MT-2 rastreada por AFM

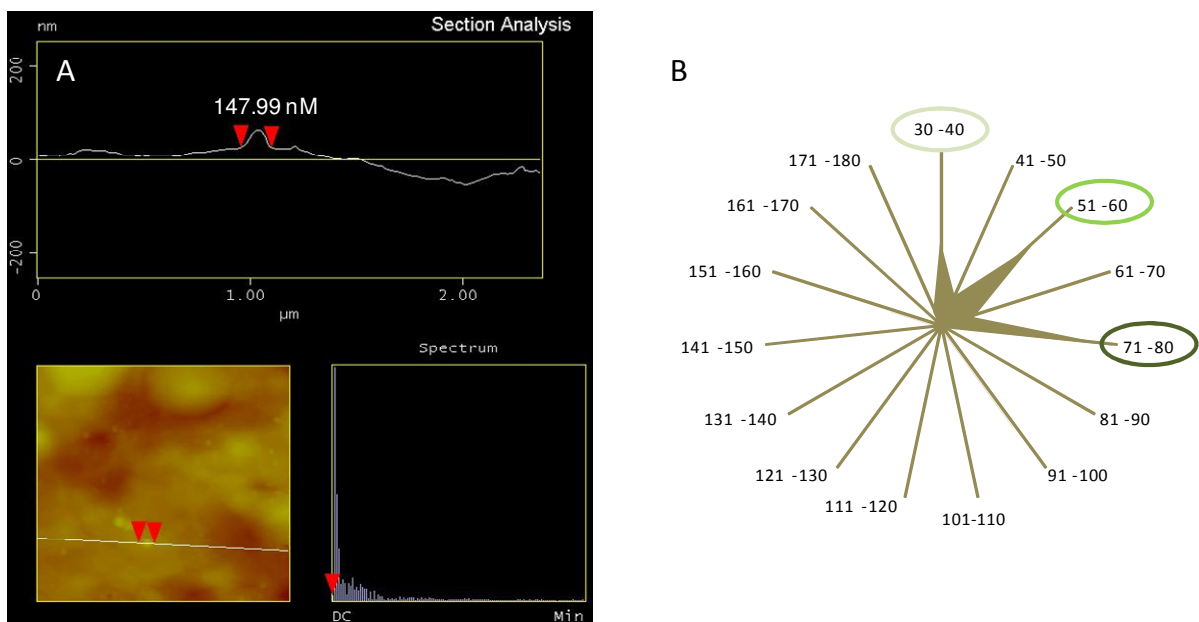


Figura 31 – A: Análise topográfica de imagem de MT-2 rastreada por AFM para a mensuração do tamanho das partículas virais presentes da superfície da célula. B: Gráfico de radar



---

demonstrando as faixas de tamanho do diâmetro das partículas virais observadas. As três faixas de tamanho mais frequentes estão circuladas sendo que as partículas do HTLV-1 livres visualizadas apresentaram uma maior frequência de tamanho entre 71 e 80 nm de diâmetro.

Uma vez estabelecido o perfil topográfico da superfície de MT-2 e evidências de vírus na superfície destas células, foi avaliado o efeito dos compostos quercetina e kaempherol na superfície destas células.

As células MT-2 foram tratadas com quercetina e kaempherol a 100 $\mu$ M por 24 horas e posteriormente, foram preparadas para a microscopia de força atômica. A figura 31 apresenta resultados do controle de células sem drogas, MT-2 na presença de quercetina e de kaempherol.

A análise dos resultados demonstrou que quercetina e kaempherol à 100  $\mu$ M são capazes de modificar o perfil topográfico da superfície de células MT-2. Na figura 32 é possível observar que na presença de quercetina e o kaempherol, as células MT-2 não apresentam as protuberâncias semelhantes a brotamentos virais facilmente e frequentemente visualizadas nas amostras controle de MT-2.

## Avaliação do impacto de quercetina e kaempherol na superfície de célula MT-2 rastreada por AFM

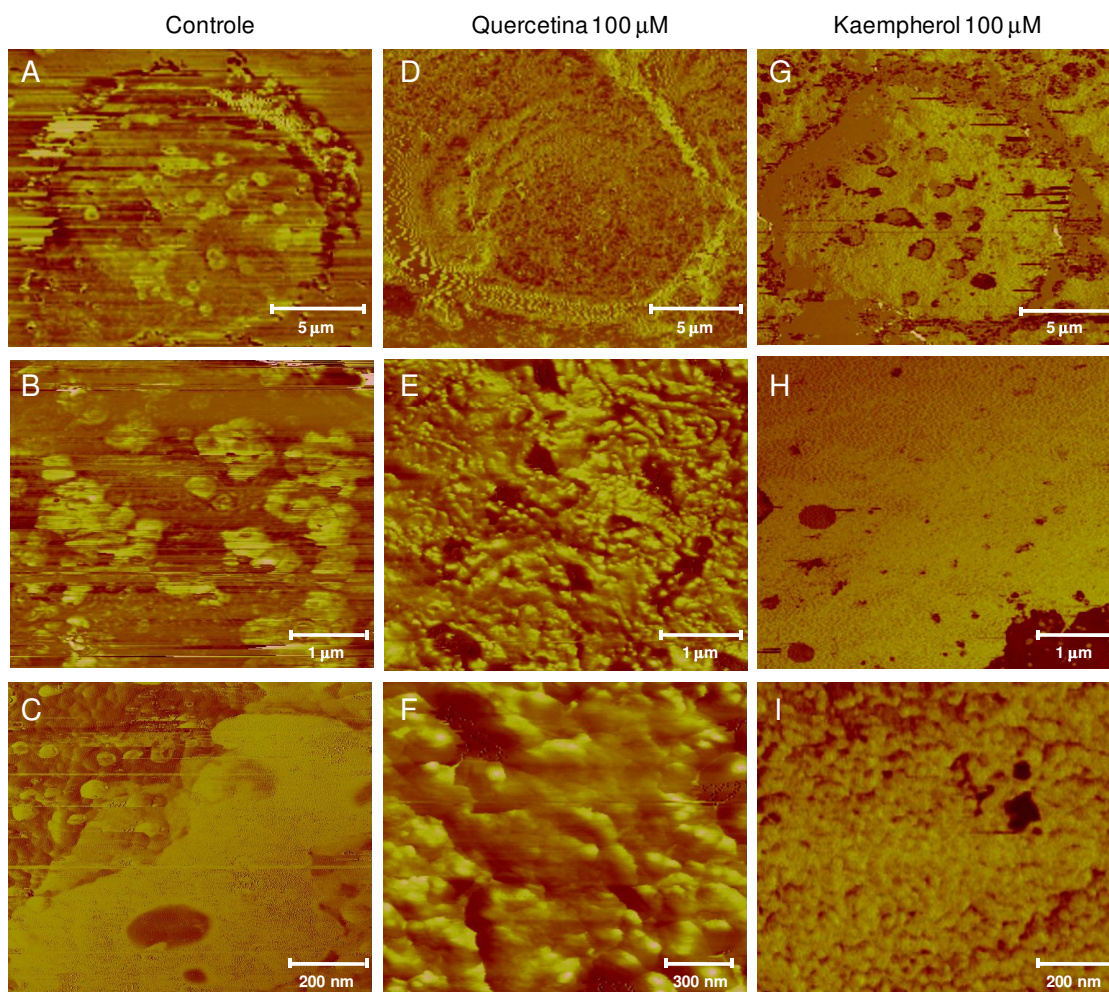


Figura 32 – Célula MT-2 não tratada com drogas (controle) e rastreada por AFM em aumentos sucessivos: 7.500 (A), 25.000 (B) e 150.000 (C) vezes. D, E e F: Célula MT-2 após tratamento com quercetina a 100 μM por 24 horas, rastreada por AFM em aumentos sucessivos: 7.500 (D), 30.000 (E) e 100.000 (F) vezes. G, H e I: Célula MT-2 após tratamento com kaempherol a 100 μM por 24 horas, rastreada por AFM em aumentos sucessivos: 7.500 (G), 30.000 (H) e 150.000 (I) vezes. As barras no canto inferior direito indicam a escala da imagem.

Avaliação do impacto de quercetina e kaempherol no número e no tamanho das estruturas semelhantes a partículas de HTLV-1 na superfície de célula MT-2 rastreada por AFM

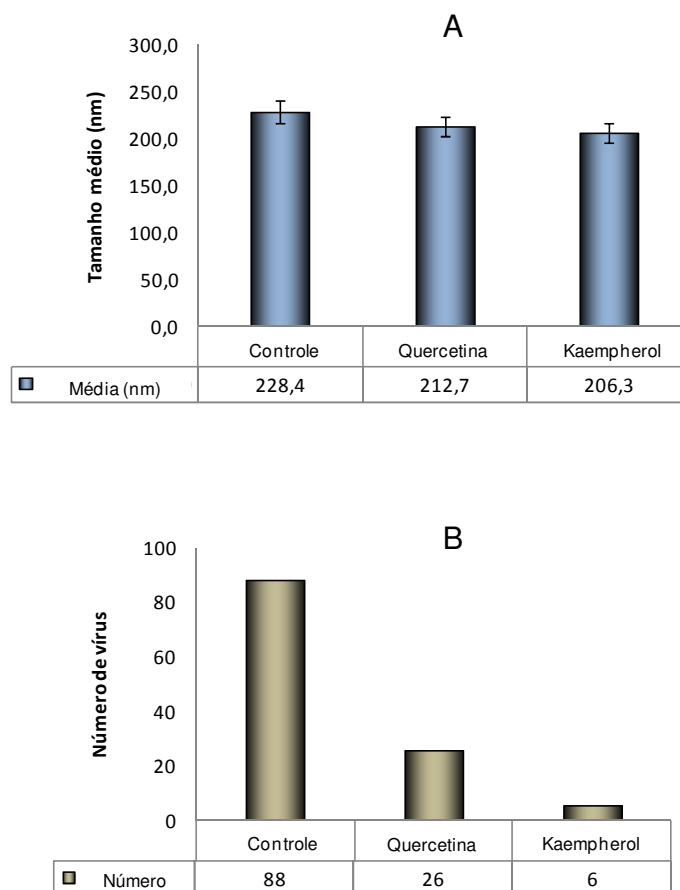


Figura 33 – Avaliação do impacto de quercetina e kaempherol no tamanho (A) e número (B) de estruturas semelhantes ao HTLV-1 na superfície de MT-2. A avaliação foi feita através da quantificação e mensuração das estruturas após rastreamento por AFM da superfície de MT-2 após a incubação destas células com quercetina e kaempherol a 100  $\mu$ M por 24 horas.

Os gráficos da figura 33 apresentam os resultados da análise do impacto de quercetina e kaempherol no tamanho e número de estruturas semelhantes a partículas do HTLV-1 na superfície de MT-2. A análise dos resultados mostrou uma diminuição do número destas estruturas após o tratamento com quercetina e, especialmente, kaempherol. Uma pequena diminuição no

tamanho destas estruturas também foi observada, no entanto, sem diferença estatisticamente significativa.

Outra alteração importante que deve ser mencionada é a presença de perfurações ou poros na membrana das células MT-2 na presença de quercetina e kaempherol. Estes poros não são observados na amostra controle de MT-2. A figura 34 evidencia estes poros e a sua mensuração.

#### Avaliação da profundidade dos poros presentes na superfície de MT-2 após tratamento com quercetina e kaempherol

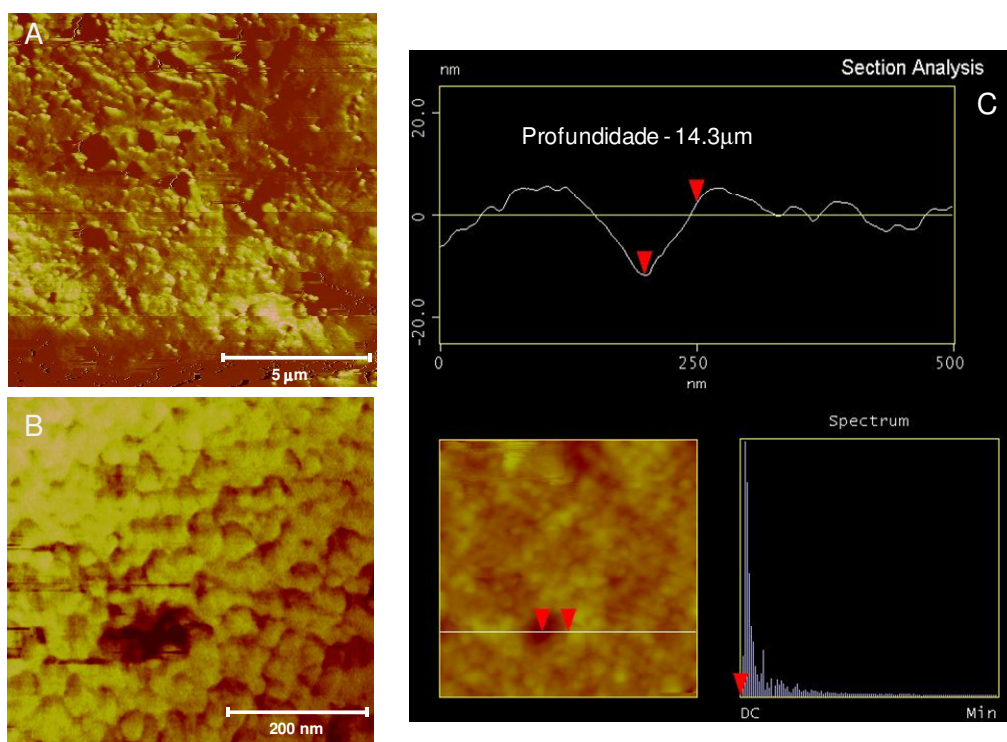


Figura 34 – A e B: Rastreamento dos poros observados em células MT-2 após tratamento com quercetina e kaempherol à 100 μM por 24 horas, por AFM em aumentos sucessivos crescentes de 25.000 (A) e 150.000 (B) vezes. C: Análise de seção demonstrando tamanho e profundidade (14,3 μm) do poro na superfície das células.

A figura 34 mostra que os poros observados na superfície das células MT-2 após incubação com os compostos polifenólicos na concentração de 100  $\mu\text{M}$  têm profundidade de até 14  $\mu\text{m}$ . Estes poros são suficientemente profundos para atravessar a membrana citoplasmática (7 a 9  $\mu\text{m}$ ), o que permite sugerir que estes poros possam gerar morte celular.

Para verificar se quercetina e kaempherol induziam morte celular exclusivamente em células MT-2, a viabilidade destas células foi avaliada juntamente com PBMC e está demonstrada no gráfico ilustrado na figura 35.

### Viabilidade de Células MT-2 e PBMC de indivíduos saudáveis soronegativos após tratamento com quercetina e kaempherol

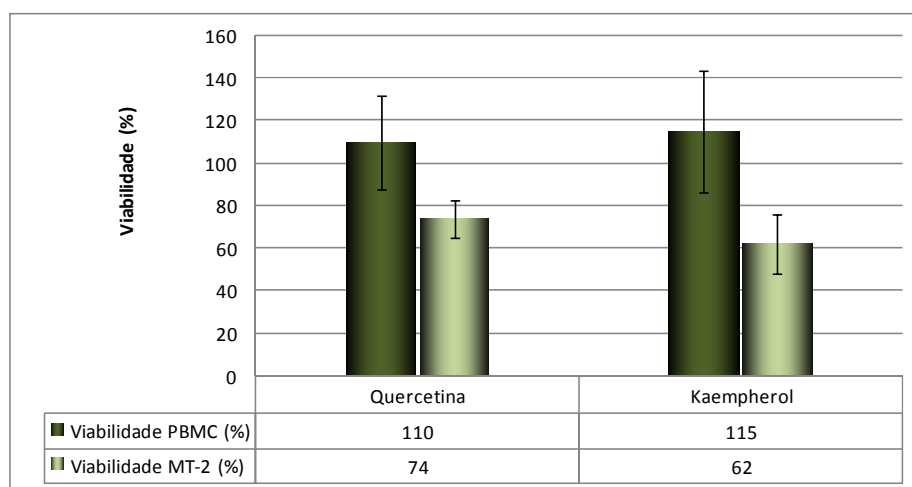


Figura 35 – Viabilidade de células MT-2 e PBMC de pacientes saudáveis soronegativos medida pelo método de exclusão de Trypan Blue. A viabilidade foi avaliada após 24 horas de tratamento com quercetina e kaempherol a 100  $\mu\text{M}$  assim como as células rastreadas por AFM. A viabilidade celular está expressa em percentual em relação ao controle das células não tratadas com quercetina e kaempherol a 100  $\mu\text{M}$ .

---

Como é possível observar na figura 35, a viabilidade de PBMC não é diminuída na presença de quercetina e kaempferol. Pelo contrário, PBMC apresenta um aumento de viabilidade na presença destes compostos polifenólicos. No entanto, MT-2 apresenta uma diminuição na viabilidade tanto na presença de quercetina quanto na presença de kaempferol. Estes resultados estão de acordo com os resultados demonstrados anteriormente que indicam um papel antiviral e citotóxico específico de quercetina e kaempferol para células MT-2, células permanentemente infectadas pelo HTLV-1.

### ***5.5 Avaliação do impacto de quercetina na produção de citocinas em PBMC e células THP-1 frente à estimulação inespecífica e específica para o HTLV-1.***

Para avaliar o potencial imunomodulatório da quercetina, duas características da atividade de quercetina foram avaliadas, sendo a primeira a produção de citocinas e a segunda a proliferação celular.

Como primeiro passo, a acumulação de mRNA de IFN- $\gamma$  foi avaliada em células THP-1 estimuladas ou não com PMA. Na figura 36, é possível observar os valores normalizados da acumulação de mRNA de IFN- $\gamma$  após estimulação com PMA e com quercetina. A estimulação com PMA promoveu a acumulação de mRNA de IFN- $\gamma$  por células THP-1 que não foi verificada no controle não estimulado com PMA.

---

Nas células THP-1 estimuladas com PMA e posteriormente tratadas com quercetina, foi possível verificar uma diminuição estatisticamente significativa na acumulação de mRNA de IFN- $\gamma$  em todas as concentrações avaliadas, com exceção de quercetina a 0,1  $\mu$ M. Uma pequena indução de acumulação de mRNA de IFN- $\gamma$  nas células incubadas apenas com quercetina também pode ser observada. No entanto, esta indução não se compara com a magnitude de indução promovida pelo PMA.

Quando a proporção de diminuição da acumulação em relação ao controle foi avaliada (figura 36 B), observa-se que quercetina, em todas as concentrações testadas, foi capaz de inibir a acumulação de mRNA de IFN- $\gamma$  induzida por PMA com diferença estatisticamente significativa. Esta diminuição da acumulação de mRNA de IFN- $\gamma$  foi de aproximadamente 60 vezes em relação aos controles não estimulados com PMA.

