



UNIRIO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS

INSTITUTO BIOMÉDICO - IB

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA – DMP

BARBARA SIMONSON GONÇALVES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DO EXTRATO NATURAL DE *Synadenium grantii*
EM MODULAR A REPLICAÇÃO DO HIV-1 E A PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM
PACIENTES COM AIDS**

Rio de Janeiro

2018

BARBARA SIMONSON GONÇALVES

Avaliação do potencial do extrato natural de *Synadenium grantii* em modular a replicação do HIV-1 e a produção de citocinas em pacientes com Aids

Monografia apresentada à disciplina de Imunologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto Biomédico para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Cleonice Alves de Melo Bento.

Rio de Janeiro

2018

Gonçalves, Barbara Simonson

G635 Avaliação do potencial do extrato natural de *Synadenium grantii* em modular a replicação do HIV-1 e a produção de citocinas em pacientes com Aids. / Barbara Simonson Gonçalves. – Rio de Janeiro: UNIRIO/IB, 2018.

89 f.

Orientadora: Cleonice Alves de Melo Bento.

Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Graduação em Biomedicina, 2018.

1. HIV/Aids. 2. Latência. 3. Replicação viral. 4. Imunomodulação. 5. *Synadenium grantii*

Avaliação do potencial do extrato natural de *Synadenium grantii* em modular a replicação do HIV-1 e a produção de citocinas em pacientes com Aids

Monografia apresentada à disciplina de Imunologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto Biomédico para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Renato Geraldo da Silva Filho

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

MSc. Clarice Monteiro Rodrigues Santos

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Dr.^a Cleonice Alves de Melo Bento – Orientadora

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Dedico este trabalho a todos que contribuíram para minha chegada até aqui, às pessoas cuja vida foi abalada pela infecção pelo HIV e àquelas que aguardam, ansiosas, a cura. Dedico também à pessoa que serei no futuro, cuja trajetória não posso prever, mas que espero ser de muitas realizações assim como este trabalho está sendo para o meu eu presente.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à energia superior, cuja personificação talvez se chame Deus, pela minha existência e pela combinação de fatos que me trouxeram até aqui. Os agradecimentos a seguir só serão possíveis graças aos caminhos que me permitiram conhecer e viver tudo que vivi.

Agradeço a minha mãe por todo amor, educação e tempo que ela dedicou a minha criação. O mesmo devo dizer sobre minha avó, que infelizmente não está mais aqui comigo, mas que foi essencial para eu ser quem sou hoje. Obrigada por me colocar no teatro, por me incentivar em cada obstáculo. Agradeço ao meu avô que foi e continua sendo um pai para mim e que me ensinou a não nunca desistir dos meus sonhos. Arrisco-me a dizer que estes meus avós são as pessoas da família com as quais eu mais me identifico. Agradeço também a minha avó emprestada que esteve presente em todos os momentos da minha vida e participou da minha criação.

Agradeço ao meu pai por, apesar da distância, nunca ter se ausentado e deixado de se preocupar comigo. A toda minha família pelo suporte e atenção, em especial a minha tia Anna pela qual eu tenho imenso carinho e confiança.

Muito especiais foram meus amigos de dentro e fora da faculdade, que me deram conselhos, me distraíram e me incentivaram a persistir. Que se fizeram presente nas mais diversas ocasiões. Destaco aqui os bezerros mais lindos do mundo e os momentos mais especiais da Biomedicina para mim.

Lana, obrigada por cada abraço, conselho, risada, ensinamento e por ter sido sempre presente nesses cinco anos. Obrigada por me entender tão bem. Ingrid, obrigada por não desistir da nossa amizade, mesmo tanto tempo distante. Obrigada por sua racionalidade e conselhos sobre os mais diversos assuntos. Carina, obrigada por estar ao meu lado em momentos tão difíceis e tão agradáveis, por me ajudar a ser uma pessoa melhor. Sem vocês esse caminho seria ainda mais difícil.

Agradeço a minha incrível orientadora, Cléo, que me acolheu aos 45 do segundo tempo e me permitiu realizar este projeto. Ela possui uma empatia única e

uma forma de ensinar que nos faz querer aprender cada vez mais. Obrigada por ser mais do que uma orientadora, você também é uma amiga, conselheira, mãe. Inspiração.

Agradeço aos colegas de laboratório por cada ensinamento e cada risada, em especial à Lana, Priscila, Clarice e Taissa. Ao professor Paulo Damasco e ao Felipe, que tiveram em contato com os pacientes, realizando a coleta do sangue e de dados clínicos. Aos próprios pacientes, que aceitaram participar deste estudo, sem eles nada disso seria possível. Agradeço à Lurdinha, pelos sorrisos no corredor e pela assistência nas autoclavações. Ao professor Amilcar Tanuri, que conheço apenas de nome e de publicações, mas que foi fundamental para a realização deste trabalho.

Agradeço à professora Maria do Rosário, do colégio Cícero Penna, e aos professores do meu amado colégio Pedro II que participaram de forma significativa de minha formação. Ao professor Antônio Carlos, que me ajudou na difícil escolha do curso. Agradeço aos professores Alexandre, Felipe e Edmar em especial, vocês me marcaram de uma forma extremamente positiva.

A minha orientadora Danuza, do PROVOC no ensino médio, que me introduziu na pesquisa científica e fez com que eu me apaixonasse pela bancada. Talvez, sem ela, eu não tivesse escolhido a Biomedicina. Ao professor Renato e à professora Rosa que, desde o primeiro período, no Programa Jovens Talentos para Ciência, me acolheram e me ofereceram o segundo contato com a pesquisa científica. Ao professor Diego que me incentivou em diversos momentos e me ensinou que a ciência vai muito além da pesquisa básica.

Ao Programa Ciência sem Fronteiras, em parceria com a CAPES e o Campus France que mudou minha percepção sobre ensino e proporcionou um autoconhecimento necessário sem o qual eu não seria metade do que sou hoje. Obrigada por proporcionar a melhor experiência vivida nesses 23 anos.

Aos meus amigos do intercâmbio, que foram minha família por um ano e que me ajudaram a não desistir, em especial à Thamiris, Naíra, Marcos, Kathrin e Vanessa. Vocês foram maravilhosos.

Aproveito para agradecer à Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, às agências de fomento que permitiram a realização deste projeto e ao Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia.

“Sonhos determinam o que você quer.

Ação determina o que você conquista.”

Aldo Novak

RESUMO

A introdução da terapia antirretroviral (TARV) a partir de 1996 mudou completamente o cenário da Aids, antes fatal, hoje uma condição clínica crônica e controlável. Apesar do grande impacto da TARV na sobrevivência dos pacientes, a cura ainda não é possível. O principal obstáculo é a presença de reservatórios virais não acessíveis às drogas que compõem o esquema terapêutico. Esses reservatórios são constituídos, principalmente, por linfócitos T CD4⁺ de memória central residentes nos folículos linfoides. Portanto, pesquisadores têm se dedicado à descoberta de moléculas capazes de reativar o ciclo replicativo do HIV a partir do DNA pró-viral inserido ao genoma humano. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade do extrato alcoólico do látex da planta Janaúba (JALEx) em modular a replicação do HIV-1 e a produção de citocinas pelas células T de pacientes com Aids submetidos à TARV. Para tanto, células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidas e mantidas por 24 h na presença de diferentes concentrações de JALEx (1 a 0,01 µg/mL). A produção de citocinas foi avaliada por ELISA e por citometria de fluxo. A taxa de replicação viral foi determinada por qRT-PCR. Nós observamos que a maior concentração do JALEx reduziu, de forma expressiva, a viabilidade das células T CD4⁺ quando analisadas por citometria de fluxo após a marcação com o 7-AAD. Esse efeito adverso foi muito provavelmente relacionado à maior replicação viral que foi detectada nessas culturas. Devido à grande morte celular, as análises da produção de citocina foram realizadas com concentrações menores do JALEx. O extrato, a 0,1 µg/mL, induziu a produção de várias citocinas inflamatórias, mas não da IL-10. Ademais, essa concentração foi capaz de elevar não apenas a porcentagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺ positivas para IFN-γ e IL-17, como também diferentes subtipos de células T capazes de produzir IL-21. De forma interessante, enquanto os níveis de IL-1β, IL-6 e TNF-α em resposta à JALEx foram positivamente correlacionados com a taxa de replicação viral em cultura, a porcentagem das células T IL-21⁺ foi maior nas culturas de CMSP com menor replicação do vírus. Nossos resultados, apesar de preliminares, revelam a capacidade do extrato alcoólico da Janaúba em induzir a replicação do HIV-1 e modular a produção de citocinas em pacientes com Aids.

Palavras-chave: HIV/Aids, Latência, Replicação viral, Imunomodulação, *Synadenium grantii*.

ABSTRACT

The introduction of antiretroviral therapy (ART) in 1996 has completely changed the scenario of AIDS, before a fatal, and, today, a controllable chronic clinical condition. Despite the great impact of ART on patient survival, cure is not yet possible. The main obstacle is the presence of reservoirs that are not available among the drugs of therapy schemes. These reservoirs are composed mainly of central CD4⁺ T lymphocytes found in lymphoid follicles. Therefore, researchers have been dedicated to the discovery of molecules capable of reactivating the replicative cycle of HIV from the pro-viral DNA found into the human genome. In this sense, the present study aimed to evaluate the ability of latex alcoholic extract (JALEx) obtained from *Janaúba* plant to modulate HIV-1 replication and cytokine production by T cells from Aids patients undergoing ART. For this, peripheral mononuclear cells (PBMC) from 15 Aids patients were obtained and maintained for 24 h in the presence of different concentrations of JALEx (1 to 0,0,1 µg/mL). Cytokine production was assessed by ELISA and flow cytometry. The viral replication rate was determined by qRT-PCR. We observed that the higher concentration of JALEx significantly reduced the viability of CD4⁺ T cells when analyzed by flow cytometry after staining with 7-AAD. This adverse effect was most likely related to the higher viral replication that was detected in these cultures. Due to high cell death, the analysis of cytokine production was performed with lower doses of JALEx. This extract, at 0,1 µg/mL, induced the production of many inflammatory cytokines, but not IL-10. In addition, this dose was able to elevate not only the percentage of CD4⁺ T cells and CD8⁺ T positives for IFN-γ and IL-17, but also different T-cell subtypes capable of producing IL-21. Interestingly, while the levels of IL-1β, IL-6 and TNF-α produced in response to JALEx were positively correlated with the rate of viral replication, the percentage of IL-21⁺ T cells was higher in PBMC cultures with lower virus replication. Although preliminary, our results reveal the ability of *Janaúba*'s alcoholic extract to induce HIV-1 replication and modulate the production of cytokines in Aids patients.