Avaliação da ação de quercetina, em diferentes concentrações, na acumulação de mRNA de IFN- $\gamma$  em células THP-1 estimuladas com PMA

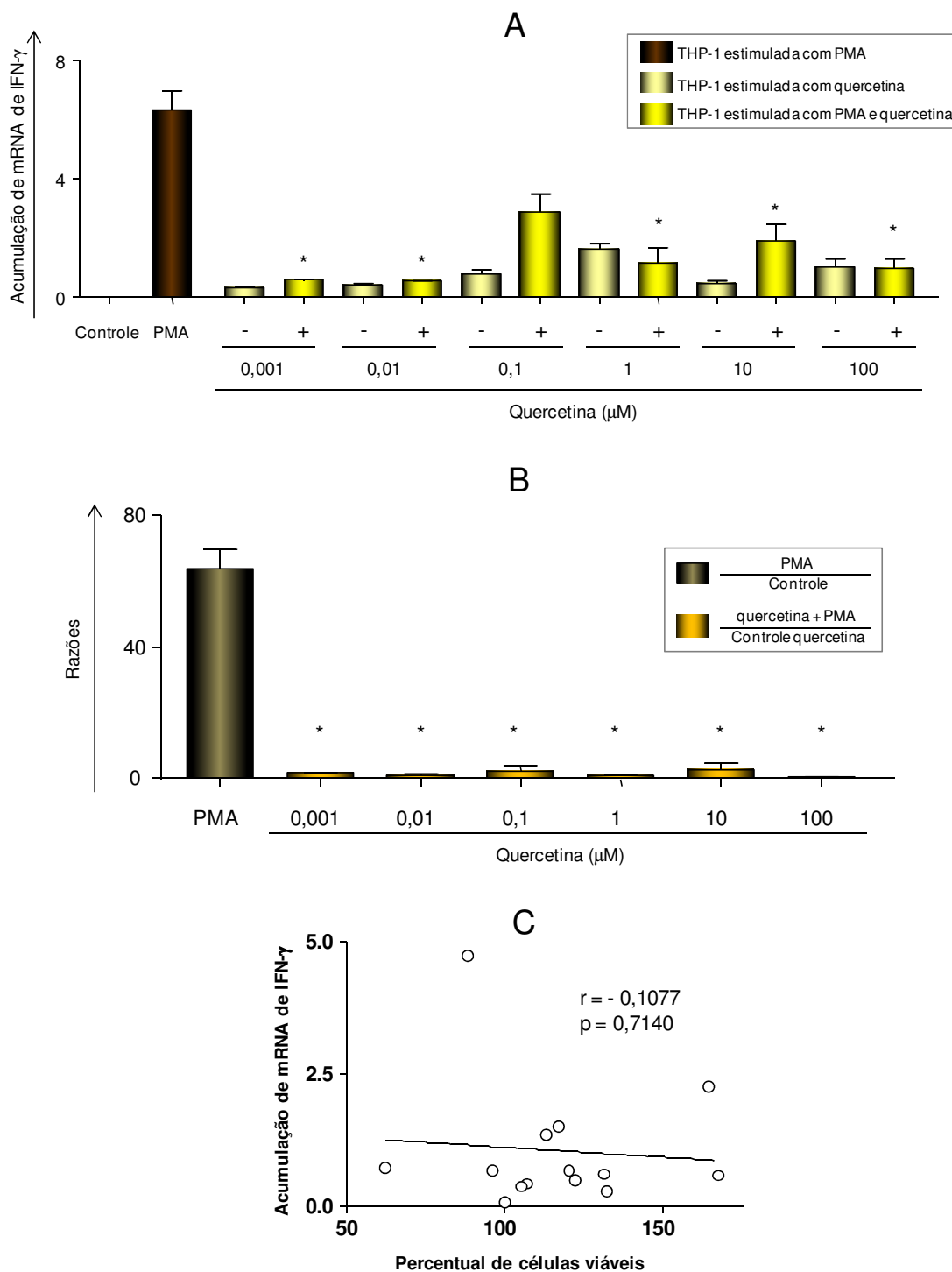


Figura 36 – A: Acumulação de mRNA de IFN- $\gamma$ , obtida por PCR convencional, em células THP-1 após estimulação por 4 horas com PMA e posterior incubação com diferentes concentrações de quercetina por 24 horas. Os produtos de amplificação para IFN- $\gamma$  e  $\beta$ -actina foram avaliados por densitometria e os valores obtidos foram divididos para a obtenção dos valores de



---

acumulação de mRNA de IFN- $\gamma$  normalizados. A: Média das duplicatas da razão IFN- $\gamma$ / $\beta$ -actina, para as amostras apenas com quercetina (em cor creme) e na presença de quercetina e PMA (em amarelo), juntamente com o desvio-padrão. O asterisco (\*) indica presença de diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle de PMA. B: Proporção média da acumulação de mRNA de IFN- $\gamma$  em THP-1 estimulada com PMA em relação ao controle. A proporção foi calculada através da razão da acumulação de mRNA de IFN- $\gamma$  da amostra estimulada com PMA em relação ao controle não estimulado. Para as amostras estimuladas com quercetina, a proporção foi feita através da razão entre as amostras estimuladas com PMA em relação as não estimuladas, em cada concentração avaliada. C: Correlação de Spearman demonstrando que não há correlação entre a acumulação mRNA codificador de IFN- $\gamma$  e morte celular. Diferença estatisticamente significativa foi considerada quando  $p < 0,05$ .

A análise de correlação de Spearman entre acumulação de mRNA de IFN- $\gamma$  e a viabilidade de THP-1 está ilustrada na figura 36C e demonstrou que não há correlação ( $p = 0,71$ ).

Estes dados indicam o potencial de quercetina na inibição de IFN- $\gamma$ , uma citocina pró-inflamatória que participa da patogênese de diversas enfermidades, incluindo a patogênese da infecção pelo HTLV-1.

Para a avaliação de produção de IFN- $\gamma$  e outras citocinas decorrente da estimulação por RecTax, PBMC de dois pacientes saudáveis foram estimulados com a proteína e incubados na presença de quercetina em diversas concentrações por 24 horas. Após o período de incubação, a viabilidade das amostras foi avaliada e os sobrenadantes foram recolhidos e posteriormente avaliados para a presença de IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-4, IL-5 e IL-2 por *Cytometric Bead Array (CBA)*.

---

Tabela 1 – Viabilidade de PBMC de indivíduos soronegativos frente à estimulação com RecTax e Quercetina a 100  $\mu$ M por 24 horas.

	RecTax	Quercetina	Viabilidade (%)*
Controle Celular	-	-	100
DMSO	-	-	99,9
RecTax	+	-	99,5
Quercetina (100 $\mu$ M)	-	+	99,1
Quercetina + RecTax	+	+	99,76

\* O desvio-padrão da viabilidade destas amostras variou entre 5 a 10%

A viabilidade de PBMC foi igualmente avaliada e apresentou-se bastante elevada, próxima de 100%, após incubação por 24 horas, tanto com quercetina, em diferentes concentrações, quanto com RecTax (tabela 1). Desta forma, alterações no perfil de produção de citocinas devem ser atribuídas a estimulação e interação de RecTax e quercetina com as células e não à citotoxicidade destes dois estímulos.

## Avaliação da produção de citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-4, IL-5 e IL-2 por *Cytometric Bead Array*

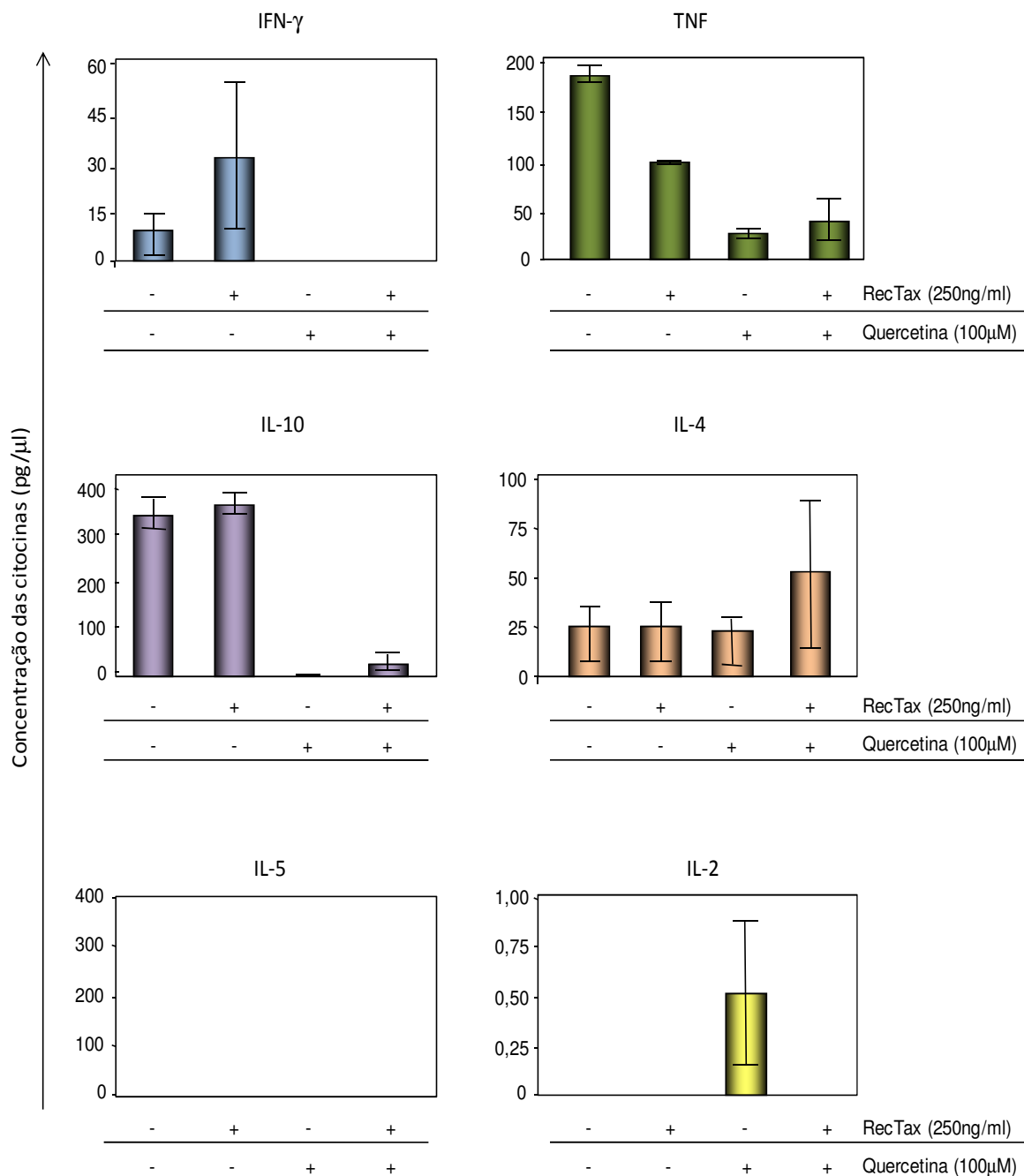


Figura 37 – Expressão de IFN- $\gamma$  (em azul), TNF (em verde), IL-10 (em roxo), IL-4 (em rosa), IL-5 (não houve produção) e IL-2 (em amarelo) avaliadas por *Cytometric Bead Array* (CBA), após estimulação (+) ou não (-) com RecTax a 250ng/ml e na presença (+) ou ausência (-) de

---

quercetina à 100µM por 24 horas. As barras representam os valores médios das triplicatas com o desvio-padrão representado junto às barras.

Os resultados da produção de citocinas (figura 37) evidenciaram que houve uma produção basal de IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10 e IL-4. Após estimulação com RecTax, houve indução da produção em especial de IFN- $\gamma$ . IL-10 e IL-4 não apresentaram mudança na sua produção e TNF apresentou diminuição na sua produção, após a estimulação com RecTax. Quercetina, na concentração de 100µM, foi capaz de modular todas as citocinas produzidas: IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10 e IL-4. Esta modulação pode ser observada tanto nos níveis basais quanto nos níveis estimulados de produção destas citocinas. No caso de TNF, quercetina teve um maior impacto na diminuição da produção desta citocina do que RecTax.

Em outra análise, buscou-se avaliar a correlação que as citocinas apresentavam entre si. Considerando que IL-5 e IL-2 apresentaram baixos níveis de expressão, foi feita a correlação entre as citocinas mais expressivas e, portanto, mais importantes no contexto aqui avaliado, sendo elas: IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10 e IL-4.

Correlação de Spearman entre as citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10 e IL-4 após estimulação de PBMC com RecTax e quercetina

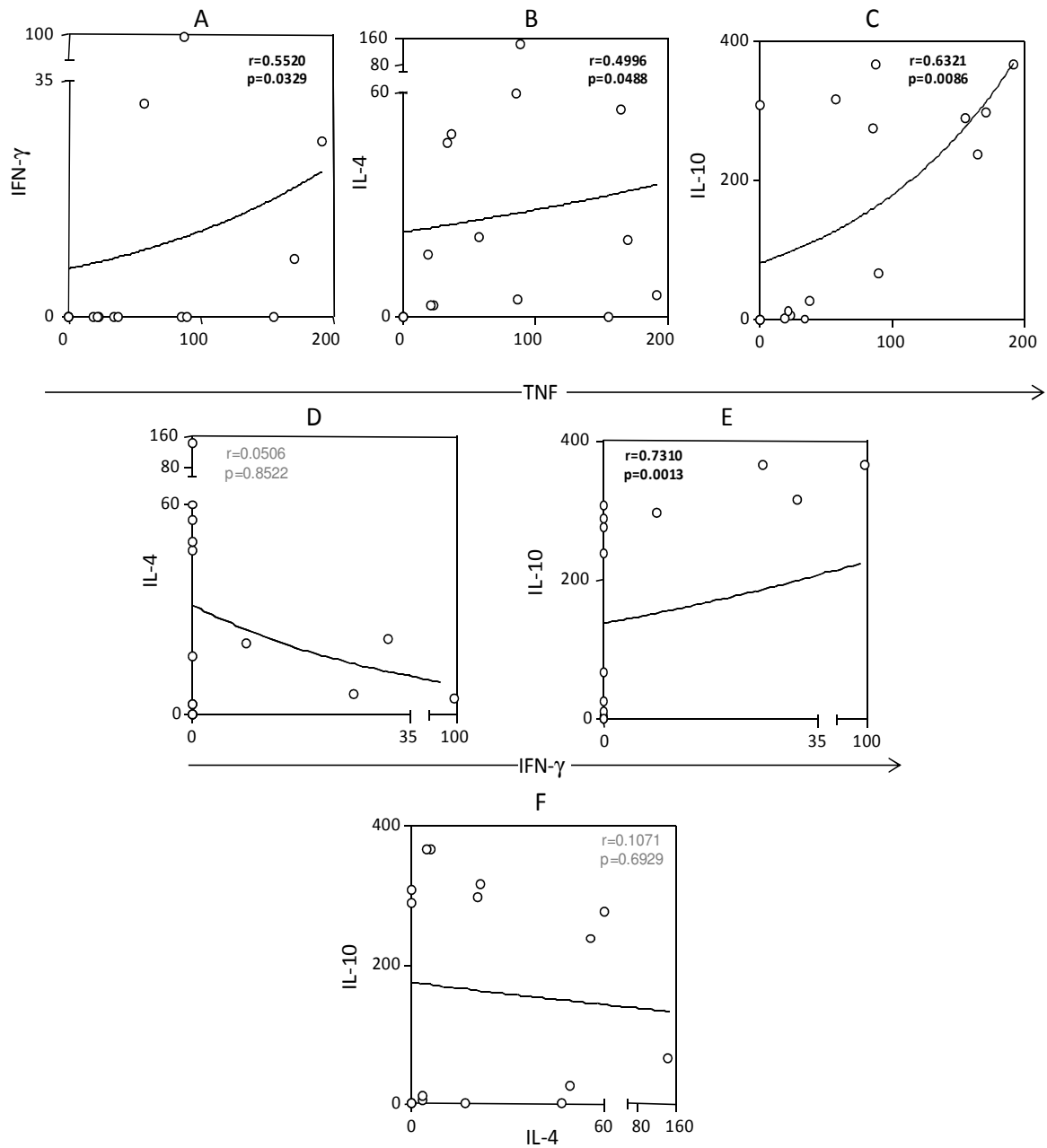


Figura 38 –Correlação de Spearman entre as citocinas TNF e IFN- $\gamma$  (A), IL-4 (B), IL-10 (C), IFN- $\gamma$  e IL-4 (D), IL-10 (E) e IL-10 e IL-4 (F). A curva nos gráficos representa a regressão não-linear que se refere à concentração das citocinas comparadas. O valor de r representa o coeficiente de correlação (varia de 0 a 1) das amostras e o valor de p indica diferença estatisticamente significativa, caso  $p < 0,05$ .

---

A figura 38 apresenta os resultados de correlação entre as quatro citocinas de maior expressão. Foi possível observar correlação direta estatisticamente significativa entre TNF e IFN- $\gamma$  ( $p=0,0329$ ), TNF e IL-4 ( $p = 0,0488$ ) e TNF e IL-10 ( $p = 0,0086$ ) e IFN- $\gamma$  e IL10 ( $p = 0,0013$ ). As correlações de IL-4 x IFN- $\gamma$  (figura 38D) e IL-4 e IL-10 (figura 38F) apresentaram valores de “r” próximos de 0 e com linha de tendência demonstrando uma provável correlação inversa, porém não estatisticamente significativa ( $p>0.05$ ).

Foi feita igualmente a correlação entre IFN- $\gamma$  e TNF, citocinas pró-inflamatórias, em relação as razão entre IL-4, citocina imunomodulatória, e IL-10, citocina antiinflamatória (BRITO-MELO *et al.*, 2007). A razão entre IL-4 e IL-10 foi feita uma vez que IL-10 apresentou, adversamente, comportamento semelhante as citocinas pró-inflamatórias na presença de quercetina. A razão indicará assim uma resposta balanceada da ação de quercetina na resposta imunomodulatória /antiinflamatória. A análise de correlação foi feita utilizando-se correlação de Pearson, apropriada para dados paramétricos.

Correlação de Spearman e Razões entre expressão citocinas da resposta inflamatória (TNF e IFN- $\gamma$ ) e citocinas da resposta modulatória/antiinflamatória (IL-4 e IL-10) frente a estimulação com RecTax e quercetina

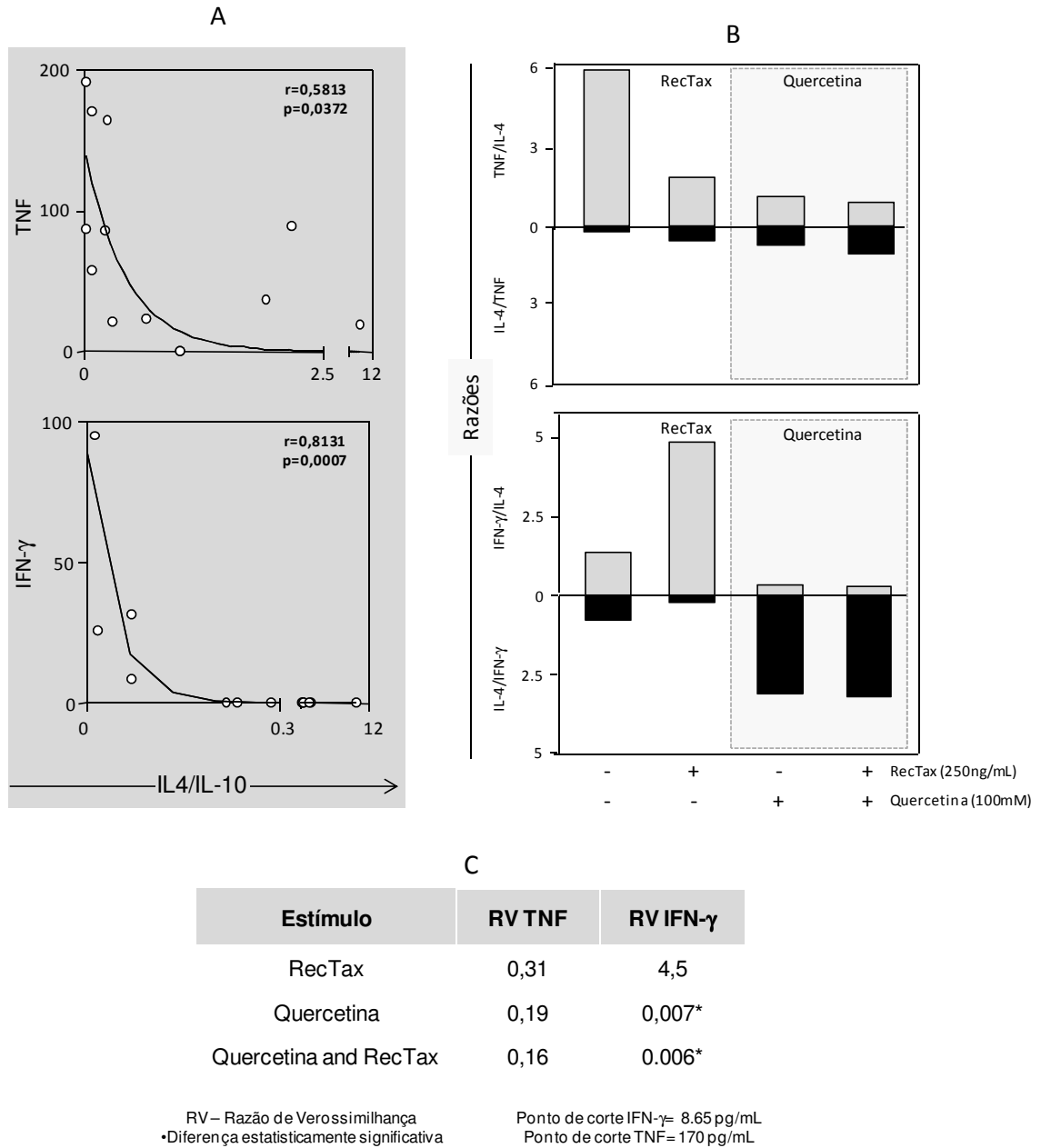


Figura 39 – A: Correlação de Spearman entre as citocinas TNF e IFN- $\gamma$  e a razão IL-4/IL-10. B: Razão entre a expressão de IFN- $\gamma$  e TNF em relação à expressão de IL-4 nas amostras controle (primeira barra), estimuladas com RecTax (segunda e quarta barra) e estimuladas com quercetina (terceira e quarta barra). B: Valores de razão de verossimilhança (RV) de TNF e

---

IFN- $\gamma$  em relação a IL-4. A RV de cada amostra tratada com os diferentes estímulos foi calculada considerando o ponto de corte de cada citocina, que corresponde à média do controle não tratado. Valores de RV abaixo de 0,1 e acima de 10 indicam diferença estatisticamente significativa (Jaeschke et al., 1994) que está indicada pelo asterisco (\*).

A figura 39 (A) apresenta os resultados da correlação da resposta pró-inflamatória versus imunomodulatória/antiinflamatória, entre IFN- $\gamma$  e TNF em relação a razão IL-4/IL10. Na correlação da resposta pró-inflamatória versus imunomodulatória/antiinflamatória, o mesmo fenômeno de correlação inversa foi observado, apresentando diferença estatisticamente significativa quando se comparou os níveis das citocinas pro-inflamatórias TNF ( $p=0,0327$ ) e IFN- $\gamma$  ( $p=0,0007$ ) em relação a razão IL-4/IL10.

Para avaliar o impacto da quercetina nestas duas citocinas, foi calculado a razão de TNF e IFN- $\gamma$  em relação à expressão de IL-4, na presença e na ausência da quercetina (TNF ou IFN- $\gamma$ / IL-4 e IL-4/ TNF ou IFN- $\gamma$ ). Em seguida, a razão de verossimilhança (RV) destas citocinas foi calculada para avaliar a significância do impacto da quercetina na produção e expressão destas citocinas. Valores de RV acima de 10 indicam uma expressão elevada, enquanto que valores de RV abaixo de 0,1 indicam expressão reduzida em comparação com a outra citocina (GREINER et al., 1995; JAESCHKE et al., 1994). Os resultados estão demonstrados na figura 39C.

A figura 39B demonstra uma maior proporção de TNF e IFN- $\gamma$  na ausência de quercetina, enquanto que há uma maior proporção de IL-4 na presença da droga. Os valores de RV na tabela (figura 39C) confirmam estes dados,



---

demonstrando que RecTax induz aproximadamente 4 vezes mais a expressão de IFN- $\gamma$  do que de IL-4, enquanto que quercetina apresenta proporção aproximadamente 100 vezes menor (LR=0,007) da expressão da citocina pró-inflamatória em relação a citocina imunomodulatória. Na presença de RecTax, quercetina ainda é capaz de manter a proporção de IL-4 em 100 vezes maior em relação IFN- $\gamma$  (LR=0,007). Para TNF, a análise de Razão de verossimilhança não demonstrou valores que representam diferença estatisticamente significativa.

***5.6 Avaliação do impacto de quercetina na proliferação celular de PBMC proveniente de indivíduos não infectados e infectados pelo HTLV-1, assintomáticos e portadores de HAM/TSP.***

No intuito de verificar o impacto de quercetina na proliferação celular, foi avaliada a viabilidade de PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (n = 6) – assintomáticos (n = 3) e portadores de HAM/TSP (n = 3) - e de indivíduos soronegativos saudáveis (n = 4) após estimulação com PHA, um forte indutor de proliferação celular, e quercetina (100 $\mu$ M) por 72 horas. Após a incubação, as células foram avaliadas utilizando o ensaio de MTT, sendo que os resultados ilustrados na figura 40 foram expressos em absorbância medida em 595 nm.

Impacto de quercetina na proliferação de PBMC de indivíduos não infectados e infectados pelo HTLV-1 após estimulação com PHA

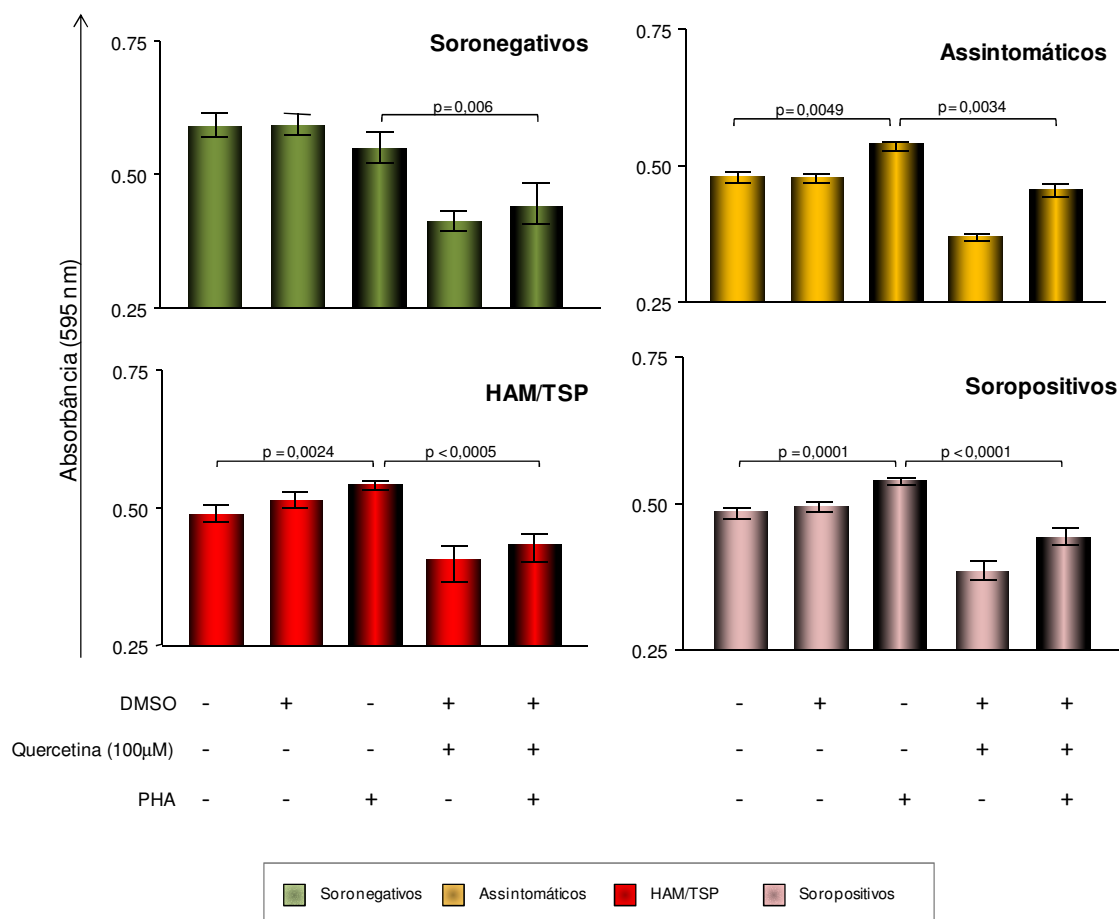


Figura 40 – Impacto de quercetina na proliferação de PBMC de indivíduos soronegativos saudáveis (N = 4), indivíduos assintomáticos (N = 3), pacientes portadores de HAM/TSP (N = 3) e indivíduos soropositivos correspondentes a soma dos dois últimos grupos (N = 6) após estimulação (+) ou não (-) com PHA a 2,5µg/mL e na presença (+) ou ausência (-) de quercetina à 100µM por 72 horas e avaliada pelo ensaio de MTT. A droga foi diluída em DMSO e por este motivo um controle com o diluente a 0,12% foi igualmente incluído. Os resultados estão expressos em absorbância medida a 595 nm e se referem a um experimento realizado em quadruplicata para cada paciente. Os grupos estão identificados pelas cores na legenda embaixo do gráfico. Valores de  $p < 0,05$  indicam diferença estatisticamente significativa.

Na figura 40, estão ilustrados os resultados obtidos para PBMC de pacientes soropositivos e soronegativos para HTLV-1 após estimulação com PHA e incubação com quercetina. Os resultados demonstraram que o PHA promoveu proliferação celular em relação ao controle sem estímulo, com excessão do grupo dos indivíduos soronegativos. O percentual de proliferação celular (figura 41) foi calculado conforme descrito no item 3.8.2, utilizando os valores de absorbância para cada grupo.

Os resultados de proliferação celular indicaram que houve proliferação celular em todos os grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1, demonstrando diferença estatisticamente significativa do grupo de soropositivos, Assintomáticos e HAM/TSP em relação ao grupo de indivíduos soronegativos.

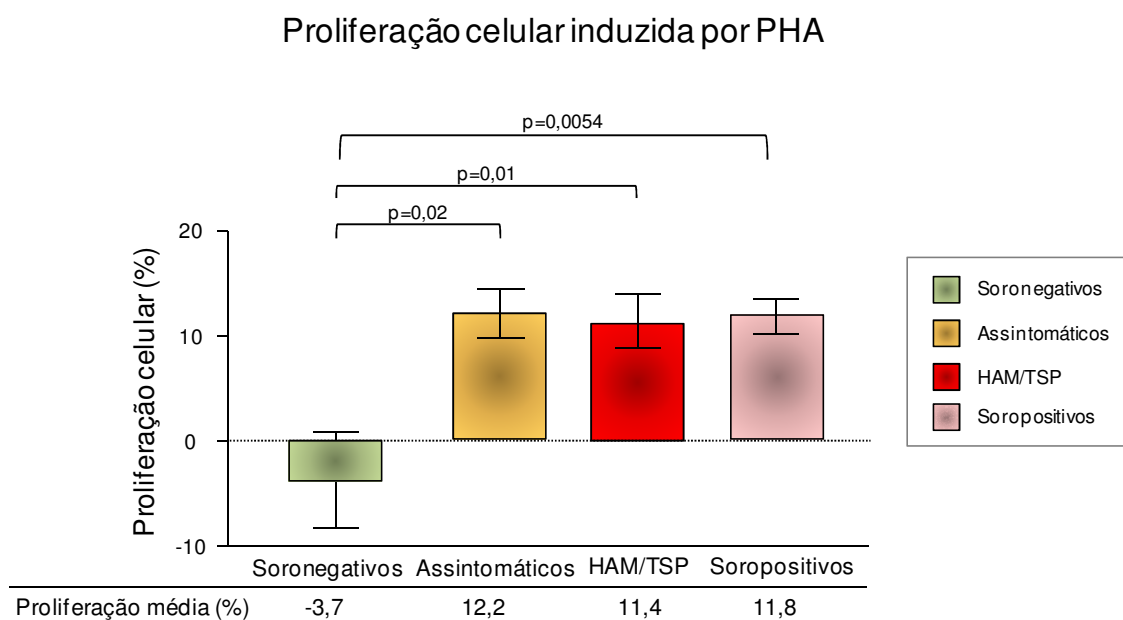


Figura 41 – Proliferação celular de PBMC, avaliada pelo ensaio de MTT, de indivíduos soronegativos saudáveis (N = 4), indivíduos assintomáticos (N = 3), pacientes portadores de HAM/TSP (N = 3) e indivíduos soropositivos correspondentes a soma dos dois últimos grupos (N = 6) após estimulação com PHA a 2,5µg/ml por 72 horas. A legenda a direita mostra as

---

cores que representam cada grupo e os valores abaixo do gráfico indicam o percentual médio de proliferação celular apresentada por cada grupo. Os resultados são referentes a um experimento realizado em quadruplicata para cada paciente. Valores de  $p < 0,05$  indicam diferença estatisticamente significativa.

Em PBMC após a estimulação com ambos, PHA e quercetina, foi observada uma diminuição da absorbância em PBMC de todos os grupos testados em relação às células estimuladas na ausência de quercetina, no entanto, apenas foi observada diferença estatisticamente significativa no grupo dos soropositivos.

Na figura 42, estão ilustrados os resultados de inibição da proliferação em percentual e valores de inibição média. A inibição da proliferação celular foi calculada através da absorbância de PBMC estimulado com PHA subtraída da absorbância de PBMC estimulado com quercetina e PHA, dividido pela absorbância de PBMC estimulado com PHA vezes 100 (ver item 3.8.2).

Os indivíduos assintomáticos apresentaram menor inibição da proliferação celular (14,8%) em relação a pacientes HAM/TSP (21,4%), no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre a inibição da proliferação celular destes dois grupos ( $p=0,2$ ) e igualmente em relação ao grupo dos soropositivos ( $p>0,05$ ).

---

## Inibição da Proliferação celular promovida por quercetina em indivíduos infectados pelo HTLV-1

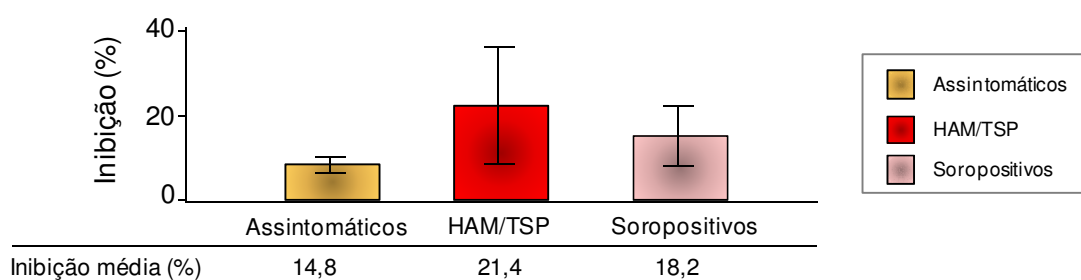


Figura 42 – Inibição da proliferação celular de PBMC, avaliada pelo ensaio de MTT, de indivíduos assintomáticos (N = 3), pacientes portadores de HAM/TSP (N = 3) e indivíduos soropositivos correspondentes a soma dos dois últimos grupos (N = 6) após estimulação com PHA a 2,5µg/ml e na presença de quercetina à 100µM por 72 horas. A legenda a direita mostra as cores que representam cada grupo e os valores abaixo do gráfico indicam a inibição percentual média apresentada por cada grupo testado. Os resultados são referentes a um experimento realizado em quadruplicata para cada paciente.

Em outra análise, os resultados evidenciaram que houve uma diminuição na viabilidade de PBMC. A figura 43 ilustra a viabilidade de PBMC dos grupos avaliados na presença de quercetina a 100µM após 72 horas de tratamento com a droga.

## Viabilidade celular após 72 horas de tratamento com quercetina

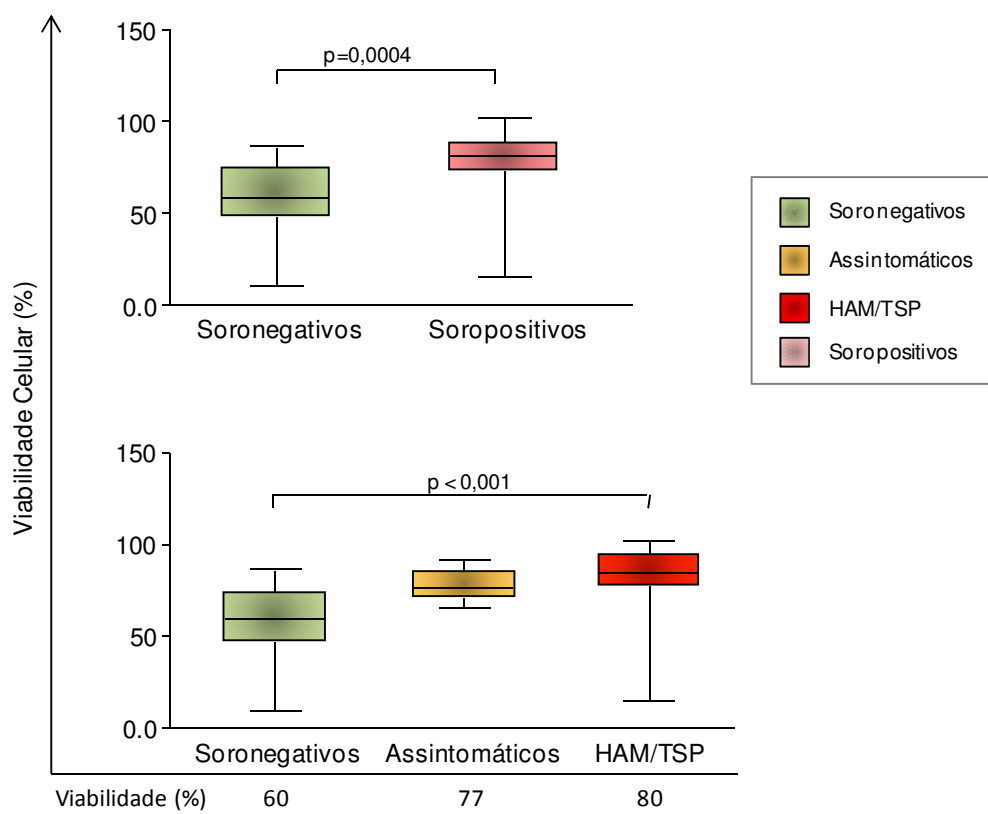


Figura 43 – Viabilidade celular de PBMC, avaliada pelo ensaio de MTT, de indivíduos soronegativos saudáveis (N = 4), indivíduos assintomáticos (N = 3), pacientes portadores de HAM/TSP (N = 3) e indivíduos soropositivos correspondentes a soma dos dois últimos grupos (N = 6) após 72 horas na presença de quercetina à 100 $\mu$ M. Os valores abaixo do gráfico indicam a viabilidade percentual média apresentada por cada grupo testado, que são identificados pelas cores representadas na legenda a direita. Os resultados são referentes a um experimento realizado em quadruplicata para cada paciente. Valores de  $p < 0,05$  indicam diferença estatisticamente significativa.

A avaliação da viabilidade apresentada pelos grupos indicou uma diferença estatística significativa quando a viabilidade de indivíduos soropositivos foi comparada à de soronegativos como pode ser observado no primeiro gráfico da figura 43. A viabilidade de PBMC de indivíduos HAM/TSP foi a maior entre

---

os grupos (80%) seguida dos assintomáticos (77%) e dos indivíduos soronegativos (60%). Houve diferença estatisticamente significativa, igualmente, entre a viabilidade de PBMC de pacientes HAM/TSP e indivíduos soronegativos ( $p < 0,001$ ), no entanto, não houve diferença significativa entre este último grupo e os indivíduos assintomáticos (figura 43 – segundo gráfico).

Estes resultados indicam que a inibição da proliferação de PBMC de pacientes HAM/TSP não está associada à citotoxicidade da droga, ou seja, a morte celular, uma vez que este grupo apresentou a mais alta viabilidade entre os grupos examinados neste estudo.

---

*"There are no facts, only interpretations."  
Friedrich Nietzsche (1844-1900)*

## ***Discussão***



---

## **6 Discussão**

O estudo de retrovírus animais e humanos passou por um grande avanço na década de 70 e 80 com o desenvolvimento do ensaio de transcriptase reversa e o avanço no manejo de cultivo de células de linhagem contínua. Como consequência, em 1981, Robert Gallo e colaboradores descreveram e comprovaram a descoberta do primeiro retrovírus humano causador de doença, o HTLV-1 (VAHLNE, 2009; GALLO, 2005).

Esta descoberta coroou a importância do estudo de retrovírus e do desenvolvimento de técnicas em retrovirologia, antes vistos como de pouca importância na saúde pública. Estes eventos antecederam a um dos principais momentos na história da ciência e da sociedade moderna, a descoberta do segundo retrovírus humano capaz de causar doença, o HIV.

Ao contrário do HTLV-1, o HIV se disseminou rapidamente ao redor do mundo, o que levou a uma pandemia mundial atingindo todas as classes sociais, em especial indivíduos que transitavam entre países, com elevado nível sócio-econômico, usuários de drogas e homossexuais (WEISS, 2008). Este vírus apresentava modo de transmissão semelhante ao HTLV, porém era capaz de causar mortes rápidas angariando a atenção dos órgãos governamentais de saúde pública (VAHLNE, 2009).

Ainda não há cura e nem vacina para o HIV, mas com todos os esforços voltados para o vírus nos últimos 25 anos, atualmente já se dispõe de

---

ferramentas de prognóstico e de abordagens terapêuticas para o controle da transmissão viral e acompanhamento de pacientes HIV-positivos (FLEXNER et al, 2010).

Atualmente, já se dispõe de 21 antiretrovirais específicos para HIV, sendo 13 inibidores de transcriptase reversa do HIV-1/2 (BOYER et al., 2006). Das drogas disponíveis para terapia antiretroviral, nenhuma apresenta atividade na diminuição da carga proviral de pacientes portadores de HAM/TSP (NAKAMURA et al., 2009). Desta forma, a terapia específica anti-HTLV permanece desconhecida, negligenciada e sem alternativas terapêuticas eficazes para o tratamento de pacientes infectados pelo vírus apresentando manifestações clínicas (OH e JACOBSON 2008; MANSOURI et al., 2009; NAKAMURA et al., 2009), mesmo após 30 anos de descobrimento.

Poucos estudos têm buscado investigar compostos com atividade anti-retroviral específica para HTLV-1 (BALESTRIERI et al., 2008; MANSOURI et al., 2009), em especial no campo de drogas de origem natural (MANSOURI et al., 2009). Menores ainda são os estudos de drogas apresentando atividade imunomodulatória com aplicabilidade nas doenças inflamatórias associadas ao vírus (SANTOS et al., 2004).

Buscando contribuir com a investigação *in vitro* de novas drogas com atividade anti-HTLV-1, neste trabalho, foi avaliada a atividade antiviral dos compostos polifenólicos quercetina e kaempferol no contexto da infecção pelo HTLV-1. A atividade imunomodulatória e anti-proliferativa de quercetina foi igualmente

---

avaliada, considerando o histórico progresso desta droga como potente reguladora do sistema imune e da proliferação celular (HÄMÄLÄINEN *et al.*, 2007; MIN *et al.*, 2007; ROGERIO *et al.*, 2007; SHARMA *et al.*, 2007; ROGERIO *et al.*, 2009; HUSHMENDY *et al.*, 2009; KAO *et al.*, 2010).

Para avaliar a atividade dos compostos polifenólicos, primeiramente foi necessário avaliar a toxicidade das drogas em células infectadas pelo HTLV-1. Como resultado da avaliação da viabilidade de células MT-2, após tratamento com os compostos polifenólicos quercetina e kaempherol, observou-se toxicidade estatisticamente maior dos compostos para as células MT-2 em relação à PBMC.

Em conformidade com os resultados de viabilidade, as imagens obtidas por AFM corroboram a hipótese que as drogas são capazes de induzir morte nestas células, que foi verificada através da visualização de poros na membrana de MT-2. As imagens de AFM revelaram que o efeito de quercetina e kaempherol é claramente citotóxico e não citoestático. A figura 44 apresenta hipóteses para explicar o efeito dos flavonóides nas células MT-2.