Key words: HIV/AIDS, Latency, Viral Replication, Immunomodulation, *Synadenium grantii*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Estrutura do vírus HIV. | 26 |
| Figura 2 – Ciclo Replicativo do HIV. | 30 |
| Figura 3 – Curso natural da Infecção pelo HIV-1. | 34 |
| Figura 4 – Translocação microbiana em pacientes com Aids. | 39 |
| Figura 5 – <i>Synadenium grantii</i> Hook. f.. | 50 |
| Figura 6 – Efeito do extrato alcoólico do látex da Janaúba na viabilidade das células T e replicação do HIV-1 em culturas de células de pacientes com Aids.. | 60 |
| Figura 7 – Dosagem de citocinas em culturas de CMSP de pacientes com Aids mantidas na presença de extrato alcoólico do látex da Janaúba | 62 |
| Figura 8 – Habilidade do JALEx em modular a produção de citocinas pelas células T de pacientes com Aids. | 63 |
| Figura 9 – O extrato alcoólico do látex da Janaúba eleva <i>in vitro</i> diferentes subtipos de células T produtoras de IL-21 em pacientes com Aids | 64 |
| Figura 10 – Correlações entre a replicação viral <i>in vitro</i> e citocinas em culturas de CMSP de pacientes com Aids mantidas na presença do extrato alcoólico do látex da Janaúba..... | 67 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Classes de antirretrovirais utilizados na terapia anti-HIV autorizados pelo Ministério da Saúde..... | 44 |
| Tabela 2 – Características dos Pacientes HIV-1 ⁺ | 58 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3TC – Lamivudina

7AAD – 7-aminoactinomicina D

ABC – Abacavir

ADCC – do inglês Antibody Dependent Cell Cytotoxicity

APOBEC3 – do inglês Apolipoprotein B mRNA Editing Complex 3

APV – Amprenavir

ATV – Atazanavir

AZT – Zidovudina

CAF – do inglês Cytostatic Antiviral Factor

CCR5 – do inglês CC chemokine Receptor type 5

CD – do inglês Cluster of differentiation

CDK9 – do inglês Cyclin-Dependent Kinase 9

CMSP – Células Mononucleares do Sangue Periférico

CRF – do inglês Circulating Recombinant Forms

CTL – do inglês Cytotoxic T Lymphocyte

CVP – Carga Viral Plasmática

CXCR4 – do inglês CXC chemokine Receptor type 4

d4T – Estavudina

DC – do inglês Dendritic cell

DC-SIGN – do inglês Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3
Grabbin Non-Integrin

ddc – Zalcitabina

ddl – Didanosina

DLV – Delavirdina

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – do inglês Deoxyribonucleic Acid

DNAC – do inglês Deoxyribonucleic Acid complementary

DRV – Darunavir

DTG – Dolutegavir

EAT – do inglês Ehrlich Ascites Tumor

EFZ – Enfavirenz

ELISA – do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FDA – do inglês Food and Drug Administration

FPV – Fosamprenavir

gp – Glicoproteína

HAT – Histona Acetiltransferase

HDAC – Histona desacetilase

HIV – do inglês Human Immunodeficiency Virus

HLA – do inglês Human Leukocyte Antigen

IDV – Indinavir

IFN – Interferon

Ig - Imunoglobulina

IL – Interleucina

INNTR – Inibidor Não Nucleosídico da Transcristase Reversa

INTR – Inibidor Nucleosídico da Transcriptase Reversa

IO – Isonomicina

IRF – do inglês Interferon Regulatory Factor

ISG – do inglês Interferon-Stimulated Genes

JALEx – do inglês Janaúba Alcoholic Latex Extract

KIR – do inglês Killing Inhibitory Receptor

LPV – Lopinavir

LRA – do inglês Latency-Reversing Agent

LTNP – do inglês Long-Term Non Progressor

LTR – do inglês Long Terminal Repeats

mAbs – do inglês monoclonal Antibodies

mDC – do inglês myeloid Dendritic Cells

MHC – do inglês Major Histocompatibility Complex

MIP-1 – do inglês Macrophage Inflammatory Protein

miRNA – do inglês micro Ribonucleic Acid

mRNA – do inglês messenger Ribonucleic Acid

MRV – Maraviroc

NASBA – do inglês Nucleic Acid Sequence Based Amplification

Nef – do inglês Negative regulatory factor

NFAT – do inglês Nuclear Factor of Activated T-cells

NFV – Nelfinavir

NF- κ B – do inglês Nuclear Factor kappa B

NK – do inglês Natural Killer

NVP – Nevirapina

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – do inglês Phosphate Buffered Saline

PD-1 – do inglês Programmed Death protein 1

pDC – do inglês plasmacytoid Dendritic Cells

PIC – do inglês Pre-Integration Complex

PKC – Proteína Kinase C

PMA – do inglês Phorbol 12-Myristate 13-Acetate

P-TEFb – do inglês Positive Transcription Elongation Factor b

qRT-PCR – do inglês Real-Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

RAL – Raltegravir

RANTES – do inglês Regulated Upon Activation Normal T-Cell Expressed and Secreted

Rev – do inglês regulator of RNA splicing

RNA – do inglês RIBONUCLEIC ACID

RNAi – do inglês Ribonucleic Acid interference

RRE – do inglês Rev Response Element

RTV – Ritonavir

SDF – do inglês Stromal-cell Derived Fator

SFB – Soro Fetal Bovino

SINAN – Sistema de Informação de Notificações de Agravo

SIV – do inglês Simian Immunodeficiency Syndrome

SNC – Sistema Nervoso Central

SP-1 – do inglês Sphingosine 1-Phosphate

SQV – Saquinavir

STAT-1 – do inglês Signal Transducer and Activator of Transcription

T-20 – Enfuvirtida

TAR – do inglês Trans-activating Response Element

TARV – Terapia Antirretroviral

Tat – do inglês Trans-activator of transcription

TCR – do inglês T Cell Receptor

TDF – Tenofovir

T_{FH} – do inglês follicular helper T cell

TGF- β – do inglês Transforming Growth Factor beta

Th – do inglês T helper cell

TLR – do inglês Toll-Like Receptors

TMB – 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina

TNF – do inglês Tumoral Necrosis Fator

TPV – Tipranavir

TRIM5 α – do inglês Tripartite Motif 5-alpha

UNAIDS – do inglês Joint United Nations Program on HIV/AIDS

URF – do inglês Unique Recombinant Forms

Vif – do inglês Viral infectivity factor

Vpr – do inglês Viral protein R

Vpu – do inglês Viral protein U

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1. | INTRODUÇÃO | 21 |
| 1.1 | CONSIDERAÇÕES GERAIS | 21 |
| 1.2 | O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA..... | 23 |
| 1.2.1 | Histórico e dados epidemiológicos | 23 |
| 1.2.2 | Estrutura e Ciclo replicativo | 25 |
| 1.3 | DESENVOLVIMENTO DA INFECÇÃO | 30 |
| 1.3.1 | Infecção Primária..... | 31 |
| 1.3.2 | Latência Clínica | 32 |
| 1.3.3 | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida | 33 |
| 1.4 | HIV E RESPOSTA IMUNE: PROTEÇÃO E PATOGÊNESE | 35 |
| 1.4.1 | Eventos imunes envolvidos no controle da replicação viral..... | 35 |
| 1.4.2 | HIV, imunopatogênese e progressão para Aids | 38 |
| 1.5 | TERAPIA ANTIRRETROVIRAL | 41 |
| 1.6 | REATIVAÇÃO DO VÍRUS HIV-1..... | 44 |
| 1.7 | A <i>Synadenium grantii</i> E SEU POTENCIAL EFEITO SOBRE A REATIVAÇÃO DO HIV-1 | 48 |
| 1.7.1 | Identificação..... | 48 |
| 1.7.2 | <i>Synadenium grantii</i> Hook. f.: efeitos biológicos | 50 |
| 2. | OBJETIVOS | 53 |
| 2.1 | GERAL | 53 |
| 2.2 | ESPECÍFICOS | 53 |
| 3. | METODOLOGIA..... | 54 |
| 3.1 | PACIENTES | 54 |
| 3.2 | OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE JANAÚBA..... | 54 |
| 3.3 | OBTENÇÃO E ESTIMULAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO <i>IN VITRO</i> | 55 |
| 3.4 | ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO..... | 56 |
| 3.5 | DOSAGEM DE SECREÇÃO DE CITOCINAS..... | 56 |

| | | |
|-----|---|----|
| 3.6 | DOSAGEM DA CARGA VIRAL POR QRT-PCR..... | 57 |
| 3.7 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 57 |
| 4. | RESULTADOS..... | 58 |
| 4.1 | CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES..... | 58 |
| 4.2 | EFEITO DO EXTRATO ALCÓOLICO DO LÁTEX DE <i>S. grantii</i> SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS T E A REPLICAÇÃO DO HIV-1 | 59 |
| 4.3 | EFEITO DO EXTRATO ALCÓOLICO DO LÁTEX DE <i>S. grantii</i> SOBRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM CULTURAS DE CMSP | 61 |
| 4.4 | EFEITO DO EXTRATO ALCÓOLICO DO LÁTEX DE <i>S. grantii</i> SOBRE A PERCENTAGEM DE CÉLULAS T EFETORAS DE PACIENTES COM AIDS..... | 61 |
| 4.5 | EFEITO DO EXTRATO ALCÓOLICO DO LÁTEX DE <i>S. grantii</i> SOBRE OS DIFERENTES SUBTIPOS DE CÉLULAS T PRODUTORAS DE IL-21 EM PACIENTES COM AIDS | 64 |
| 4.6 | CORRELAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DE IL-21 E A REPLICAÇÃO VIRAL NA CULTURA EM RESPOSTA AO EXTRATO ALCÓOLICO DO LÁTEX DE <i>S. grantii</i> | 65 |
| 5. | DISCUSSÃO | 67 |
| 6. | CONCLUSÕES | 73 |
| 7. | REFERÊNCIAS..... | 74 |
| 8. | ANEXO..... | 91 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Desde o início da epidemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids) causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) na década de 1980, mais de 35 milhões de indivíduos morreram por causas associadas à imunossupressão severa na qual o paciente é condicionado. Na atualidade, estima-se que 36,7 milhões de pessoas convivam com o HIV, sendo 2,1 milhões de crianças, demonstrando que a infecção continua sendo um grave problema de saúde pública com grande impacto socioeconômico (UNAIDS, 2017).