## Hipóteses de efeito de quercetina e kaempferol em MT-2

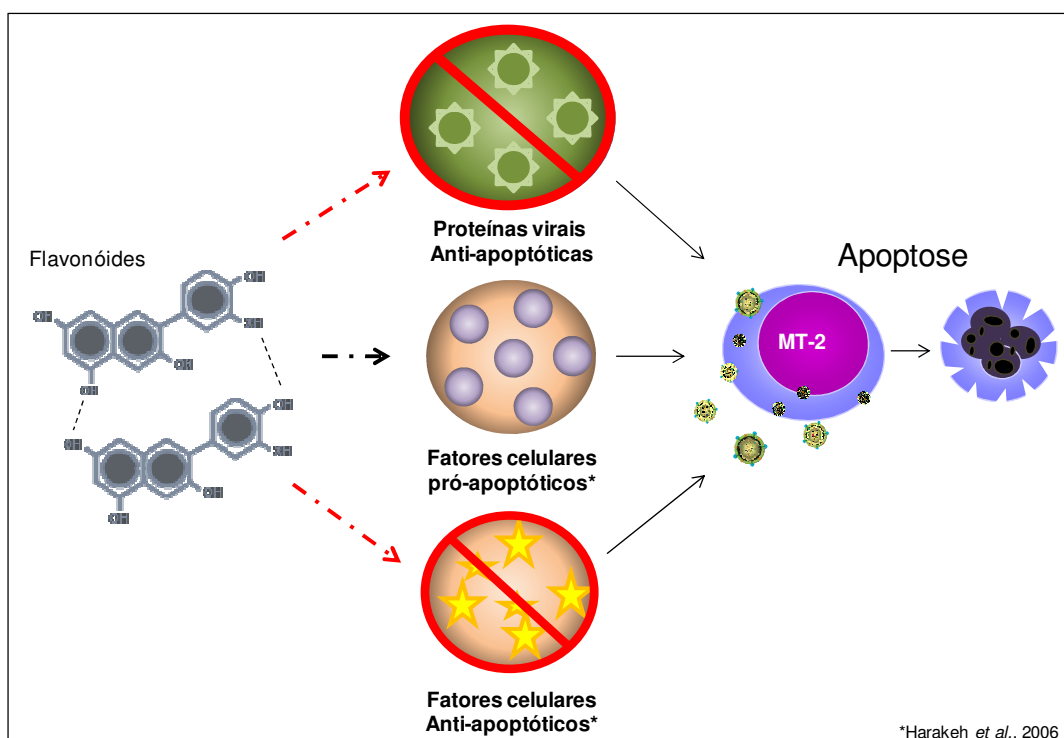


Figura 44 – Representação esquemática de hipóteses para explicar a morte celular verificada pelo ensaio de viabilidade e por Microscopia de Força Atômica. Os flavonóides quercetina e kaempferol poderiam inibir proteínas virais com atividade anti-apoptótica, como a proteína Tax do HTLV-1, que induz a imortalização celular das células infectadas. Estes flavonóides poderiam igualmente atuar inibindo fatores anti-apoptóticos celulares e induzindo fatores pró-apoptóticos em células infectadas pelo HTLV-1 como já proposto por Harakeh e colaboradores (2006).

Todos os vírus necessitam do maquinário celular para se multiplicar e perpetuar no hospedeiro, o que os torna exímios manipuladores das vias de sinalização e de enzimas e aparatos celulares. A síntese de DNA celular ocorre somente na fase S do ciclo celular e, portanto, os vírus que dependem da DNA polimerase celular devem esperar que a célula infectada entre na fase S espontaneamente ou devem induzir o processo através da expressão de um ou

---

mais oncogenes virais como o gene *tax* do HTLV-1, no estágio inicial da infecção (GOFF, 2004).

Desta forma, a presença de proteínas oncogênicas, como a proteína Tax do HTLV-1, permite que o vírus, acelere a transição de G1 para S, ou ainda, paralise o ciclo celular na fase S e mantenha a replicação do seu genoma constante e elevada (BOXUS et al., 2008). Esta célula tem poucas chances de entrar em apoptose, favorecendo assim, que o vírus se dissemine pelo hospedeiro através da multiplicação de células diferenciadas que, necessitam de ser ativadas para se multiplicar, caso contrário não se dividem e permanecem circulantes até determinado tempo, como no caso de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (WATTEL et al., 1995; TAYLOR e MATSUOKA, 2005; MEEKINGS et al., 2008; UMEKI et al., 2009).

Anteriormente à imortalização, os vírus podem induzir a expressão de fatores anti-apoptóticos e inibir a expressão de fatores pró-apoptóticos, como uma estratégia de sobrevivência (GOFF, 2004). Como já proposto por Harakeh e colaboradores (2006), os flavonóides poderiam atuar inibindo estes fatores anti-apoptóticos celulares e induzindo os fatores pró-apoptóticos em células infectadas pelo HTLV-1, diretamente ou indiretamente, através da inibição dos fatores virais que promoveram o desequilíbrio das vias apoptóticas ao estabelecerem infecção produtiva (HARAKEH et al., 2006).

Os flavonóides quercetina e kaempferol poderiam igualmente induzir apoptose através da inibição de proteínas virais com atividade anti-apoptótica, como a

---

proteína Tax do HTLV-1, que induz a imortalização celular das células infectadas pelo vírus. A proteína Tax do HTLV-1 é uma das proteínas mais bem estudadas deste vírus, com ampla atividade em células infectadas pelo vírus (JEANG et al., 1990; JEANG et al., 1997).

Logo após infecção das células e integração do genoma viral à célula hospedeira, Tax é uma das primeiras proteínas a ser expressa, sendo um marcador de sucesso de infecção e integração do genoma viral ao genoma da célula hospedeira em estudos de infecção in vitro (JONES et al., 2008). Uma vez expressa, Tax inicia a transativação de LTR, que controla a expressão de genes virais e, em paralelo, Tax atua na expressão de genes celulares, especialmente para a promoção da imortalização da célula infectada (FRANCHINI, 1995; JEANG et al., 1990; JEANG et al., 1997; GRASSMANN et al., 1992; FRANKLI et al., 1995) .

Ao contrário de outras linhagens celulares infectadas pelo HTLV-1 que não expressam Tax, em MT-2, esta proteína viral apresenta-se largamente expressa em sua forma original (40 KDa) (JEANG et al., 1997; COELHO-DOS-REIS et al., 2008) e ainda, em forma fusionada à proteína do envelope, Env (Env-Tax - 69 KDa) (JEANG et al., 1997). Este fato torna esta linhagem celular um modelo adequado e conveniente para estudos da infecção pelo HTLV-1 (JEANG et al., 1997; COELHO-DOS-REIS et al., 2008).

Estudos posteriores para avaliar as vias nas quais as drogas atuam para causar morte celular apenas em MT-2 e não em PBMC são ainda necessários

---

para verificar se as drogas estudadas poderiam ser um fator desencadeador de processos apoptóticos em células MT-2 que são imortalizadas devido a atuação do HTLV-1 nestas células. Os resultados de viabilidade de MT-2 deste trabalho sugerem um potencial destas drogas no controle de células infectadas pelo HTLV-1.

Para células THP-1 tratadas com Kaempherol em concentrações intermediárias, foi verificada uma viabilidade superior em relação às concentrações mais baixas e mais altas. Este efeito é conhecido com efeito paradoxal ou efeito *Hormesis*, no qual baixas concentrações apresentam toxicidade semelhante a elevadas concentrações de uma determinada droga (STEBBING, 2009).

O efeito hormesis é reflexo de um efeito dose-resposta bifásico, no qual se observam características diferentes da droga em faixas distintas de concentração da droga avaliada. Este fenômeno não é de maneira alguma raro e é amplamente discutido na comunidade de toxicologistas. No entanto, ainda pouco é conhecido em relação aos mecanismos envolvidos no efeito de dose-resposta bifásico (MUSHAK, 2007; MUSHAK, 2009; CALABRESE, 2009; STEBBING, 2009).

Em contraposição, foi verificado que PBMC apresentou viabilidade superior a 10% em relação ao controle, após tratamento com quercetina (0,001; 0,01; 10; 100  $\mu$ M) e kaempherol (100  $\mu$ M). Este dado pode ser indício de um papel protetor contra elementos oxidantes, exercido pelos compostos polifenólicos

---

em células. Os compostos polifenólicos são excelentes antioxidantes e são comumente empregados em estudos para verificar o seu efeito em radicais livres e na cascata oxidativa em células eucariotas (DAJAS, *et al.*, 2003-A; DAJAS, *et al.*, 2003-B; HA, *et al.*, 2003; WANG & JOSEPH, 1999; SHARMA, *et al.*, 2007).

Em relação a atividade antiviral dos compostos polifenólicos quercetina e kaempherol, os resultados de acumulação de mRNA de *gag-pol* e *tax-rer*, acessados por PCR em tempo real, mostraram que quercetina e kaempherol foram capazes de influenciar a acumulação destes mRNAs virais, especialmente a acumulação de mRNA de *gag-pol*. Kaempherol foi capaz de aumentar a acumulação de mRNA de *gag-pol* em concentrações mais baixas (0,001 e 0,01  $\mu$ M), no entanto, a expressão de proteínas Gag nestas concentrações de kaempherol foram mais baixas do que o controle de DMSO, indicando que a droga está induzindo a acumulação de mRNA através do impedimento da tradução do mRNA em proteína.

No entanto, nas concentrações subseqüentes ocorre uma diminuição significativa na acumulação de mRNA de *gag-pol*, que se correlaciona inversamente com a expressão de proteínas Gag. Estes resultados indicam que em concentrações moderadas de kaempherol, ocorre uma inibição na acumulação de mRNA de *gag-pol* que foi evidenciada pela técnica de PCR em tempo real, mas ainda não é visível através da avaliação de proteínas Gag no Western Blot. Com o aumento da concentração de kaempherol (0,1 a 100  $\mu$ M), a inibição na acumulação de mRNA de *gag-pol* mantém-se praticamente



---

constante, com diminuição de 0.25 (em log), em paralelo a uma queda da expressão de proteínas Gag no Western.

Assim, em concentrações menores, kaempferol parece exercer função inibitória da tradução de proteínas Gag, e em concentrações maiores, os resultados sugerem que kaempferol promoveria uma inibição do ciclo de multiplicação viral tanto no nível traducional quanto transcricional. Estes resultados se encaixam no modelo de curva de dose-resposta bifásica, ou efeito *Hormesis* como mencionado anteriormente, refletindo a existência de dois ou mais eventos que explicam as alterações de acumulação de mRNA de *gag-pol* e a expressão de proteínas Gag.

Quando se avalia os dados de quercetina, não foi possível observar este mesmo efeito na acumulação de mRNA de *gag-pol*, mas a expressão de proteínas Gag foi consideravelmente inibida pelo aumento da concentração de quercetina, de maneira dose resposta. Estes resultados sugerem que quercetina pode exercer seu potencial antiviral através da inibição da tradução ou processamento pós-traducional de proteínas.

Na análise da acumulação de mRNA de *tax-rex*, foi possível observar pequenas alterações (menores que 0.25 log) na acumulação deste mRNA viral. O mRNA de *tax-rex* corresponde a um transcrito com processamento tardio composto por 3 exons, no qual houve uma dupla excisão de introns (*double splicing*).

## Hipótese para explicar a atividade antiviral de kaempferol no ciclo de multiplicação viral do HTLV-1

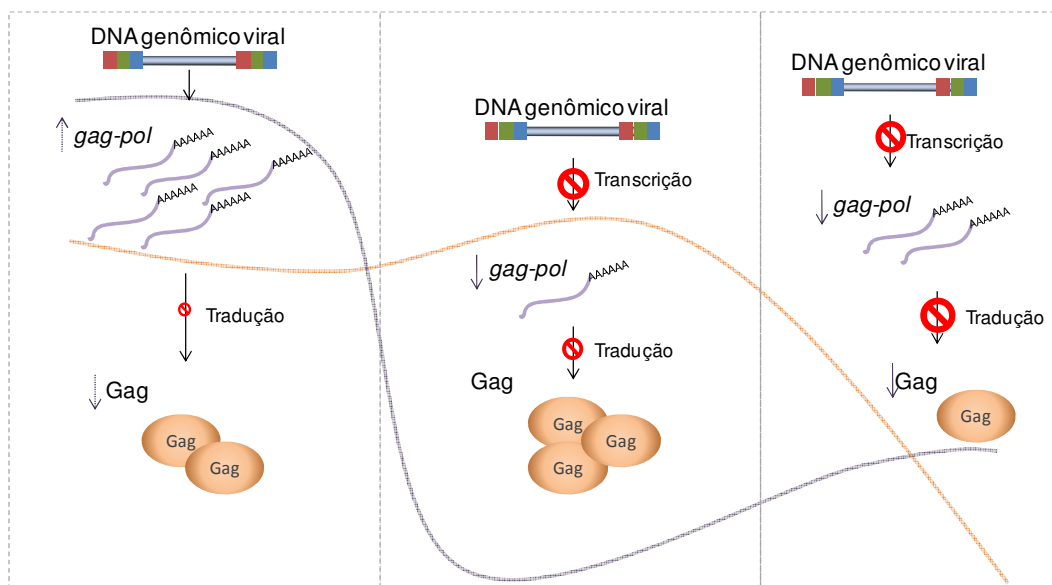


Figura 45 – Representação esquemática de hipóteses para explicar a atividade antiviral de kaempferol no ciclo de multiplicação do HTLV-1. A linha lilás representa a acumulação de mRNA de *gag-pol* e a linha rosa representa a reatividade média de proteínas Gag em função do aumento da concentração de kaempferol (0,001 a 100  $\mu\text{M}$ ). Em baixas concentrações (0,001 e 0,01  $\mu\text{M}$ ), o flavonóide induz leve diminuição na reatividade média de Gag, mas induz aumento da acumulação de mRNA de *gag-pol*, o que sugere inibição da tradução de proteínas Gag. Em concentrações intermediárias (0,1 e 1  $\mu\text{M}$ ), observa-se uma diminuição significativa da acumulação de mRNA de *gag-pol*, o que indica inibição mais expressiva no processo de transcrição. Em concentrações elevadas (10 e 100  $\mu\text{M}$ ) ocorre inibição tanto da acumulação de mRNA de *gag-pol* quanto da reatividade média de Gag indicando inibição tanto no processo de transcrição quanto na transcrição de mRNA genômico do HTLV-1.

A figura 45 demonstra a hipótese traçada anteriormente para explicar a correlação inversa observada na acumulação de mRNA de *gag-pol* e na reatividade de proteínas Gag. É evidente que alterações na acumulação de mRNA de *gag-pol* são acompanhadas de declínio na reatividade de Gag obtida

---

por Western Blot apenas em concentrações mais elevadas da droga. Em concentrações intermediárias, observa-se uma diminuição significativa na acumulação de mRNA de *gag-pol* que não é observada na reatividade de proteínas, provavelmente porque não houve tempo para que ocorresse o reflexo desta diminuição na tradução de proteínas ou, como mencionado, devido a baixa sensibilidade do Western Blot em relação a PCR em tempo real.

Segundo Li e Green (2007), o mRNA de *gag-pol* corresponde ao mRNA genômico não processado. O processamento deste mRNA de diferentes formas levará a produção de outros sete transcritos do HTLV-1. Considerando que este mRNA de *gag-pol* (ou *gag-pro-pol*) é o precursor de todos os oito mRNAs do HTLV-1, este mRNA é claramente mais abundante do que todos os outros, pois precisa ser produzido em altas taxas (LI E GREEN, 2007). A atuação de kaempherol foi claramente mais expressiva em *gag-pol* (mRNA genômico completo) do que *rex-tax* (mRNA processado) o que é indício de que esta droga não atua no processamento do mRNA, mas possivelmente na transcrição inicial do genoma do HTLV-1. A maior abundância de mRNA de *gag-pol* na célula infectada pelo vírus também pode ser um fator que favoreceu a visualização de alterações causadas por kaempherol.

Em relação aos resultados de Microscopia de Força Atômica, a avaliação da superfície de MT-2 revelou e confirmou achados anteriores da literatura que descrevem a presença de brotamento viral na superfície de MT-2 (MOROZOV E WEISS, 1999; MIYOSHI et al., 1981), além de confirmar os resultados de viabilidade celular.

---

Morozov e Weiss (1999) descreveram, de maneira clara e confiável, a presença de uma população de vírus heterogênea em relação a seu tamanho e em relação a partículas virais em MT-2. Foram evidenciadas a presença de partículas clássicas (ou densas) e partículas defectivas (leves) nestas células. As partículas clássicas apresentam o genoma íntegro do HTLV-1 e perfil de Western Blot compatível com proteínas virais de outras amostras além de MT-2. Já as partículas defectivas, apresentam genoma defectivo em sua constituição e perfil de Western Blot diferenciado. Jeang e colaboradores verificaram igualmente este perfil de Western Blot diferenciado através da evidencia de reatividade para uma proteína Env-Tax (69 KDa.) fusionada, como evidencia de um fenótipo diferenciado dos genomas defectivos integrados no genoma de MT-2.

Estes resultados confirmam achados de microscopia eletrônica que verificaram a presença de partículas densas com 110 nm de diâmetro e partículas menos densas (leves) com ausência de nucleocapsídeo (MIYOSHI *et al.*, 1981). Ambas partículas, densas e leves, foram evidenciadas em abundância na superfície de células MT-2 na microscopia eletrônica, pelos autores, em brotamento ou livres no meio (MIYOSHI *et al.*, 1981).

Os achados de partículas de HTLV-1 densas e leves de MT-2 foram confirmados pelo nosso estudo, no qual partículas virais de tamanhos distintos foram encontrados. É importante considerar que o tamanho médio de vírus em brotamento (aproximadamente 181 nm) foi maior do que o indicado pela

---

literatura (110 a 140 nm) o que confirma uma leve discordância entre os resultados de tomografia (MAJOROVITS *et al.*, 2008) e microscopia eletrônica (MIYOSHI *et al.*, 1981) em relação a Microscopia de Força Atômica (MALKIN *et al.*, 2002; KUZNETSOV *et al.*, 2004). Esta diferença pode ser atribuída a deformação que a amostra sofre pela ação do contato com a sonda ou até mesmo pela preparação da amostra para a Microscopia de Força Atômica que diminui o processo de desidratação das células, devido a maior simplicidade da preparação com uso de menos reagentes químicos.

Para a Microscopia de Força Atômica realizada no presente trabalho, não foi utilizado o reagente de glutaraldeído, composto que é utilizado para fixação e estabilização da amostra na microscopia eletrônica, que também tem a propriedade de desidratar amostras.

Adicionalmente, Majorovits e colaboradores em 2008, em um estudo buscando avaliar sinapses entre células infectadas e não infectadas pelo HTLV-1, também observaram heterogeneidade consistente no tamanho de partículas do HTLV-1 provenientes de uma outra linhagem celular, a MS9. Este estudo foi realizado utilizando Tomografia Eletrônica e o diâmetro das partículas virais derivadas de células T CD4+ naturalmente infectadas variou de 62–173 nm e de partículas virais derivadas de MS9 variou de range 46–246 nm, o que é compatível com a média de 181 nm (97 – 264 nm) (N=127) encontrada em nosso estudo.

---

Recentemente, a Microscopia de Força Atômica tem se mostrado de grande utilidade para avaliação de amostras biológicas o que é extremamente aplicável na investigação de interação vírus-hospedeiro. Em especial, o uso da Microscopia de Força Atômica vem oferecer uma nova perspectiva confiável para o estudo de vírus e patogênese viral, uma vez que estes parasitas intracelulares obrigatórios não apresentam ferramentas de visualização direta com fácil manejo para preparo de amostra (FERREIRA et al., 2008; TRINDADE et al., 2007).

Adicionalmente, a interação vírus-célula requer o conhecimento de estruturas tridimensionais das macromoléculas envolvidas e ainda entendimento da composição e arquitetura viral (MALKIN et al., 2002; TRINDADE et al., 2007; KUZNETSOV et al., 2010). No caso do HTLV-1 que não pode ser produzido, quantificado e titulado por técnicas de virologia clássica, metodologias que possibilitem a visualização de vírus na superfície celular são de grande aplicabilidade, uma vez que a preparação de amostras para microscopia é complicada, de baixa produtividade e de alto risco biológico.

No presente estudo, foi realizada uma preparação direta e relativamente simples das amostras para a realização das imagens por Microscopia de Força Atômica sem a utilização de reagentes tóxicos como glutaraldeído e tetroxido de ósmio usados para desidratar, fixar e estabilizar as amostras, como mencionado anteriormente. Mesmo assim, é relevante mencionar que a manipulação de MT-2 deve ser feito com cuidado e zelo e o tratamento destas

---

amostras com os flavonóides deve igualmente obedecer ao rigor e segurança do manejo de amostras infectadas com vírus causador de doença humana.

Em outro enfoque, a Microscopia de Força Atômica também revelou uma diminuição da liberação de vírus após o tratamento com quercetina e kaempherol, induzindo igualmente a formação de poros na membrana. Estes poros apresentavam profundidade suficiente para atravessar a membrana, o que indica que eles são resultado de morte celular. Em especial, o kaempherol foi capaz de inibir com mais expressividade a liberação de vírus na superfície de MT-2, corroborando os resultados de acumulação de mRNA de *gag-pol* avaliados por PCR em tempo real que indicam o potencial da atividade antiviral de kaempherol na inibição do ciclo de multiplicação do HTLV-1 em células MT-2.

Estes resultados verificaram e confirmaram igualmente achados anteriores que indicam o potencial da Microscopia de Força Atômica no estudo de vírus e sua interação com hospedeiro. Os resultados deste trabalho igualmente sugerem o potencial de quercetina e kaempherol como possíveis compostos antivirais no contexto de estudos buscando alternativas terapêuticas para o HTLV-1.

De acordo com a avaliação da produção de citocinas, IFN- $\gamma$  parece ser a principal citocina pró-inflamatória sensível à modulação por quercetina. Quercetina parece inibir a indução inespecífica de mRNA de IFN- $\gamma$  induzida por PMA em células THP-1, e ainda, inibir a indução específica mediada por RecTax em PBMC desta citocina (figura 46).

## Hipótese para explicar a atividade imunomodulatória de quercetina

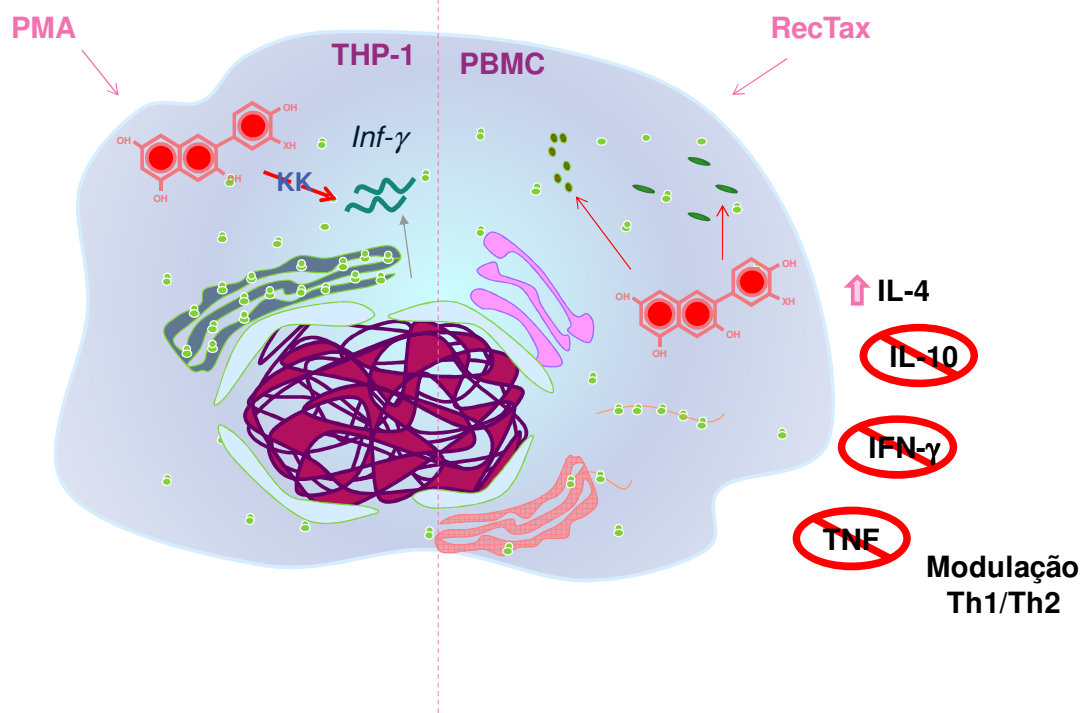


Figura 46 – Representação esquemática de hipóteses para explicar a atividade imunomodulatória de quercetina, após indução com estímulo inespecífico (PMA) ou específico (proteína Tax recombinante – RecTax). Quercetina poderia atuar inibindo kinases celulares (KK) ou moléculas sinalizadoras com atividade na cascata de indução de IFN- $\gamma$  impedindo a formação de mRNA para esta citocina e igualmente a formação da molécula de IFN- $\gamma$  em si. Este flavonóide poderia igualmente atuar estimulando fatores moduladores de IFN- $\gamma$  como IL-4 o que regulará a resposta pró- e antiinflamatória.

Em paralelo, quercetina foi capaz de estimular a resposta imunomodulatória via indução da expressão de IL-4. Estes resultados preliminares indicam que quercetina tem um papel no balanço da resposta pró-inflamatória/imunomodulatória, apresentando-se, desta forma, como uma droga em potencial para modular o sistema imune frente a estimulações antígeno-específicas.



---

Estes resultados são confirmados por estudos anteriores que verificaram o papel de quercetina na inibição de IP-10, STAT-1 e NF-kB, moléculas importantes nas vias de sinalização de IFN. Outros estudos ainda confirmam o papel de quercetina na inibição de produção de IFN- $\gamma$  e ainda a ação em outras moléculas com atividade pró-inflamatória como o óxido nítrico (HÄMÄLÄINEN et al., 2007; MIN et al., 2007; ROGERIO et al., 2007; SHARMA et al., 2007; CHEN et al., 2005; KIM et al., 2007; ROGERIO et al., 2009; KAO et al., 2010).

O efeito imunomodulatório de quercetina também é consistentemente atribuído a sua atividade de inibição de kinases e fosfatases celulares, em especial da via JAK-STAT, o que leva a inibição da diferenciação celular, proliferação e produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  (HÄMÄLÄINEN et al., 2007; STERNBERG et al., 2008, KAO et al., 2010).

Corroborando dados anteriores, a expressão constitutiva e elevada de componentes da via de JAK-STAT já foi observada em células leucêmicas provenientes de pacientes ATL, sendo associada com a progressão do ciclo celular e sobrevivência destas células (HALL E FUJII, 2005). A inibição desta via por quercetina poderia contribuir para a morte celular em células permanentemente infectadas pelo HTLV-1.

Em contraposição a estes achados, Park e colaboradores (2009) verificaram que quercetina foi capaz de balancear a resposta Th1/Th2 em modelo murino de asma alérgica através de aumento de IFN- $\gamma$ . O aumento de IFN- $\gamma$  promovido

---

por quercetina verificado *in vivo*, neste caso, pode estar associado com a ausência de IL-4 que modula a resposta pró-inflamatória.

Ainda assim, estes dados podem indicar que o poder imunomodulatório de quercetina está associado à atuação desta droga em vias super expressas, desreguladas e não necessariamente em via específicas.

Em relação à atuação de RecTax, foi possível observar que esta proteína não foi tóxica para PBMC após 24 horas de cultivo o que possibilita a sua utilização para estudos *in vitro* com foco na patogênese do HTLV-1. Outros tempos de incubação e concentração de RecTax obtida por diferentes tipos de purificação foram testados em nossa padronização (dados não demonstrados) demonstrando citotoxicidade de RecTax apenas após 96 horas de cultivo, no entanto, RecTax após 24 horas de incubação já esboça atividade na concentração de citocinas no sobrenadante, em especial aumentando IFN- $\gamma$  e diminuindo TNF. O aumento de IFN- $\gamma$  pode estar associado com a presença de domínios na proteína capazes de ativar células o que, em consequência, levará a produção de citocinas pró-inflamatórias (figura 47).

O aumento de TNF observado deve ser avaliado em estudos posteriores com maior número amostral, no entanto, este resultado pode indicar uma atividade regulatória da porção C-terminal de tax. Este resultado pode ser relacionado com os achados de Ohsugi (2009), que verificou uma maior expressão de Tax quando sua porção C-terminal foi deletada. De acordo com o autor, após

---

deleção da porção C-terminal de Tax houve um aumento da expressão da própria proteína Tax.

Adicionalmente, células transfectadas com plasmídeos expressando Tax selvagem não eram capazes de produzir partículas virais, mas células transfectadas com plasmídeos contendo a sequência de *tax* sem a porção C-terminal era capaz de formar vírions (OHSUGI, 2009).

Em paralelo, Ranjbar e colaboradores (2006) verificaram que a proteína Tat do HIV-1 do subtipo E é capaz de inibir a transcrição do gene de TNF, o que seria importante na regulação da célula hospedeira e manutenção do equilíbrio no ambiente que o vírus precisa para se multiplicar. A proteína Tat do HIV-1 é uma proteína regulatória que poderia ser considerada análoga de Tax do HTLV-1.

## Hipótese para a atuação de RecTax

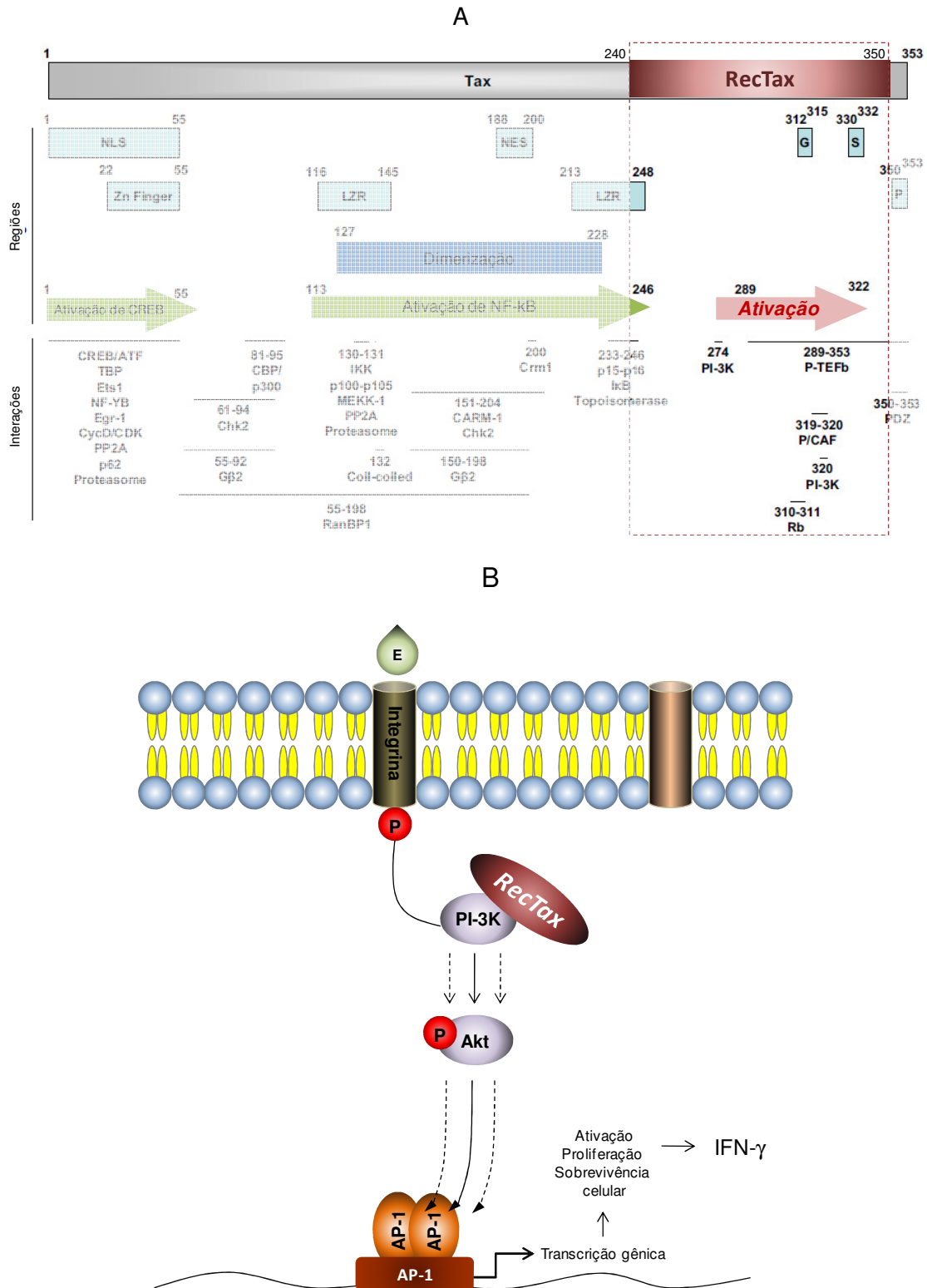


Figura 47 – A: Interatoma de Tax e RecTax com proteínas de vias de sinalização celular. O retângulo pontilhado representa a região representativa de RecTax constituída da sequência de aminoácidos das posições 240 a 350. Esta região apresenta os domínios que induzem ativação

---

celular. No interatoma de RecTax, o seu principal ligante é PI-3K, fator importante na via de sinalização de AP-1. B: Hipótese de atuação de RecTax na via de sinalização de AP-1, na qual PI-3K, após fosforilação, seria ativado por RecTax, seguido de fosforilação de Akt. Uma vez fosforilado, Akt ativa uma série de proteínas regulatórias e fatores de transcrição como AP-1. AP-1 atuará na transcrição gênica de fatores importantes para ativação, proliferação e sobrevivência da célula. Adaptado de Boxus et al., 2008.

Como esperado, RecTax não estimulou a produção de IL-2. A proteína Tax inteira possui a capacidade de estimular a proliferação, no entanto, a porção c-terminal utilizada neste estudo apresenta epítomos que estão associados especialmente a ativação. A perda de epítomos relacionados com proliferação pode estar associada com os achados deste trabalho que verificaram uma manutenção do número de células viáveis igual ao controle de PBMC após incubação com RecTax por 24 horas.

A produção de citocinas está igualmente associada a atuação de células efetoras do sistema imune como células T presentes no microambiente repleto de estímulos a qual estas células estão expostas em infecções por microrganismos. Células T apresentando moléculas co-estimuladoras como CD3 e CD28 são importantes na ativação e proliferação de outros linfócitos que consequentemente responderão produzindo citocinas (HUSHMENDY et al., 2009).

Hushmendy e colaboradores (2009) examinaram o poder de quercetina na ativação e proliferação de células T CD3<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, verificando que esta droga é

capaz de suprimir a atividade destas células, atuando como um potente composto imunomodulatório. Assim, a atividade anti-proliferativa e supressora de linfócitos T poderia estar associada com atividade inibitória da produção de citocinas pró-inflamatórias observadas neste presente estudo.

A atividade anti-proliferativa de quercetina também foi avaliada em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1, indicando que esta droga é capaz de inibir a proliferação induzida por PHA no PBMC proveniente destes pacientes. A inibição da proliferação foi mais proeminente em pacientes com HAM/TSP. Não houve proliferação induzida por PHA em pacientes não infectados pelo HTLV-1, sugerindo que o vírus atuou sinergicamente com o PHA na proliferação de PBMC dos pacientes infectados (figura 48).

**Hipótese para explicar a atividade anti-proliferativa de quercetina em PBMC de indivíduos Infectados pelo HTLV-1**

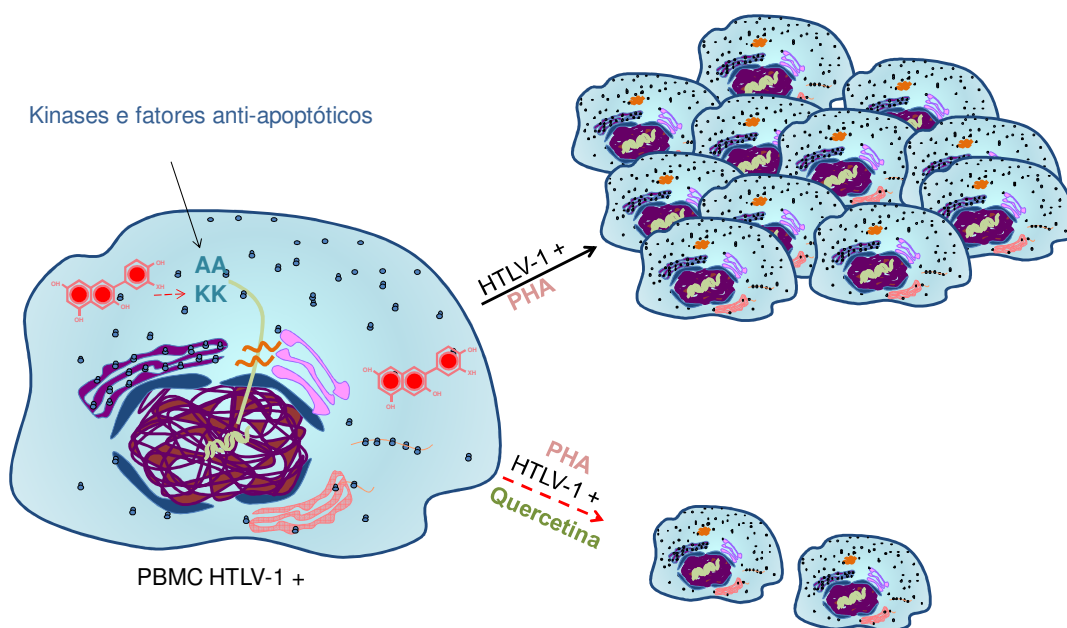


Figura 48 – Representação esquemática de hipótese para explicar a atividade anti-proliferativa de quercetina em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1. A proliferação celular foi

---

apenas observada em pacientes infectados pelo HTLV-1, indicando que o vírus atuou conjuntamente com PHA para induzir a proliferação de PBMC. Quercetina poderia atuar inibindo kinases celulares ou fatores anti-apoptóticos super expressos impedindo a proliferação de PBMC.

Esta inibição em pacientes infectados não está associada à citotoxicidade da droga, ou seja, a morte celular, uma vez que o grupo HAM/TSP apresentou a maior viabilidade comparando com indivíduos assintomáticos e não infectados pelo HTLV-1. A alta viabilidade apresentada por este grupo parece refletir a alta ativação celular que é característica de pacientes infectados com processo inflamatório exacerbado.

Este status imunológico já foi amplamente avaliado e descrito em pacientes portadores de Mielopatia associada ao HTLV-1 em relação a indivíduos não infectados pelo vírus e, ainda, em relação a indivíduos infectados assintomáticos (TAYLOR, 1998; LIM *et al.*, 2000; ASQUITH e BANGHAM, 2000; NAGAI *et al.*, 2001; OSAME, 2002; BRITO-MELO *et al.*, 2002; BANGHAM, 2003).

Os nossos resultados vão de acordo com os achados de Sternberg e colaboradores (2008) que relataram que quercetina foi capaz de modular, juntamente com IFN- $\beta$  vários mediadores proinflamatórios em PBMC isolados de pacientes com Esclerose Múltipla. De acordo com os autores, quercetina também inibiu a proliferação de PBMC destes pacientes de maneira dose-dependente e modulou, igualmente, os níveis de IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  liberados no sobrenadante de cultura de PBMC.

---

Uma das dificuldades no estudo de novas drogas para tratamento de doenças do sistema nervoso é a necessidade de que estas drogas sejam biodisponíveis e ativas no local de ação e para tal, é necessário que estas drogas ultrapassem a barreira hemato-encefálica. Quercetina e alguns de seus metabólitos apresentam um alto índice de hidrofobicidade e, portanto, são lipofílicos o suficiente para atravessar a barreira hemato-encefálica (YOU DIM et al., 2004a, YOU DIM et al., 2004b). Esta é uma das características desta flavonóide que permite sua ação neuroprotetora (DAJAS et al., 2003). Desta forma, quercetina e seus conjugados apresentam-se ativos no sistema nervoso, podendo ser sugeridos como alternativa terapêutica em HAM/TSP.

Segundo Harvey e colaboradores (2009) a evidencia de que uma droga possa atuar em vários vírus é um indicador de que esta droga atua preferencialmente e potentemente em vias celulares que o vírus utiliza para manter uma infecção produtiva na célula. Ainda, a presença de vários efeitos como a atividade antiviral e imunomodulatória demonstradas por quercetina também são evidencia clara e fidedigna de que esta droga atua em vias celulares importantes para o estabelecimento do processo infeccioso e inflamatório.

Estes dados em conjunto corroboram a hipótese deste trabalho de que quercetina e kaempherol são drogas com potencial na manipulação de vias celulares e apresentam atividade antiviral no contexto da infecção pelo HTLV-1. Esta potente atuação nas vias celulares, em especial na via de interferon, permite a quercetina a atuar como modulador da resposta pró- e



---

antiinflamatória, podendo contribuir para o controle do processo degenerativo-inflamatório desenvolvido pelo sistema imune de indivíduos infectados pelo HTLV-1 em resposta a antígenos do vírus.

---

*"Every end is a new beginning."*

*Autor desconhecido*

## **Conclusões**

---

## **7 CONCLUSÕES**

1- A análise dos resultados indicou que quercetina e kaempherol apresentam uma baixa citotoxicidade para PBMC, intermediária para células THP-1 e elevada citotoxicidade para células MT-2.

2- A análise de marcadores da produção viral revelou que os flavonóides, em especial o kaempherol, promoveram alterações na acumulação de mRNAs de *gag-pol* e, igualmente, promoveram diminuição de proteínas virais, de maneira dose-resposta, sugerindo o potencial antiviral destas drogas para o HTLV-1. A acumulação de mRNAs de *tax-rex* não revelou alterações significativas resultantes do tratamento com quercetina e kaempherol.

3- A avaliação do perfil topográfico de MT-2 sugeriu e confirmou os dois resultados apresentados anteriormente, indicando que na presença de quercetina e kaempherol, ocorre um impedimento da liberação de vírus pela célula MT-2, bem como a formação de poros que explicaria o efeito citotóxico específico para MT-2 desencadeado por estes compostos.

4- A avaliação do efeito imunomodulatório de quercetina evidenciou seu potencial na regulação das respostas Th1 e Th2, em especial na inibição da expressão de IFN- $\gamma$ , citocina que contribui consideravelmente para a patogênese de HAM/TSP. Os resultados de proliferação celular sugeriram o potencial de quercetina na inibição da proliferação de PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1, em especial de indivíduos HAM/TSP.