Apesar do HIV infectar cronicamente macrófagos e células dendríticas (DC, do inglês *dendritic cells*), sua capacidade de invadir e se replicar mais amplamente nos linfócitos T CD4⁺ impacta profundamente na habilidade do indivíduo em controlar infecções oportunistas e malignidades (TANTISIRIWAT; POWDERLY, 1999).

Felizmente, a introdução da terapia antirretroviral (TARV) de alta eficiência baseada na combinação de diferentes drogas que bloqueiam desde a invasão do vírus na célula hospedeira, replicação intracelular e maturação final da partícula infecciosa, mudou o cenário da Aids, antes uma condição clínica fatal, hoje uma doença crônica controlável. A capacidade da TARV em melhorar a qualidade e expectativa de vida dos indivíduos infectados pelo HIV depende não apenas do controle da replicação viral como também da reconstituição imune (VIARD et al., 2001; SAINZ et al., 2013).

Na ausência de uma vacina, a erradicação do vírus pela TARV é tema de um crescente debate nos últimos anos. Infelizmente, os fármacos utilizados bloqueiam a replicação viral apenas nas células hospedeiras ativadas, não conseguindo purgar o vírus das células em repouso latentemente infectadas, impedindo a tão almejada cura. Esses reservatórios são constituídos, principalmente, por linfócitos T CD4⁺ de memória central residentes nos folículos linfoides. Entretanto, a reativação do ciclo

replicativo do HIV a partir do DNA pró-viral inserindo ao genoma humano pode ser obtida através da ativação imune desses linfócitos, como ocorre durante infecções secundárias no paciente HIV positivo (CONTRERAS; LENASI; PETERLIN, 2006). Estima-se que esses linfócitos contendo o DNA pró-HIV sejam da ordem de 10^6 células em repouso e com uma meia-vida de aproximadamente 44 meses (CHUN et al., 1995), o que significa que seriam necessários 70 anos ininterruptos de uso da terapia para a erradicação do reservatório (FINZI et al., 1999). Além dos linfócitos, outros tipos celulares abrigam o vírus de forma latente, como no sistema nervoso central (SNC) as células dendríticas, monócitos e macrófagos em repouso, o que torna a erradicação do vírus ainda mais complicada. (TAKAHASHI et al., 1996; GEIJTENBEEK et al., 2000; IGARASHI et al., 2003; SHAROVA et al., 2005)

Diante deste cenário, estudos recentes dedicam-se à descoberta de moléculas capazes de induzir a reativação da replicação do HIV nos reservatórios celulares (DE CRIGNIS; MAHMOUDI, 2014). Infelizmente, as breves tentativas usando alguns ativadores policlonais de células T, como anticorpo anti-CD3 ou citocinas (IL-2 e IL-7), não se mostraram opções promissoras em purgar o vírus destes locais (SCRIPTURE-ADAMS et al., 2002). Como a reativação do vírus depende da ativação do fator de transcrição NF- κ B (do inglês *nuclear factor kappa B*) pela proteína quinase C (PKC), compostos que ativem a PKC podem ser promissores agentes que contribuam na redução dos reservatórios do vírus.

Nesse sentido, diferentes compostos naturais vêm sendo avaliados quanto às propriedades antivirais e reversoras de latência, como as espécies de plantas da família Euphorbiaceae, que sabidamente possuem compostos químicos que ativam a PKC (HASSAN; MOHAMED; MOHAMED, 2012; EL-MEKKAWY et al., 2000; JOSÉ et al., 2014). De forma interessante, a *Synadenium grantii* é uma representante desta família encontrada no sul do Brasil com os nomes de Janaúba ou leitosinha (MELO-REIS, 2010; ROGÉRIO, et al., 2007; ORTÊNCIO, 1997). O látex desta planta é utilizado para o tratamento de distúrbios gástricos, doenças neoplásicas e outras enfermidades (COSTA et al., 2012). Ésteres diterpeno do tipo forbol, semelhantes a ativadores da PKC, são descritos nesta espécie e podem apresentar um potencial agente reversor da latência do HIV-1, o que precisa ser investigado.

1.2 O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA

1.2.1 Histórico e dados epidemiológicos

O HIV-1 foi isolado em 1983 por pesquisadores franceses do Instituto Pasteur, a partir da biópsia de linfonodo de um paciente com linfadenopatia hiperplásica generalizada (PAIARDINI; MÜLLER-TRUTWIN, 2013). Nesta época, ocorria a pandemia de Aids e, logo no início, esta doença foi associada aos homens homossexuais e usuários de droga, trazendo um grande estigma a estes grupos que perdura até hoje. Ainda na década de 1980, foi observado que o vírus pertencia ao grupo dos retrovírus e que os linfócitos T CD4⁺ eram seu principal alvo de infecção, sendo estas células importantes marcadores do curso da doença. Devido à profunda imunossupressão vigente na Aids, muitos pacientes morriam por neoplasias (Sarcoma de Kaposi e linfomas de células B) e infecções (particularmente pelo *Pneumocystis jirovecii*) oportunistas (BARRE-SINOUSSE et al., 1983).