---

*"The man who does not read good books  
has no advantage over the man  
who cannot read them."  
Mark Twain (1835-1910)*

## ***Referências Bibliográficas***

---

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARISAWA K, SODA M, AKAHOSHI M, MATSUO T, NAKASHIMA E, TOMONAGA M, SAITO H. Human T-lymphotropic virus type-I infection, antibody titers and cause-specific mortality among atomic-bomb survivors. *Japan Journal Cancer Reseach*. 89(8):797-805, 1998.
2. ASQUITH B, HANON E, TAYLOR GP, BANGHAM CR. Is human T-cell lymphotropic virus type I really silent? *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 29;355(1400):1013-9, 2000.
3. ASQUITH B, BANGHAM CR. The role of cytotoxic T lymphocytes in human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. *Journal of theoretical biology*. 7;207(1):65-79, 2000.
4. BALESTRIERI E, MATTEUCCI C, ASCOLANI A, PIPERNO A, ROMEO R, ROMEO G, CHIACCHIO U, MASTINO A, MACCHI B. Effect of phosphonated carbocyclic 2'-oxa-3'-aza-nucleoside on human T-cell leukemia virus type 1 infection in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52(1):54-64, 2008.
5. BALESTRIERI E, SCIORTINO MT, MASTINO A, MACCHI B. Protective effect of the acyclic nucleoside phosphonate tenofovir toward human T-cell

- 
- leukemia/lymphotropic virus type 1 infection of human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Antiviral Research*. 68(3):154-62, 2005.
6. BANGHAM CR. The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. *Journal of Genetic Virology*. 84(Pt 12):3177-89, 2003.
  7. BANKI K, COLOMBO E, SIA F, HALLADAY D, MATTSON DH, TATUM AH, MASSA PT, PHILLIPS PE, PERL A. Oligodendrocyte-specific expression and autoantigenicity of transaldolase in multiple sclerosis. *Journal of Experimental Medicine*. 180 (5):1649-63. 1994.
  8. BARNARD AL, IGAKURA T, TANAKA Y, TAYLOR GP, BANGHAM CR. Engagement of specific T-cell surface molecules regulates cytoskeletal polarization in HTLV-1-infected lymphocytes. *Blood*. 1;106(3):988-95, 2005.
  9. BOYER PL, SARAFIANOS SG, CLARK PK, ARNOLD E AND HUGHES SH. Why Do HIV-1 and HIV-2 Use Different Pathways to Develop AZT Resistance? *PLoS Pathog*. (2): e10, 2006.
  10. BOXUS M, TWIZERE JC, LEGROS S, DEWULF JF, KETTMANN R, WILLEMS L. The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology*. 5:76, 2008.
  11. BRAGA S., PORTO A.F., CARVALHO E.M. "Infecção por helmintos e HTLV-1". IN: CARNEIRO-PROIETTI A.B.F. (org.) *HTLV: Cadernos*

---

*Hemominas Volume XIII*. Belo Horizonte: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais, 2006.

12. BRITO-MELO GE, SOUZA JG, BARBOSA-STANCIOLI EF, CARNEIRO-PROIETTI AB, CATALAN-SOARES B, RIBAS JG, THORUM GW, ROCHA RD, MARTINS-FILHO OA; Grupo Interdisciplinar de Pesquisas em HTLV. Establishing phenotypic features associated with morbidity in human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 11(6):1105-1110, 2004.
13. BRITO-MELO, Gustavo Eustáquio Alvim. Estudo Fenotípico dos Leucócitos do Sangue Periférico de Indivíduos infectados pelo HTLV-1. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.
14. BRITO-MELO GE, MARTINS-FILHO OA, CARNEIRO-PROIETTI AB, CATALAN-SOARES B, RIBAS JG, THORUM GW, BARBOSA-STANCIOLI EF. Phenotypic study of peripheral blood leucocytes in HTLV-1-infected individuals from Minas Gerais, Brazil. *Scandinavian Journal of Immunology*. 55(6):621-628, 2002.
15. BRUM, Larrissa Picada. Atividade antiviral dos compostos fenólicos (Ácidos ferúlico e transcinâmico) e dos flavonóides (Quercetina e kaempherol) sobre os Herpesvirus bovino 1, Herpesvirus bovino 5 e vírus da Cinomose Canina.

---

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – Minas Gerais, 2006.

16. CAPDEPONT S, LONDOS-GAGLIARDI D, JOUBERT M, CORREZE P, LAFON ME, GUILLEMAIN B, FLEURY HJ. New insights in HTLV-I phylogeny by sequencing and analyzing the entire envelope gene. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 21(1):28-42, 2005.
17. CARNEIRO-PROIETTI ABF, RIBAS JGR, CATALAN-SOARES BC, MARTINS ML, BRITO-MELO GEA, MARTINS-FILHO OA, PINHEIRO SR, ARAÚJO AQC, GALVÃO-CASTRO B, OLIVEIRA MST, GUEDES AC, PROIETTI FA. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-1/2) no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35(5): 499-508, 2002.
18. CASTRO-COSTA CM, ARAÚJO AQ, BARRETO MM, TAKAYANAGUI OM, SOHLER MP, DA SILVA EL, DE PAULA SM, ISHAK R, RIBAS JG, ROVIROSA LC, CARTON H, GOTUZZO E, HALL WW, MONTANO S, MURPHY EL, OGER J, REMONDEGUI C, TAYLOR GP. Proposal for diagnostic criteria of tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM). *AIDS Research and Human Retroviruses*. 22(10):931-5, 2006.
19. CALABRESE EJ. Hormesis: a conversation with a critic. *Environ Health Perspect*. 117(9):1339-43, 2009.



- 
20. CATALAN-SOARES, B., LOUREIRO F.C.M., CARNEIRO-PROIETTI A.B.F. "Aconselhamento do paciente e prevenção da infecção por 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.
21. CATALAN-SOARES B, CARNEIRO-PROIETTI AB, PROIETTI FA; Interdisciplinary HTLV Research Group. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. *Caderno Saude Publica*. 21(3):926-931, 2005.
22. CATALAN-SOARES B., PROIETTI F, CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F. Os vírus linfotrópicos de Células T humanos (HTLV) na última década (1990-2000) - Aspectos epidemiológicos. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. Vol.4, nº2, 2001.
23. CHIANG LC, CHIANG W, LIU MC, LIN CC. In vitro antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. *J Antimicrob Chemother*. Aug;52(2):194-8, 2003.
24. CHUNG HK, YOUNG HA, GOON PK, HEIDECKER G, PRINCLER GL, SHIMOZATO O, TAYLOR GP, BANGHAM CR, DERSE D. Activation of

- 
- interleukin-13 expression in T cells from HTLV-1-infected individuals and in chronically infected cell lines. *Blood*. 1;102(12):4130-6, 2003.
25. COELHO-DOS-REIS, Jordana Grazziela Alves. Avaliação do desempenho da reatividade de IgG e IgG1 por citometria de fluxo aplicada no diagnóstico e prognóstico da infecção pelo HTLV-1. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2008.
26. CRESPO I, GARCÍA-MEDIAVILLA MV, ALMAR M, GONZÁLEZ P, TUÑÓN MJ, SÁNCHEZ-CAMPOS S, GONZÁLEZ-GALLEGO J. Differential effects of dietary flavonoids on reactive oxygen and nitrogen species generation and changes in antioxidant enzyme expression induced by proinflammatory cytokines in Chang Liver cells. *Food Chem Toxicol*, 2007.
27. DAENKE S, NIGHTINGALE S, CRUICKSHANK JK, BANGHAM CR: Sequence variants of human T-cell lymphotropic virus type I from patients with tropical spastic paraparesis and adult T-cell leukemia do not distinguish neurological from leukemic isolates. *Journal of Virology*, 64:1278-1282, 1990.
28. DAJAS F, RIVERA-MEGRET F, BLASINA F, ARREDONDO F, ABIN-CARRIQUIRY JA, COSTA G, ECHEVERRY C, LAFON L, HEIZEN H, FERREIRA M, MORQUIO A. Neuroprotection by flavonoids. *Braz J Med Biol Res*. 36(12):1613-20, 2003 - A.

- 
29. DAJAS F, RIVERA F, BLASINA F, ARREDONDO F, ECHEVERRY C, LAFON L, MORQUIO A, HEIZEN H. Cell culture protection and in vivo neuroprotective capacity of flavonoids. *Neurotox Res.* 5(6):425-32, 2003 - B.
30. DATTA A, SINHA-DATTA U, DHILLON NK, BUCH S, NICOT C. The HTLV-I p30 interferes with TLR4 signaling and modulates the release of pro- and anti-inflammatory cytokines from human macrophages. *Journal of Biological Chemistry.* 18;281(33):23414-24, 2006.
31. DIOP S, CALATTINI S, ABAH-DAKOU J, THIAM D, DIAKHATE L, GESSAIN A. Seroprevalence and molecular epidemiology of human T-Cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 in blood donors from Dakar, Senegal. *Journal of Clinical Microbiology.* 44(4):1550-4, 2006.
32. EDLICH RF, ARNETTE JA, WILLIAMS FM. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I). *Journal of Emergency Medicine.* 18(1):109-19, 2000.
33. FERREIRA GP, TRINDADE GS, VILELA JM, DA SILVA MI, ANDRADE MS, KROON EG. Climbing the steps of viral atomic force microscopy: visualization of Dengue virus particles. *J Microsc.* 231(Pt 1):180-5, 2008.
34. FLEXNER C, TIERNEY C, GROSS R, ANDRADE A, LALAMA C, ESHLEMAN SH, ABERG J, SANNE I, PARSONS T, KASHUBA A, ROSENKRANZ SL, KMACK A, FERGUSON E, DEHLINGER M, MILDVAN

---

D; ACTG A5073 Study Team. Comparison of once-daily versus twice-daily combination antiretroviral therapy in treatment-naive patients: results of AIDS clinical trials group (ACTG) A5073, a 48-week randomized controlled trial. *Clin Infect Dis.* 50(7):1041-52, 2010.

35. FRANKLIN, A., AND J. K. NYBORG. Mechanisms of Tax regulation of human T cell leukemia virus type I gene expression. *J. Biomed. Sci.* 2:17–29, 1995.

36. FRANCHINI G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. *Blood.* 15;86(10):3619-39, 1995.

37. FUKUSHIMA N, NISHIURA Y, NAKAMURA T, KOHNO S, EGUCHI K. Blockade of IL-2 receptor suppresses HTLV-I and IFN-gamma expression in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Intern Med.* 46(7):347-51, 2007.

38. FURUKAWA Y, BANGHAM CR, TAYLOR GP, WEBER JN, OSAME M. Frequent reversible membrane damage in peripheral blood B cells in human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Clinical and Experimental Immunology.* 120(2):307-16, 2000.

- 
39. GALLO RC. The discovery of the first human retrovirus: HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology*. 2;2(1):17, 2005.
40. GESSAIN A, MAHIEUX R, DE THÉ G. Genetic variability and molecular epidemiology of human and simian T cell leukemia/lymphoma virus type I. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology: official publication of the International Retrovirology Association*;13 Suppl 1:S132-45, 1996.
41. GESSAIN A, BARIN F, VERNANT JC, GOUT O, MAURS L, CALENDER A, DE THE G. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet*. 2(8452):407-10, 1985.
42. GOFF S. "Retroviridae: The Retroviruses and Their Replication". IN: Fields Virology. Edited by B. N. Fields & D. M. Knipe. New York:Raven Press. pp. 1999-2051, 2004.
43. GOTUZZO E, CABRERA J, DEZA L, VERDONCK K, VANDAMME AM, CAIRAMPOMA 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*. 1;39(7):939-44, 2004.
44. GOON PK, BANGHAM CR. Interference with immune function by HTLV-1. *Clinical and Experimental Immunology*. 137(2):234-6, 2004.

- 
45. GOON PK, IGAKURA T, HANON E, MOSLEY AJ, ASQUITH B, GOULD KG, TAYLOR GP, WEBER JN, BANGHAM CR. High circulating frequencies of tumor necrosis factor alpha- and interleukin-2-secreting human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific CD4+ T cells in patients with HTLV-1-associated neurological disease. *Journal of Virology*. 77(17):9716-22, 2003.
46. GOON PK, HANON E, IGAKURA T, TANAKA Y, WEBER JN, TAYLOR GP, BANGHAM CR. 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*. 1;99(9):3335-41, 2002.
47. GRASSMANN, R., S. BERCHTOLD, I. RADANT, M. ALT, B. FLECKENSTEIN, J. G. SODROSKI, W. A. Haseltine, and U. Ramstedt. Role of human T-cell leukemia virus type I X region protein in immortalization of primary human lymphocytes in culture. *J. Virol*. 66:4570–4575, 1992.
48. GREINER, M.; SOHR, D.; GOBEL, P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *Journal of Immunological Methods*. 185:123-32, 1995.
49. HA HJ, KWON YS, PARK SM, SHIN T, PARK JH, KIM HC, KWON MS, WIE MB. quercetin attenuates oxygen-glucose deprivation- and excitotoxin-induced neurotoxicity in primary cortical cell cultures. *Biol Pharm Bull*. 26(4):544-6, 2003.

- 
50. HADLOCK KG, ROWE J, FOUNG SK. The humoral immune response to human T-cell lymphotropic virus type 1 envelope glycoprotein gp46 is directed primarily against conformational epitopes. *Journal of Virology*. 73(2):1205-12, 1999.
51. HALL WW, FUJII M. Deregulation of cell-signaling pathways in HTLV-1 infection. *Oncogene*. 2005 Sep 5;24(39):5965-75.
52. HÄMÄLÄINEN M, NIEMINEN R, VUORELA P, HEINONEN M, MOILANEN E. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators Inflamm*. 45673; 2007. HARAKEH S, DIAB-ASSAF M, NIEDZWIECKI A, KHALIFE J, ABU-EL-ARDAT K, RATH M. Apoptosis induction by Epican Forte in HTLV-1 positive and negative malignant T-cells. *Leuk Res*. 30(7), 869-881, 2006.
53. HARAKEH S, DIAB-ASSAF M, NIEDZWIECKI A, KHALIFE J, ABU-EL-ARDAT K, RATH M. Apoptosis induction by Epican Forte in HTLV-1 positive and negative malignant T-cells. *Leukemia Research*. 30(7):869-81, 2006.
54. HARVEY R, BROWN K, ZHANG Q, GARTLAND M, WALTON L, TALARICO C, LAWRENCE W, SELLESETH D, COFFIELD N, LEARY J, MONIRI K, SINGER S, STRUM J, GUDMUNDSSON K, BIRON K, ROMINES KR,

- 
- SETHNA P. GSK983: a novel compound with broad-spectrum antiviral activity. *Antiviral Research*. 82(1):1-11, 2009.
55. HINO S., YAMAGUCHI K., KATAMINE S., SUGIYAMA H., AMAGASAKI T., KINOSHITA K., YOSHIDA Y., DOI H., TSUJI Y., MIHAMOTO T. Mother-to-child transmission of human T-cell leukemia type I. *Japanese Journal Cancer Research*, v.76, p.474-480, 1985.
56. HU CQ, CHEN K, SHI Q, KILKUSKIE RE, CHENG YC, LEE KH. Anti-AIDS agents, 10. Acacetin-7-O-beta-D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from *Chrysanthemum morifolium* and a structure-activity correlation with some related flavonoids. *J Nat Prod*. 57(1):42-51, 1994.
57. HUSHMENDY S, JAYAKUMAR L, HAHN AB, BHOIWALA D, BHOIWALA DL, CRAWFORD DR. Select phytochemicals suppress human T-lymphocytes and mouse splenocytes suggesting their use in autoimmunity and transplantation. *Nutr Res*. 29(8):568-78, 2009.
58. IGAKURA T, STINCHCOMBE JC, GOON PK, TAYLOR GP, WEBER JN, GRIFFITHS GM, TANAKA Y, OSAME M, BANGHAM CR. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science*. 14; 299 (5613):1713-6, 2003.
59. IZUMO S., USUKU K., OSAME M., MACHIGASHIRA K., JOHNOSONO M., NAKAGAWA M. The neuropathology of HTLV-I-associated myelopathy in



---

Japan: report of na autopsy case and review of the literature. IN: Roman G.C., Vernant J.C., Osame M. ed. Alan R. Liss, *HTLV-I and the Nervous System*. New York, p.261, 1988.

60. JACOBSON S, KRICHAVSKY M, FLERLAGE N, LEVIN M. Immunopathogenesis of HTLV-I associated neurologic disease: massive latent HTLV-I infection in bone marrow of HAM/TSP patients. *Leukemia*. Suppl 3:73-75, 1997.

61. JACOBSON S, SHIDA H, MCFARLIN E, FAUCI AS, KOENIG S. Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. *Nature*, v.348, p.245, 1990.

62. JAESCHKE R, GUYATT GH, SACKETT DL. Users' guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. B. What are the results and will they help me in caring for my patients? The Evidence-Based Medicine Working Group. *JAMA*. 271(9):703-07, 1994.

63. JAIN P, MANUEL SL, KHAN ZK, AHUJA J, QUANN K, WIGDAHL B. DC-SIGN mediates cell-free infection and transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 by dendritic cells. *Journal of Virology*. 83(21):10908-21, 2009.

64. JEANG K.T., DERSE D., MATOCHA M., SHARMA O. Expression Status of Tax Protein in Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Transformed MT4

---

Cells: Recall of MT4 Cells Distributed by the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program. *J. Virol.*, 71(9) 6277–6278, 1997.

65. JEANG, K.-T., S. G. WIDEN, O. J. SEMMES, AND S. H. WILSON. HTLV-1 trans-activator protein, Tax, is a trans-repressor of the human  $\beta$ -polymerase gene. *Science* 247:1082–1084, 1990.

66. JEANNEL D, GARIN B, KAZADI K, SINGA L, DE THÉ G. The risk of tropical spastic paraparesis differs according to ethnic group among HTLV-I carriers in Inongo, Zaire. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology*. 6(7):840-4, 1993.

67. JOHNSON JM, HARROD R, FRANCHINI G. Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell leukaemia/lymphotropic virus Type-1 (HTLV-1). *International Journal of Experimental Pathology*. 82(3):135-47, 2001.

68. JONES KS, PETROW-SADOWSKI C, HUANG YK, BERTOLETTE DC, RUSCETTI FW. Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nature Medicine*. 14(4):429-36, 2008.

69. JONES, K. S., C. PETROW-SADOWSKI, D. C. BERTOLETTE, Y. HUANG, AND F. W. RUSCETTI. Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4<sub>+</sub> T cells. *Journal of Virology*. 79:12692–12702, 2005.

- 
70. KAJIYAMA W, KASHIWAGI S, IKEMATSU H, HAYASHI J, NORUMA H, OKOCHI K. Intra-familial transmission of adult T-cell leukemia virus. *Journal Infectious Diseases*, v.154, p.851-857, 1986.
71. KAO TK, OU YC, RAUNG SL, LAI CY, LIAO SL, CHEN CJ. Inhibition of nitric oxide production by quercetin in endotoxin/cytokine-stimulated microglia. *Life Sci*. 2010 Jan 7. [Epub ahead of print]
72. KAPLAN JE, OSAME M, KUBOTA H, IGATA A, NISHITANI H, MAEDA Y, KHABBAZ RF, JANSSEN RS. 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*. (11):1096-101, 1990.
73. KASHANCHI F, BRADY JN. Transcriptional and post-transcriptional gene regulation of HTLV-1. *Oncogene*. 5;24(39):5938-51, 2005.
74. KAWAI Y, NISHIKAWA T, SHIBA Y, SAITO S, MUROTA K, SHIBATA N, KOBAYASHI M, KANAYAMA M, UCHIDA K, TERAOKA J. Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries: Implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. *J Biol Chem*, 2008.

- 
75. KAZANJI M, HERAUD JM, MERIEN F, PIQUE C, DE THE G, GESSAIN A, JACOBSON S. Chimeric peptide vaccine composed of B- and T-cell epitopes of human T-cell leukemia virus type 1 induces humoral and cellular immune responses and reduces the proviral load in immunized squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Journal of Genetic Virology*. 87(Pt 5):1331-7, 2006.
76. KINET S, SWAINSON L, LAVANYA M, MONGELLAZ C, MONTEL-HAGEN A, CRAVEIRO M, MANEL N, BATTINI JL, SITBON M, TAYLOR N. Isolated receptor binding domains of HTLV-1 and HTLV-2 envelopes bind Glut-1 on activated CD4+ and CD8+ T cells. *Retrovirology*. 15;4:31, 2007.
77. KITAJIMA I, YAMAMOTO K, SATO K, NAKAJIMA Y, NAKAJIMA T, MARUYAMA I, OSAME M, NISHIOKA K. Detection of human T cell lymphotropic virus type I proviral DNA and its gene expression in synovial cells in chronic inflammatory arthropathy. *Journal of Clinical Investigation*. 88(4):1315-1322, 1991.
78. KOENIG S, WOODS RM, BREWAH YA, NEWELL AJ, JONES GM, BOONE E, DELSBERGER JW, BASELER MW, ROBINSON SM, JACOBSON S. Characterization of MHC class I restricted cytotoxic T cell responses to tax in HTLV-1 infected patients with neurologic disease. *Journal of Immunology*. 151(7):3874-83. 1993.