Em 1986, foi isolado o HIV-2 no Oeste da África, um vírus que está intimamente relacionado ao HIV-1, mas que apresenta uma variação significativa na composição do envelope (INGOLE et al., 2013). As análises epidemiológicas e filogenéticas disponíveis atualmente demonstram que o HIV foi introduzido na espécie humana entre 1920 e 1940. O HIV-1 evoluiu a partir de mutações no vírus da imunodeficiência símia de chimpanzés (SIVcpz) da África Central, enquanto o HIV-2 originou-se a partir do SIVsm, na África Ocidental (SEITZ, 2016).

O HIV-2 é endêmico na África Ocidental e tem se disseminado na Índia, mas representa apenas 1,4% dos casos de HIV no mundo. O HIV-1, além de ser o responsável pela grande pandemia de Aids, é mais virulento apresentando variações genéticas resultantes de uma alta taxa de mutação na enzima transcriptase reversa, que está intimamente associada à sua intensa capacidade replicativa (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010; DAW et al., 2017). Estas variações permitem diferenciá-lo em quatro grupos genéticos: M (major), N (nonM/nonO), O (outlier) e P, cada um derivado de uma transmissão distinta do vírus SIV de chimpanzé para os humanos. O grupo M é responsável por 95% da pandemia da Aids e contém variantes genéticas classificadas em nove subtipos nomeados de A à D, F à H, J e

K, além de sub-subtipos resultantes da evolução de formas recombinantes (HEMELAAR et al., 2011).

As formas recombinantes únicas (URF, do inglês *unique recombinant forms*) que são capazes de circular em três ou mais indivíduos epidemiologicamente desvinculados são chamadas de formas recombinantes circulantes (CRF, do inglês *circulating recombinant forms*) (XIAO et al., 2017). Atualmente, são encontradas 88 CRF no banco de dados de sequências de HIV do Laboratório Nacional de Los Alamos. No Brasil, o subtipo B é predominante na maioria das regiões seguido pelos subtipos F, C e as formas recombinantes entre eles. Essa diversidade tem impacto sobre a carga viral, podendo interferir na resposta à TARV e no surgimento de resistência às drogas utilizadas. Por isso é importante avaliar a distribuição e a prevalência mundial de cada subtipo (REIS et al., 2017).

Em 2016, foram relatados 1,8 milhões de novos casos de infecção pelo HIV-1 e 1 milhão de mortes por doenças associadas à Aids no mundo. Atualmente, dos 36,7 milhões de pessoas vivendo com o HIV-1, apenas 20,9 milhões têm acesso à terapia antirretroviral. Em alguns países, o governo não fornece os medicamentos e a assistência necessária aos pacientes, o que contribui para manter o estigma em muitos locais (UNAIDS, 2017).

No Brasil, a infecção pelo HIV e a Aids pertencem à Lista Nacional de Notificação Compulsória (Portaria nº 204, de 17 de fevereiro de 2016) e os casos são registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Em 2016, foram notificados 38.090 novos casos representando uma incidência de 24 casos em cada 100 mil habitantes e a faixa etária mais acometida foi de 20 a 39 anos. Dentre os casos registrados de 2007 a 2017, a maioria foi em homens (67,9%) por transmissão sexual heterossexual. Estima-se que 830 mil pessoas estejam infectadas pelo HIV-1 e que 60% deste grupo esteja recebendo a terapia fornecida gratuitamente pelo governo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

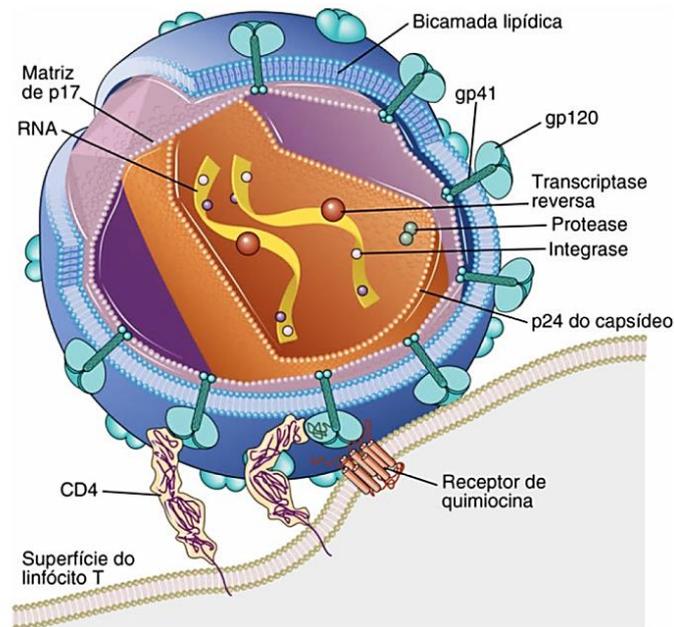
Segundo a UNAIDS (2017), o acesso à terapia promoveu uma redução de 48% das mortes de 2005 a 2016 em escala mundial. Entretanto, na América Latina, essa redução foi de apenas de 16% nos últimos dez anos. Em dezembro de 2014, representações governamentais de diferentes países assinaram a Declaração de

Paris, lançada pela UNAIDS, que prevê a implementação da meta 90-90-90 até 2020. Espera-se que nos locais de implementação desta meta, 90% das pessoas infectadas pelo HIV sejam diagnosticadas, destas, 90% estejam recebendo a terapia antirretroviral e que, destas, 90% tenham carga viral plasmática indetectável. Além disto, espera-se que o número de infecções anuais seja inferior a 500 mil até 2020 e inferior a 200 mil até 2030 (UNAIDS, 2017).