- 
79. KOPROWSKI H, DEFREITAS EC, HARPER ME, SANDBERG-WOLLHEIM M, SHEREMATA WA, ROBERT-GUROFF M, SAXINGER CW, FEINBERG MB, WONG-STAAAL F, GALLO RC. Multiple sclerosis and human T-cell lymphotropic retroviruses. *Nature*. 20;318(6042):154-60. 1985.
80. KROON, E. G.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. Vírus Linfotrópicos de Células T Humanas Tipos 1 e 2 (HTLV-1/2) – *Histórico, Estrutura e Ciclo de Multiplicação Viral*. Cadernos HEMOMINAS, Belo Horizonte, vol. XIII, p. 11-20. 2006.
81. KUBO I, MASUOKA N, NIHEI K, BURGHEIM B. Manicoba, a quercetin-rich Amazonian dish. *J. Food Comp. Anal.*, v.19, p.579-588, 2006.
82. KUBOTA R, FURUKAWA Y, IZUMO S, USUKU K, OSAME M. Degenerate specificity of HTLV-1-specific CD8+ T cells during viral replication in patients with HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). *Blood*. 15;101(8):3074-81, 2003.
83. KUBOTA R, SOLDAN SS, MARTIN R, JACOBSON S. Selected cytotoxic T lymphocytes with high specificity for HTLV-I in cerebrospinal fluid from a HAM/TSP patient. *Journal of Neurovirology*. 8(1):53-57, 2002.
84. KUBOTA R, FUJIYOSHI T, IZUMO S, YASHIKI S, MARUYAMA I, OSAME M, SONODA S. Fluctuation of HTLV-I proviral DNA in peripheral blood

- 
- mononuclear cells of HTLV-I-associated myelopathy. *Journal of Neuroimmunology*. 42(2):147-54, 1993.
85. KURODA Y, MATSUI M. Cerebrospinal fluid interferon-gamma is increased in HTLV-I-associated myelopathy. *Journal of Neuroimmunology*. 42(2):223-6, 1993.
86. KUZNETSOV YG, VICTORIA JG, LOW A, ROBINSON WE JR, FAN H, MCPHERSON A. Atomic force microscopy imaging of retroviruses: human immunodeficiency virus and murine leukemia virus. *Scanning*. 26(5):209-16, 2004.
87. LAL RB, BUCKNER C, KHABBAZ RF, KAPLAN JE, REYES G, HADLOCK K, LIPKA J, FOUNG SK, CHAN L, COLIGAN JE. Isotypic and IgG subclass restriction of the humoral immune responses to human T-lymphotropic virus type-I. *Clinical and Immunological Immunopathology*. 67(1):40-9, 1993.
88. LAMBERT S, BOUTTIER M, VASSY R, SEIGNEURET M, PETROWSKI C, JANVIER S, HEVEKER N, RUSCETTI FW, PERRET G, JONES KS, PIQUE C. HTLV-1 uses HSPG and neuropilin-1 for entry by molecular mimicry of VEGF165. *Blood*. 21;113(21):5176-85, 2009.
89. LAMEIRA J, MEDEIROS IG, REIS M, SANTOS AS, ALVES CN. Structure-activity relationship study of flavone compounds with anti-HIV-1 integrase

- 
- activity: a density functional theory study. *Bioorg Med Chem*. 2006 Nov 1;14(21):7105-12.
90. LEE SM, DUNNAVANT FD, JANG H, ZUNT J, LEVIN MC. Autoantibodies that recognize functional domains of hnRNPA1 implicate molecular mimicry in the pathogenesis of neurological disease. *Neuroscience Letters*. 401(1-2):188-93, 2006.
91. LEVIN MC, LEE SM, MORCOS Y, BRADY J, STUART J. Cross-reactivity between immunodominant human T lymphotropic virus type I tax and neurons: implications for molecular mimicry. *Infectious Diseases*. 186(10):1514-7, 2002.
92. LEVIN MC, JACOBSON S. Cellular and humoral immune responses associated with HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Annals of New York Academy of Science*. 835:142-52, 1997.
93. LI M, GREEN PL. Detection and quantitation of HTLV-1 and HTLV-2 mRNA species by real-time RT-PCR. *J Virol Methods*. 142(1-2):159-68, 2007.
94. LI HC, YASHIKI S, SONODA J, LOU H, GHOSH SK, BYRNES JJ, LEMA C, FUJIYOSHI T, KARASUYAMA M, SONODA S. Green tea polyphenols induce apoptosis in vitro in peripheral blood T lymphocytes of adult T-cell leukemia patients. *Jpn J Cancer Res*. 91(1):34-40, 2000.

- 
- 95.LIM DG, BIEGANOWSKA BOURCIER K, FREEMAN GJ, HAFLER DA. Examination of CD8+ T cell function in humans using MHC class I tetramers: similar cytotoxicity but variable proliferation and cytokine production among different clonal CD8+ T cells specific to a single viral epitope. *Journal of Immunology*. 1;165(11):6214-20, 2000.
- 96.MACATONIA SE, CRUICKSHANK JK, RUDGE P, KNIGHT SC. Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-I and stimulate autologous lymphocyte proliferation. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 8(9):1699-1706, 1992.
- 97.MAJOROVITS E, NEJMEDDINE M, TANAKA Y, TAYLOR GP, FULLER SD, BANGHAM CR. Human T-lymphotropic virus-1 visualized at the virological synapse by electron tomography. *PLoS One*. May 28;3(5):e2251, 2008.
- 98.MANEL N, BATTINI JL, SITBON M. Human T cell leukemia virus envelope binding and virus entry are mediated by distinct domains of the glucose transporter GLUT-1. *Journal of Biological Chemistry*. 12;280(32):29025-9, 2005.
- 99.MANSOURI S, CHOUDHARY G, SARZALA PM, RATNER L, HUDAK KA. Suppression of human T-cell leukemia virus I gene expression by pokeweed antiviral protein. *Journal of Biological Chemistry*. 284(45):31453-62, 2009.



- 
100. MATSUI M, NAGUMO F, TADANO J, KURODA Y. Characterization of humoral and cellular immunity in the central nervous system of HAM/TSP. *Journal of Neurological Science*. 130(2):183-9, 1995.
101. MEEKINGS KN, LEIPZIG J, BUSHMAN FD, TAYLOR GP, BANGHAM CRM. HTLV-1 Integration into Transcriptionally Active Genomic Regions Is Associated with Proviral Expression and with HAM/TSP. *PLoS Pathog* 4(3): e1000027, 2008.
102. MIN YD, CHOI CH, BARK H, SON HY, PARK HH, LEE S, PARK JW, PARK EK, SHIN HI, KIM SH. Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF-kappaB and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line. *Inflamm Res*. 56(5):210-5, 2007.
103. MIYOSHI I, KUBONISHI I, YOSHIMOTO S, AKAGI T, OHTSUKI Y, SHIRAISHI Y, NAGATA K AND HINUMA Y. Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells. *Nature*, 294, 770–771, 1981.
104. MONTANHEIRO PA, OLIVEIRA AC, POSADA-VERGARA MP, MILAGRES AC, TAUIL C, MARCHIORI PE, DUARTE AJ, 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. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 38(12):1890, 2005.

- 
105. MOROZOV VA, WEISS RA. Two types of HTLV-1 particles are released from MT-2 cells. *Virology*. 255(2):279-84, 1999.
106. MURPHY EL, FIGUEROA P, GIBBS WN, BRATHWAITE A, HOLDING-COBHAM M, WATERS D, CRANSTON B, HANCHARD B, BLATTNER WA. Sexual transmission of human T-lymphotropic virus type-I. *Annals Internal Medicine*. 111:555-560, 1989.
107. MUSHAK P. Ad hoc and fast forward: the science of hormesis growth and development. *Environ Health Perspect*. 2009 Sep;117(9):1333-8. Mushak P. Ad hoc and fast forward: the science of hormesis growth and development. *Environ Health Perspect*. 117(9):1333-8, 2009.
108. MUSHAK P. Hormesis and its place in nonmonotonic dose-response relationships: some scientific reality checks. *Environ Health Perspect*. 115(4):500-6, 2007.
109. NAKAMURA S, NAGANO I, YOSHIOKA M, SHIMAZAKI S, ONODERA J, KOGURE K. Detection of tumor necrosis factor-alpha-positive cells in cerebrospinal fluid of patients with HTLV-I-associated myelopathy. *Journal of Neuroimmunology*. 42(2):127-30, 1993.
110. NAGAI M, YAMANO Y, BRENNAN MB, MORA CA, JACOBSON S. Increased HTLV-I proviral load and preferential expansion of HTLV-I Tax-

- 
- specific CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from patients with HAM/TSP. *Annals of Neurology*. 50(6):807-12, 2001.
111. NAGAI M, USUKU K, MATSUMOTO W, KODAMA D, TAKENOUCI N, MORITOYO T, HASHIGUCHI S, ICHINOSE M, BANGHAM CR, IZUMO S, OSAME M. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *Journal of Neurovirology*. 4(6):586-93; 1998.
112. NAGASATO K, NAKAMURA T, SHIRABE S, SHIBAYAMA K, OHISHI K, ICHINOSE K, TSUJIHATA M, NAGATAKI S. Presence of serum anti-human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) IgM antibodies means persistent active replication of HTLV-I in HTLV-I-associated myelopathy. *Journal of Neurological Science*. 103(2):203-8, 1991.
113. NARUKAWA N, SHIIZAKI K, KITABATA Y, ABE T, KOBATA H, AKIZAWA T. Plasma exchange for the treatment of human T-cell lymphotropic virus type 1 associated myelopathy. *Ther Apher*. ;5(6):491-3, 2001.
114. NICOT C. Current views in HTLV-I-associated adult T-cell leukemia/lymphoma. *American Journal of Hematology*; 78: 232–39, 2005.
115. NISHIMOTO N, YOSHIZAKI K, EIRAKU N, MACHIGASHIRA K, TAGOH H, OGATA A, KURITANI T, OSAME M, KISHIMOTO T. Elevated levels of interleukin-6 in serum and cerebrospinal fluid of HTLV-I-associated

- 
- myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Journal of Neurological Science*. 97(2-3):183-93, 1990.
116. NOMURA K, UTSUNOMIYA A, FURUSHOU H, TARA M, HAZEKI M, OKUNAGA M, UOZUMI K, HANADA S, YASHIKI S, TAJIMA K, SONODA S. A family predisposition to adult T-cell leukemia. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology*. 46(2):67-71, 2006.
117. OH U. e JACOBSON S. Treatment of HTLV-I-Associated Myelopathy / Tropical Spastic Paraparesis: Towards Rational Targeted Therapy. *Neurol Clin.*, 2008; 26(3):781-97, ix-x.
118. OHSUGI T. Increased production of viral proteins by a 3'-LTR-deleted infectious clone of human T-cell leukemia virus type 1. *Virology*. 24;6:229, 2009.
119. OLIVEIRA EJ, WATSON DG. Solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry determination of kaempferol and quercetin in human urine after consumption of Ginkgo biloba tablets. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 19;723(1-2):203-10, 1999.
120. OLTJOF MR, HOLLMAN PCH, BUIJSMAN MNCP, VAN AMELSVOORT JMM, KATAN MB. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *J.Nutr.*, v.133, p.1806-1814, 2003.

- 
121. OSAME M. Pathological mechanisms of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy (HAM/TSP). *Journal of Neurovirology*. p359-64. 2002.
122. OSAME M. The past, the present and the future of HAM/TSP research. *Evening seminar*. p.1-23. 1999.
123. OSAME M, USUKU K, IZUMO S, IJICHI N, AMITANI H, IGATA A, MATSUMOTO M, TARA M. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet*, v.1, p.1031, 1986.
124. PAIS-CORREIA AM, SACHSE M, GUADAGNINI S, ROBBIATI V, LASSERRE R, GESSAIN A, GOUT O, ALCOVER A, THOULOZE MI. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nature Medicine*. (1):83-9, 2010.
125. PARK HJ, LEE CM, JUNG ID, LEE JS, JEONG YI, CHANG JH, CHUN SH, KIM MJ, CHOI IW, AHN SC, SHIN YK, YEOM SR, PARK YM. Quercetin regulates Th1/Th2 balance in a murine model of asthma. *Int Immunopharmacol*. 9(3):261-7, 2009.
126. POIESZ BJ, RUSCETTI FW, REITZ MS, KALYANARAMAN VS, GALLO RC. Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Serary T cell leukemia. *Nature*, v. , p.294, 1981.

- 
127. POIESZ BJ, RUSCETTI FW, GAZDAR AF, BUNN PA, MINNA JD, GALLO RC. 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 of Science of the United States of America*. 77(12):7415-9, 1980.
128. POPOVIC M, REITZ MS, SARNGADHARAN MG. The virus of Japanese adult T-cell leukaemia is a member of the T-cell leukaemia virus group. *Nature*, v.300, p.63-66, 1982.
129. PROIETTI FA, CARNEIRO-PROIETTI AB, CATALAN-SOARES BC, MURPHY EL. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene*. 24(39):6058-6068, 2005.
130. RANJBAR S, RAJSBAUM R, GOLDFELD AE. Transactivator of transcription from HIV type 1 subtype E selectively inhibits TNF gene expression via interference with chromatin remodeling of the TNF locus. *Journal of Immunology*. 176(7):4182-90, 2006.
131. Report of World Health Organization Scientific Group on HTLV-1 Infection and Associated Diseases (Kagoshima, Japan 10–15 December 1988)

- 
132. RIBAS J., MELO G. Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-I) - Associated Myelopathy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 35(4):377-84, 2002.
133. ROGERIO AP, DORA CL, ANDRADE EL, CHAVES JS, SILVA LF, LEMOS-SENNA E, CALIXTO JB. Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded microemulsion in the airways allergic inflammatory model in mice. *Pharmacol Res*. 2009 Nov 3. [Epub ahead of print].
134. ROGERIO AP, KANASHIRO A, FONTANARI C, DA SILVA EV, LUCISANO-VALIM YM, SOARES EG, FACCIOLI LH. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. *Inflamm Res*. 2007 Oct;56(10):402-8.
135. ROMANOS M.T.V., ANDRADA-SERPA M.J., SANTOS M.G.M., RIBEIRO A.C.F., VALENTIN Y.Y., COSTA S.S., WIGG M.D. Inhibitory effect of extracts of Brazilian marine algae on Human T-cell lymphotropic virus -1 (HTLV-1)-induced syncytium formation in vitro. *Cancer Invest*. 20(1), 46-54. 2002.
136. SABINO, E.C., e CARVALHO, S.M.F. "Diagnóstico laboratorial do 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.

- 
137. SANTOS SB, PORTO AF, MUNIZ AL, DE JESUS AR, MAGALHÃES E, MELO A, DUTRA WO, GOLLOB KJ, CARVALHO EM. Exacerbated inflammatory cellular immune response characteristics of HAM/TSP is observed in a large proportion of HTLV-I asymptomatic carriers. *BMC Infectious Diseases*. 2;4:7, 2004.
138. SAITO M, NOSE H, USUKU K, SABOURI AH, 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*. 15;246(1-2):37-43, 2006.
139. SCHLECHT-LOUF G, RENARD M, MANGENEY M, LETZELTER C, RICHAUD A, DUCOS B, BOUALLAGA I, HEIDMANN T. Retroviral infection in vivo requires an immune escape virulence factor encrypted in the envelope protein of oncoretroviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*;107(8):3782-7, 2010.
140. SHARMA V, MISHRA M, GHOSH S, TEWARI R, BASU A, SETH P, SEN E. Modulation of interleukin-1beta mediated inflammatory response in human astrocytes by flavonoids: implications in neuroprotection. *Brain Res Bull*. 15;73(1-3):55-63, 2007.



- 
141. SHIMOYAMA M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *British Journal of Haematology*. 79(3):428-37, 1991.
142. SONODA J, KORIYAMA C, YAMAMOTO S, KOZAKO T, LI HC, LEMA C, YASHIKI S, FUJIYOSHI T, YOSHINAGA M, NAGATA Y, AKIBA S, TAKEZAKI T, YAMADA K, SONODA S. HTLV-1 provirus load in peripheral blood lymphocytes of HTLV-1 carriers is diminished by green tea drinking. *Cancer Sci*. 95(7):596-601, 2004.
143. SOUZA, Jaqueline Gontijo. Acompanhamento do perfil de indicadores fenotípicos da resposta imune celular e humoral e da carga proviral de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2006.
144. STANDAERT D.G., YOUNG A.B.: Tratamento dos distúrbios degenerativos do sistema nervosa central . In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, E. L.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R. W. & GOODMAN, A. G. eds. - Goodman & Gilman's The phamacological basis of therapeutics. 9th edition, New York, Mac. Graw-Hill, 1996. p. 161-176.
145. STEBBING AR. Interpreting 'dose-response' curves using homeodynamic data: with an improved explanation for hormesis. *Dose Response*. 7(3):221-33, 2009.

- 
146. STERNBERG Z, CHADHA K, LIEBERMAN A, HOJNACKI D, DRAKE A, ZAMBONI P, ROCCO P, GRAZIOLI E, WEINSTOCK-GUTTMAN B, MUNSCHAUER F. Quercetin and IFN-beta modulate immune response in PBMC isolated from multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol.* 2008; 15;205(1-2):142-7.
147. SUN SC, YAMAOKA S. Activation of NF-kappaB by HTLV-I and implications for cell transformation. *Oncogene.* 24(39):5952-64, 2005.
148. SZABO G, DOLGANIUC A. The Role of Plasmacytoid Dendritic Cell-Derived IFNalpha in Antiviral Immunity. *Crit Rev Immunol.*28(1):61-94; 2008.
149. TAKENOUCHI N, JONES KS, LISINSKI I, FUGO K, YAO K, CUSHMAN SW, RUSCETTI FW, JACOBSON S. GLUT1 is not the primary binding receptor but is associated with cell-to-cell transmission of human T-cell leukemia virus type 1. *Journal of Virology.* 81(3):1506-10, 2007.
150. TAYLOR GP, MATSUOKA M. Natural history of adult T-cell leukemia/lymphoma and approaches to therapy. *Oncogene.* 5;24(39):6047-57, 2005.
151. TAYLOR GP. Pathogenesis and treatment of HTLV-I associated myelopathy. *Sexual Transmitted Infections.* 74(5):316-322, 1998.

- 
152. TRIBOLO S, LODI F, CONNOR C, SURI S, WILSON VG, TAYLOR MA, NEEDS PW, KROON PA, HUGHES DA. Comparative effects of quercetin and its predominant human metabolites on adhesion molecule expression in activated human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*. 197(1):50-6, 2008.
153. TRINDADE GS, VILELA JM, FERREIRA JM, AGUIAR PH, LEITE JA, GUEDES MI, LOBATO ZI, MADUREIRA MC, DA SILVA MI, DA FONSECA FG, KROON EG, ANDRADE MS. Use of atomic force microscopy as a diagnostic tool to identify orthopoxvirus. *J Virol Methods*. 141(2):198-204, 2007.
154. UMEKI K., HISADA M., MALONEY E., HANCHARD B., OKAYAMA A. Proviral Loads and Clonal Expansion of HTLV-1-Infected Cells following Vertical Transmission: A 10-Year Follow-Up of Children in Jamaica. *Intervirology*. 52:115–122, 2009.
155. VAHLNE A. A historical reflection on the discovery of human retroviruses. *Retrovirology*. 2009 May 1;6:40. PubMed PMID: 19409074
156. VEIROS I, MARTINS L, MARTINS F. Intrathecal baclofen in treatment of spasticity casuistry of the Centro Hospitalar de Coimbra. *Acta Med Port*. 19(3):217-24, 2006.

- 
157. VERDONCK K, GONZÁLEZ E, VAN DOOREN S, VANDAMME AM, VANHAM G, GOTUZZO E. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *Lancet Infectious Diseases*. 7(4):266-81, 2007.
158. WANG H, JOSEPH JA. Structure-activity relationships of quercetin in antagonizing hydrogen peroxide-induced calcium dysregulation in PC12 cells. *Free Radic Biol Med*. 27(5-6):683-94, 1999.
159. WATTEL E, VARTANIAN JP, PANNETIER C, WAIN-HOBSON S. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *J Virol* 69: 2863–2868, 1995.
160. WILLEMS L. The 14th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and related retroviruses (July 1-4, 2009; Salvador, Brazil). *Retrovirology*. 17;6:77, 2009.
161. WOLFE ND, HENEINE W, CARR JK, GARCIA AD, SHANMUGAM V, TAMOUFE U, TORIMIRO JN, PROSSER AT, LEBRETON M, MPOUDINGOLE E, MCCUTCHAN FE, BIRX DL, FOLKS TM, BURKE DS, SWITZER WM. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 102(22):7994-9, 2005.

- 
162. WUCHERPFENNIG KW. Infectious triggers for inflammatory neurological diseases. *Nature Medicine*. (5):455-7, 2002.
163. YAMAGUCHI T, MAEDA Y, UEDA S, HIJIKATA Y, MORITA Y, MIYATAKE JI, MATSUDA M, KANAMARU A. Dichotomy of all-trans retinoic acid inducing signals for adult T-cell leukemia. *Leukemia*.;19(6):1010-7, 2005.
164. YAMAGUCHI K, TAKATSUKI K. Adult T cell leukaemia-lymphoma. *Baillière's clinical haematology*. (4):899-915, 1993.
165. YODIM KA, QAISER MZ, BEGLEY DJ, RICE-EVANS CA, ABBOTT NJ. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Radic Biol Med*. 2004 Mar 1;36(5):592-604. Erratum in: *Free Radic Biol Med*. 2004 15;36(10):1342.
166. YODIM KA, SHUKITT-HALE B, JOSEPH JA. Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. *Free Radic Biol Med*. 2004; 1;37(11):1683-93.

---

## ***Anexos***

---

## 9 Anexos

### ***9.1 Atividades desenvolvidas durante o período de Doutorado (Março de 2008 a Abril de 2010).***

#### **9.1.1 Publicações**

##### **Capítulo de Livro (n=1):**

MARTINS, Marina Lobato; BARBOSA-STANCIOLI, E. F.; BRITO-MELO, G. E. A.; COELHO-DOS-REIS, J. G. A.; MARTINS-FILHO, O.A.; GIPH. Investigação laboratorial da infecção pelo HTLV em Medicina Laboratorial para o Clínico. . In: Cooperativa Editora e de Cultura Médica Ltda.. (Org.). Cooperativa Editora e de Cultura Médica Ltda. 2009.

##### **Artigos Científicos Publicados (n=3):**

De Souza JG, Fonseca FG, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Martins CP, Carvalho LD, COELHO-DOS-REIS JG; GIPH, Barbosa-Stancioli EF. Diagnostic tool based on an HTLV-1-Tax expression system in eukaryotic cells using a poxvirus vector. Journal of Virological Methods. 2010 Feb 26.

Garcia, Lúcia Maria, COELHO-DOS-REIS, Jordana Graziela Alves, Peruhype-Magalhães, Vanessa, Teixeira-Carvalho, Andréa, Rocha, Roberta Dias Rodrigues, Araújo, Márcio Sobreira Silva, Gomes, Izabelle Teixeira, Carvalho, Sílvio Fernando Guimarães, Dietze, Reynaldo, Lemos, Elenice Moreira. Anti-fixed Leishmania chagasi promastigotes IgG antibodies detected by flow cytometry (FC-AFPA-IgG) as a tool for serodiagnosis and for post-therapeutic cure assessment in American visceral leishmaniasis. Journal of Immunological Methods. , p.1 - , 2009.

COELHO-DOS-REIS, J. G. A., Martins-Filho, Olindo Assis, de Brito-Melo, Gustavo Eustáquio Alvim, Gallego, Sandra, Carneiro-Proietti, Anna Bárbara, Souza, Jaqueline Gontijo, Barbosa-

---

Stancioli, Edel Figueiredo. Performance of IgG and IgG1 anti-HTLV-1 reactivity by an indirect immunofluorescence flow cytometric assay for the identification of persons infected with HTLV-1, asymptomatic carriers and patients with myelopathy. *Journal of Virological Methods.* , v.160, p.138 - 148, 2009.

**Artigos Científicos submetidos (n=4):**

1. Evaluation of Quercetin and Kaempherol effects on the surface of MT-2 cells visualized by Atomic Force Microscopy. Coelho-dos-Reis J. G. A., Gomes O. A., Bortoloni D. E., Martins M.L., Lamego M.R. A., Martins C.P.S., Carvalho L.D., Souza J. G., & Barbosa-Stancioli E. F, 2010.
2. Evaluation of antiviral activity of Kaempherol and Quercetin on HTLV-1 gene and protein expressions. Coelho-dos-Reis J. G. A., Martins M.L., Lamego M.R. A., Carneiro-Proietti A. B., Souza-Fagundes E. M.; Martins C.P.S., Carvalho L.D., Souza J. G., & Barbosa-Stancioli E. F, 2010.
3. Immunomodulatory effect of quercetin on PBMC and THP-1 after unspecific and HTLV-1 specific stimulation. Coelho-dos-Reis J. G. A., Martins C.P.S., Martins M.L., Lamego M.R. A., Souza-Fagundes E. M.; Martins-Filho O.A.; Teixeira-Carvalho A.; Carneiro-Proietti A. B., Carvalho L.D., Souza J. G., & Barbosa-Stancioli E. F, 2010.
4. Two-phase cellular and humoral immune response and proviral load follow-up in HTLV-1 infected patients. Souza J. G., Martins-Filho O. A., Brito-Melo G. E., Martins M. L., Carvalho L. D., COELHO-DOS-REIS J. G. A., Teixeira-Carvalho A., Carneiro-Proietti A. B. F., GIPH and Barbosa–Stancioli E. F. Submetido a *Human Immunology*, 2010.



---

### 9.1.2 Resumos publicados em anais de Congressos e eventos científicos (n=23 publicações).

1. Coelho-dos-Reis, Jordana Graziela Alves, Souza-Fagundes, E.M., MARTINS, L.M., Almeida, M.R., Barbosa-Stancioli, Edel Figueiredo Avaliação da inibição da proliferação mediada por quercetina em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV In: I Simpósio do Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em HTLV, 2010, Belo Horizonte. Anais do I Simpósio do Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em HTLV. , 2010.
2. Coelho-dos-Reis, J. G. A., Almeida, M.R., MARTINS, L.M., Martins-Filho, Olindo Assis, Teixeira-Carvalho, Andréa, Martins, C.P.S., Barbosa-Stancioli, Edel Figueiredo Estabelecendo o efeito imunomodulatório de quercetina em PBMC induzido com uma porção C-terminal da proteína Tax recombinante do HTLV-1 In: I Simpósio do Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em HTLV, 2010, Belo Horizonte. Anais do I Simpósio do Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em HTLV. , 2010.
3. Parisi-Dutra M., Coelho-dos-Reis, Jordana Graziela Alves, Martins, C.P.S., Barbosa-Stancioli, Edel Figueiredo Establishing the cytotoxic effect of a C-terminal portion of HTLV-1 tax recombinant protein in a human monocytic cell lineage -THP-1 In: XX National Meeting of Virology, 2009, Brasília. **Virus Reviews and Research**. Brasília: SBV, 2009. v.14. p.153 – 153.
4. Coelho-dos-Reis, Jordana Graziela Alves, Laguardia-Nascimento M., Gomes O.A., Bortoloni, D. E., Barbosa-Stancioli, Edel Figueiredo. Topographical atomic force microscopy images of a permanently HTLV-1-infected cell lineage - MT-2 In: XX National Meeting of Virology, 2009, Brasília. **Virus Reviews and Research**. Brasília: SBV, 2009. v.14. p.199 – 199.
5. Parisi-Dutra M., Coelho-Dos-Reis, J. G. A., Martins, C.P.S., Barbosa-Stancioli, E. F. Avaliação do efeito citotóxico da porção C-terminal da proteína recombinante Tax do HTLV-1 em células da linhagem monocítica humana – THP-1. In: XVIII Semana de Iniciação Científica da Universidade Federal de Minas Gerais, 2009, Belo Horizonte. Anais da XVIII Semana de Iniciação Científica da Universidade Federal de Minas Gerais. , 2009.

- 
6. Carvallho LD, Souza, J. G., Brito-Melo, Gustavo Eustáquio Alvim, MARTINS, L.M., NAMEN-LOPES, M. S., Martins, C.P.S., Ribas, João Gabriel, Martins-Filho, Olindo Assis, Coelho-dos-Reis, Jordana Grazziela Alves, Barbosa-Stancioli, Edel Figueiredo. Gender-differentiated immune activation in HTLV-1-infected individuals. In: XX National Meeting of Virology, 2009, Brasília. **Virus Reviews and Research**. Brasília: SBV, 2009. v.14. p.97 – 98.
  7. Cloves, A.S., Parisi-Dutra M., Coelho-dos-Reis, Jordana Grazziela Alves, Martins, C.P.S., Souza, J. G., NOBRE, V., Barbosa-Stancioli, Edel Figueiredo. Evaluation of anti-HTLV-1 IgG reactivity in a family with high prevalence of HTLV-1 infection and high incidence of dermatological diseases In: XX National Meeting of Virology, 2009, Brasília. **Virus Reviews and Research**. Brasília: SBV, 2009. v.14. p.147 - 147
  8. Martins, C.P.S., Souza, J. G., Carvallho LD, Coelho-dos-Reis, Jordana Grazziela Alves, Cloves, A.S., Martins, L.M., Barbosa-Stancioli, Edel Figueiredo. Evaluation of the anti-tax response and the proviral load in HTLV-1-infected individuals. In: XX National Meeting of Virology, 2009, Brasília. **Virus Reviews and Research**. Brasília: SBV, 2009. v.14. p.203 – 203.
  9. Cloves, A.S. ; Coelho-Dos-Reis, J. G. A. ; Martins, C.P.S. ; Alves, LA ; Nobre, V. ; Barbosa-Stancioli, Edel Figueiredo . Perfil de reatividade sorológica anti-antígenos do Vírus Linfotrófico de Células T Humanas em indivíduos de uma família com alta prevalência da infecção pelo vírus e predominância de lesões dermatológicas.. In: XLV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2009, Recife. **Medtrop2009 - Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2009. v. 42. p. 72-72.
  10. Dutra, M.P. ; Coelho-Dos-Reis, J. G. A. ; Martins, C.P.S. ; Souza-Fagundes, E.M. ; Almeida, M.R. ; MARTINS, L.M. ; Barbosa-Stancioli, Edel Figueiredo . Avaliação da expressão de RNAm de interfeon em células monocíticas humanas THP-1, na presença de diferentes concentrações de quercetina. In: XIV Congresso Panamericano de Infectologia e II Congresso da Sociedade Ibero-Americana de infectologia -SIAI., 2009, Campos do Jordão. **Anais do XIV Congresso Panamericano de Infectologia e II Congresso da Sociedade Ibero-Americana de infectologia.**, 2009. v. 1. p. 1.

- 
11. Coelho-Dos-Reis, J. G. A. ; Dutra, M.P. ; Martins, C.P.S. ; Martins, L.M. ; Souza-Fagundes, E.M. ; Almeida, M.R. ; Barbosa-Stancioli, E. F. . Avaliação da expressão de RNAm de interferon em células monocíticas humanas THP-1, na presença de diferentes concentrações de quercetina.. In: V Forum em Microbiologia Prof. Eduardo Osorio Cisalpino, 2009, B.H.. Anais do V Forum em Microbiologia Prof. Eduardo Osorio Cisalpino, 2009. v. 1. p. 1-1.
  12. Cloves, A.S. ; Coelho-Dos-Reis, J. G. A. ; Martins, C.P.S. ; Alves, LA ; Nobre, V. ; Barbosa-Stancioli, E. F. . Perfil de reatividade sorológica anti-antígenos do HTLV-1 em indivíduos de uma família com alta prevalência da infecção pelo vírus e predominância de lesões dermatológicas.. In: V Forum em Microbiologia Prof. Eduardo Osorio Cisalpino, 2009, B.H.. Anais do V Forum em Microbiologia Prof. Eduardo Osorio Cisalpino, 2009. v. 11. p. 1-1.
  13. Martins, C.P.S. ; Alves, LA ; Coelho-Dos-Reis, J. G. A. ; Souza, Jaqueline Gontijo ; Barbosa-Stancioli, E. F. . Expressão da proteína tax de HTLV-1 em sistema procaríoto, para utilização no estudo da infecção pelo HTLV-1.. In: V Forum em Microbiologia Prof. Eduardo Osorio Cisalpino, 2009, B.H.. Anais do V Forum em Microbiologia Prof. Eduardo Osorio Cisalpino, 2009. v. 1. p. 1-1.
  14. Coelho-Dos-Reis, J. G. A. ; Souza-Fagundes, E.M. ; Martins, L.M. ; Almeida, M.R. ; Barbosa-Stancioli, E. F. . Evaluation of the Quercetin-Mediated Inhibition of PHA-Induced Proliferation of PBMC from HTLV-1-infected individuals and assessment of MT-2 cells viability in the presence of quercetin.. In: 14th International Conference on Human Retrovirology, 2009, Salvador. Annals of 14 th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and related retroviruses, 2009. v. 1. p. 1-1.
  15. Martins, C.P.S. ; Alves, LA ; Carvalliho LD ; Souza, Jaqueline Gontijo ; Coelho-Dos-Reis, J. G. A. ; Cloves, A.S. ; BARBOSA-STANCIOLI, E. F. . Anti-Tax antibody profile in HTLV-1 asymptomatic carriers and HAM/TSP.. In: 14th International Conference on Human Retrovirology, 2009, Salvador. of the 14th International Conference on Human Retrovirology, 2009. v. 1. p. 1-1.
  16. Cloves, A.S. ; Coelho-Dos-Reis, J. G. A. ; Martins, C.P.S. ; Nobre, V. ; Barbosa-Stancioli, E. F. . Quantitative Anti-HTLV-1 Reactivity Profile Evaluation of Persons from

- 
- a Family with High Prevalence of Infection and of Dermatological Disorders Associated with HTLV-1.. In: 14th International Conference on Human Retrovirology, 2009, Salvador. Annals of 14th International Conference on Human Retrovirology, 2009. v. 1. p. 1-1.
17. Coelho-Dos-Reis, J. G. A. ; Martins, C.P.S. ; Martins, L.M. ; Martins Filho, O. A. ; Almeida, M.R. ; Teixeira-Carvalho, Andréa ; Barbosa-Stancioli, E. F. Establishing the immunomodulatory effect of quercetin on PBMC induced with a c-terminal portion of HTLV-1 Tax recombinant protein. In: 14th International Conference on Human Retrovirology, 2009, Salvador. Annals of 14th International Conference on Human Retrovirology, 2009. v. 1. p. 1-1.
18. Coelho-Dos-Reis, J. G. A. ; Martins Filho, O. A. ; Souza, J. G. ; Melo, G. E. A. B. ; Martins, C.P.S. ; Barbosa-Stancioli, E. F. . Qualitative and Quantitative analysis of anti-HTLV-1 IgG reactivity by western assay in sera from asymptomatic carriers and HAM/TSP patients. In: XIX National Meeting of Virology, 2008, Caxambu. Anais do XIX National Meeting of Virology, 2008.
19. Martins, C.P.S. ; Alves, LA ; Coelho-Dos-Reis, J. G. A. ; Souza, J. G. ; Barbosa-Stancioli, E. F. . A useful indirect ELISA System based on Tax recombinant protein and its utility to the disease progression follow up of HTLV-1 infected patients.. In: XIX National Meeting of Virology, 2008, Caxambu. Anais do XIX National Meeting of Virology, 2008.
20. Martins, C.P.S. ; Alves, LA ; COELHO-DOS-REIS, J. G. A. ; SOUZA, J. G. ; BARBOSA-STANCIOLI, E. F. . Expressão da proteína tax de HTLV-1 em sistema procaríota, para utilização no estudo da infecção pelo HTLV-1.. In: IV Fórum em Microbiologia Prof. Eduardo Osorio Cisalpino, 2008, Belo Horizonte. Anais do IV Fórum em Microbiologia Prof. Eduardo Osorio Cisalpino, 2008.
21. Coelho-dos-Reis, J. G. A. ; MARTINS FILHO, O. A. ; MELO, G. E. A. B. ; SOUZA, J. G. ; Martins, C.P.S. ; BARBOSA-STANCIOLI, E. F. . Avaliação do perfil de reatividade de IgG anti-antígenos do HTLV-1, por citometria de fluxo e ensaio de Western, em soros de indivíduos infectados pelo HTLV-1. In: IX Encontro de Pesquisa do Instituto de Ciências Biológicas - IV Encontro anual de pesquisa em Bioquímica e Imunologia -

---

Comemoração dos 40 anos do ICB e do programa de pós-graduação em Bioquímica e Imunologia., 2008, Belo Horizonte. Anais do IX Encontro de Pesquisa do Instituto de Ciências Biológicas, 2008.

22. Coelho-dos-Reis, J. G. A. ; Souza-Fagundes, E.M. ; Almeida, M.R. ; Martins, C.P.S. ; Cloves, A.S. ; Barbosa-Stancioli, E. F. . Avaliação viabilidade de células Monocíticas THP-1 na presença de diferentes concentrações do composto polifenólico quercetina para estudos de sua atividade terapêutica in vitro.. In: II Congresso de Fitoterápicos do Mercosul - VI Reunião da Sociedade Latinoamericana de Fitoquímica, 2008, Belo Horizonte. Plantas Medicinais Ameríndias, 2008.
23. Coelho-dos-Reis, J. G. A.; Martins-Filho, O. A.; Brito-Melo, G. E. A. Souza J.G.; Martins, I.M.; Barbosa-Stancioli, E. F. Imunofluorescência indireta por citometria de fluxo como método alternativo para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-1.. In: IV Forum em Microbiologia Prof. Eduardo Osorio Cisalpino, 2008, Belo Horizonte. Anais do IV Forum em Microbiologia Prof. Eduardo Osorio Cisalpino, 2008.

### 9.1.3 Participação em Eventos (6 eventos regionais, 1 evento nacional e 3 eventos internacionais).

1. IV Forum em Microbiologia Prof. Eduardo Osorio Cisalpino, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
2. II Congresso de Fitoterápicos do Mercosul - VI Reunião da Sociedade Latinoamericana de Fitoquímica, Faculdade de Ciências Econômicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

- 
3. IX Encontro de Pesquisa do Instituto de Ciências Biológicas - IV Encontro anual de pesquisa em Bioquímica e Imunologia - Comemoração dos 40 anos do ICB e do programa de pós-graduação em Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
  4. Comemoração dos 46 anos do Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
  5. XIX National Meeting of Virology, Caxambu, Minas Gerais, 2008.
  6. V Forum em Microbiologia Prof. Eduardo Osorio Cisalpino, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.
  7. X Semana da Enfermagem. Mini-curso Imunologia de doenças infecto-parasitárias. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Campus Betim, 2009.
  8. 14th International Conference on Human Retrovirology, Salvador, 2009.
  9. *Seminar Series* (Série de Seminários). Institute for Molecular Medicine and Infectious Disease. Drexel Institute for Biotechnology and Virology Research, Philadelphia, Estados Unidos, 2009.

---

10. I Simpósio do Grupo Interdisciplinar em Pesquisa em HTLV. Fundação HEMOMINAS, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2010.

#### 9.1.4 Prêmios e Títulos

Prêmio recebido por melhor resumo no Congresso Internacional de HTLV, realizado em Salvador, 2009.

*International Retrovirology Association Scholarship award for best abstract in the 14th International Conference on Human Retrovirology, International Society of Human Retrovirology.*

#### 9.1.5 Orientações e Supervisões (2 co-orientações)

##### 1. Co-orientação de Iniciação Científica (Novembro de 2008 a Março de 2010)

Marina Parisi Dutra. Avaliação viabilidade e da expressão de citocinas de células Monocíticas THP-1 na presença de diferentes concentrações de quercetina e kaempferol para estudos de sua atividade terapêutica in vitro e da porção C-terminal da proteína recombinante RecTax do HTLV-1. Aluna do 6º período do curso de Medicina - Universidade Federal de Minas Gerais.

##### 2. Co-orientação de monografia de especialização finalizada

Luis Adan Flores de Andrade. Bacteriófagos e sua importância como potencial ferramenta de controle bacteriano perante a eminência da resistência a terapia com antibióticos. Aluno da especialização em microbiologia – Universidade Federal de Minas Gerais.

---

### 9.1.6 Seminários ministrados

#### 1. Imunologia da infecção pelo HTLV-1.

Seminário apresentado na X Semana da Enfermagem, dentro do contexto do Mini-curso: Imunologia de doenças infecto-parasitárias. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Campus Betim, 2009.

#### 2. Marcadores imunológicos de HAM/TSP.

Seminário apresentado na série de seminários da Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2009.

#### 3. Evaluation of immunological parameters as indicators of clinical progression in the HTLV-1 chronic infection.

Seminário apresentado como componente de entrevista de pós-doutorado na série de seminários (Seminar Series) do *Institute for Molecular Medicine and Infectious Disease. Drexel Institute for Biotechnology and Virology Research*, Philadelphia, Estados Unidos, 2009.

### 9.1.7 Atividades de Docência

- Aula Prática de Bacteriófagos – Especialização em Microbiologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2009. Carga horária: 4 horas.
- Aulas Prática de Microbiologia no Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.



---

**Encargo didático obrigatório designado para bolsista CAPES-REUNI (2009 e 2010):**

Curso de Farmácia – Carga horária: 4 horas semanais - 2º semestre de 2009

Curso de Veterinária – Carga horária: 4 horas semanais - 1º semestre de 2010.

**Substituições no departamento de Microbiologia**

Carga horária = 22 horas (2º semestre de 2009) e 4 horas (1º semestre de 2010).

## 9.2 Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

### Termo de consentimento Livre Esclarecido (TCLE)

A pesquisa intitulada "Avaliação da atividade antiviral. Imunomodulatória e antioxidante dos compostos polifenólicos quercetina e kaempferol no contexto da infecção pelo 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-1/2 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-1/2.
- 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 (8 ml) 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: \_\_\_\_\_

Para contato com o pesquisador:  
**Edel Figueiredo Barbosa Stancioli - coordenadora - Telefone - 3499-2753**  
**Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis - Telefone - 3499-2736**  
Comitê de ética em pesquisa - COEP - Unidade Administrativa II - 2º andar - sala 2005  
Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha. Fone: 3499-4592

### **9.3 Aceite do Comitê de Ética em Pesquisa**



**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.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. T. Marques Amaral', is positioned above the printed name.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral  
Coordenadora do COEP-UFMG**