1.2.2 Estrutura e Ciclo replicativo

O HIV-1 pertence à família Retroviridae, subfamília Orthoretrovirinae e ao gênero *Lentivirinae*. A partícula viral madura apresenta aproximadamente 100 nm de diâmetro com uma estrutura composta, mais externamente, por um envelope fosfolipídico derivado da membrana plasmática da célula hospedeira aonde são encontradas as glicoproteínas (gp) virais gp120 ancoradas à bicamada lipídica pela glicoproteína transmembrana do HIV chamada gp41. Subjacente ao envelope, são encontradas as proteínas de matriz chamadas p17, que envolvem o capsídeo cônico composto pelas proteínas p24. Este capsídeo abriga as enzimas virais integrase, transcriptase reversa e protease associadas ao genoma, composto por duas moléculas idênticas de ácido ribonucleico (RNA) em fita simples e com polaridade positiva associadas de forma não covalente (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2015; SEITZ, 2016).

Figura 1 – Estrutura do vírus HIV



São indicadas as glicoproteínas gp120 e gp41 do envelope lipídico, a proteína p17 da matriz, as enzimas transcriptase reversa, protease e integrase no interior do capsídeo constituído pela p24 e as fitas de RNA viral. Também estão indicados o receptor de quimiocina e a molécula CD4, expressos na superfície dos linfócitos T, que permitem a fusão com o envelope viral e a entrada do vírus na célula. (Fonte: ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2015)

O RNA genômico do HIV-1 tem aproximadamente 9,7 kb de comprimento e compreende cerca de nove fases abertas de leitura, flanqueadas por repetições terminais longas (LTR, do inglês *long terminal repeats*) divididas em três regiões denominadas U5, R e U3, que regulam a expressão dos genes virais, a integração ao genoma do hospedeiro e a replicação viral. Em comum com outros retrovírus, o HIV-1 possui três genes principais: *gag*, *pol* e *env*, que são traduzidos como poliproteínas e clivados, posteriormente, em proteínas funcionais. O gene *gag* codifica proteínas estruturais do núcleo (p7, p9 e p24) e da matriz (p17), o *pol* codifica as enzimas protease (p12), transcriptase reversa (p51), RNase H (p15) e integrase (p32) enquanto o *env* codifica as duas glicoproteínas do envelope viral, a gp120 e gp41 (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015; SEITZ, 2016). Adicionalmente, são encontrados dois genes reguladores, *tat* e *rev*, e quatro genes acessórios *vif*, *nef*, *vpr* e *vpu*. As proteínas transativadoras Tat (do inglês *trans-activator of transcription*) e Rev (do inglês *regulator of RNA splicing*) são necessárias para o

início da replicação do HIV, enquanto as proteínas Nef (do inglês *Negative regulatory factor*), Vif (do inglês *Viral infectivity factor*), Vpr (do inglês *Viral protein R*) e Vpu (do inglês *Viral protein U*) têm um impacto na replicação viral e na patogênese (LEVY, 2007). O HIV-2 codifica para Vpx (do inglês *Viral protein X*) invés de Vpu, o que é parcialmente responsável pela redução da patogenicidade deste vírus (VICENZI; POLI, 2013).

A infecção pelo HIV tem início quando a glicoproteína do envelope viral gp120 liga-se ao receptor CD4 da célula hospedeira, o que induz uma ativação alostérica da gp120 permitindo a exposição do sítio de ligação para os receptores de quimiocina CCR5 ou CXCR4. A ligação da gp120 ao receptor induz uma segunda modificação conformacional na gp41, fazendo com que esta se dissocie da gp120 e exponha uma região hidrofóbica chamada de peptídeo de fusão. Essa região hidrofóbica N-terminal é inserida na membrana da célula hospedeira permitindo a fusão do envelope viral à bicamada de fosfolípídeo da célula (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2015; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015; SEITZ, 2016).

A fusão promove a liberação do capsídeo viral para o citoplasma, aonde este se desintegra liberando o genoma viral e proteínas. No citoplasma, ocorre a ativação das enzimas virais e início da replicação viral, mediada pela transcriptase reversa que sintetiza uma fita de DNA complementar (DNAc) à fita simples do RNA viral. A fita de RNA viral é em seguida degradada pela enzima RNase H e o DNAc é convertido em DNA fita dupla pela atividade polimerase da enzima transcriptase reversa (SOUSA, 1993).

O DNA viral de fita dupla liga-se ao complexo de pré-integração (PIC, do inglês *pre-integration complex*) que contém as proteínas virais integrase, Vpr e p17 da matriz. O PIC é importado para o núcleo celular através da identificação das regiões sinais de localização nuclear da proteína viral Vpr pelas importinas α e β da célula hospedeira (GRANDGENETT et al., 2015; BIN HAMID et al., 2016). Uma vez no núcleo, o DNA viral de fita dupla é integrado ao genoma humano pela integrase e permanece sob a forma de pró-vírus. O DNA viral integrado pode se replicar como o genoma da célula hospedeira durante a divisão celular, servindo de molde para a transcrição do RNA viral. Entretanto, ele pode permanecer inativo por meses ou

anos, com pouca ou nenhuma produção de proteínas virais, caracterizando a infecção latente (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2015).

Células em repouso podem ser infectadas pelo HIV, mas a transcrição do pró-vírus é dependente da ligação de fatores de transcrição das células hospedeiras às regiões promotoras das LTR. Estas regiões contêm sequências de sinal de poliadenilação, a sequência promotora “TATA Box” onde os fatores de transcrição NF- κ B, SP-1 (do inglês *specificity protein 1*) e NFAT (do inglês *nuclear factor of activated T-cells*) podem se ligar e dar início a transcrição do RNA viral pela RNA polimerase II celular (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010; MOUSSEAU; MADIOUNI; VALENTE, 2015; SEITZ, 2016).

Os transcritos virais são processados para produzir os RNA mensageiros (mRNA) que serão traduzidos em proteínas do HIV-1. As proteínas Gag e Gag-Pol são derivadas de um mRNA maior que não é processado. Vif, Vpr, Vpu e Env são traduzidas a partir de diferentes transcritos de um único mRNA processado e Tat, Rev e Nef são traduzidas a partir de diferentes transcritos de um mesmo mRNA. Os mRNA que codificam as diferentes proteínas virais são derivados de um único transcrito completo do genoma que sofreu eventos de *splicing* diferencial (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015).

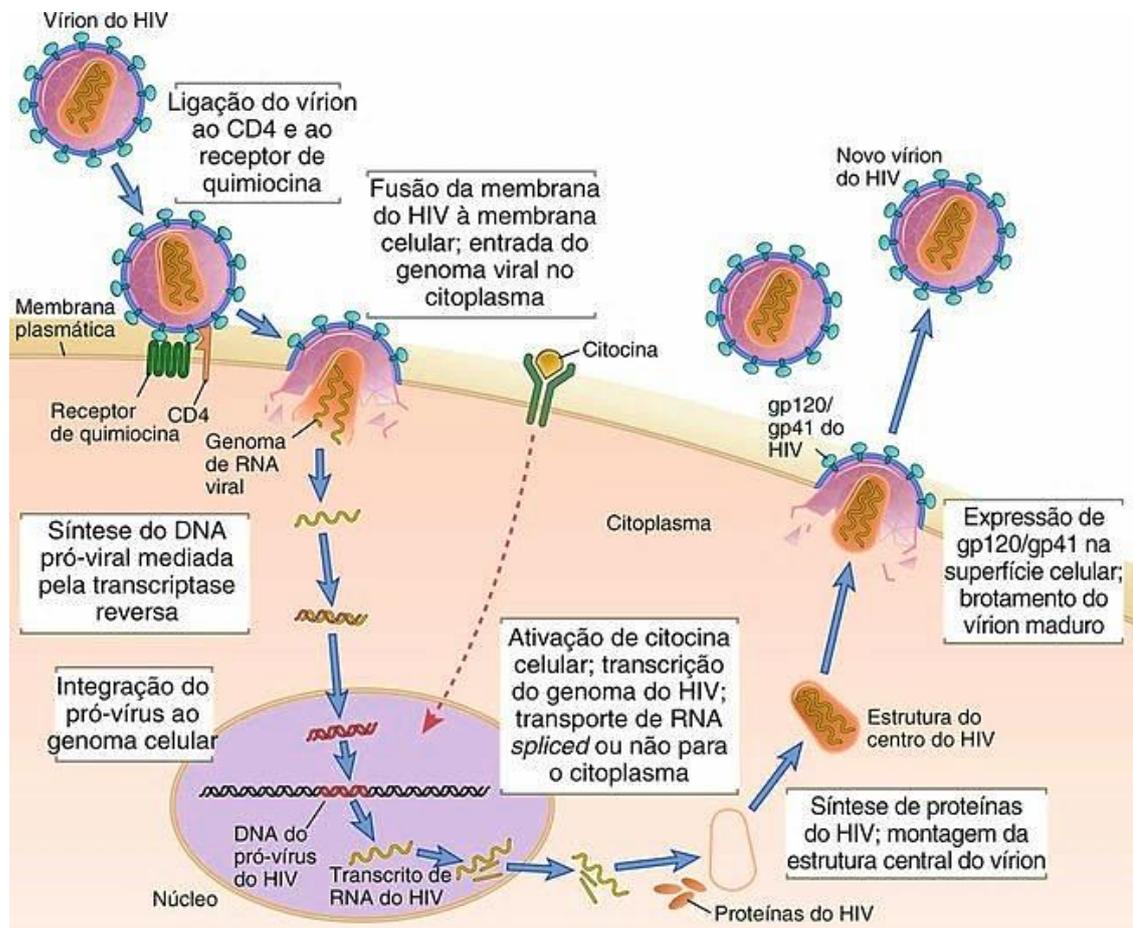
As primeiras proteínas a serem traduzidas são Tat e Rev, que atuam aumentando a replicação viral. Tat liga-se à região de ativação transcricional do RNA viral formando um complexo com a ciclina T1 e a ciclina dependente de quinase 9 (CDK9) que fosforila a RNA polimerase II e estimula a elongação do RNA. Além disso, Tat ativa as histonas acetiltransferases (HAT) que catalisam modificações na cromatina auxiliando a ação dos fatores de transcrição sobre o material genético (AGOSTO; GAGNE; HENDERSON, 2015; JIN et al., 2016). A expressão do complexo ciclina T1-CDK9 encontra-se aumentada em células T ativadas quando comparado às células quiescentes e, em combinação com os fatores de transcrição NF- κ B e NFAT, amplifica a replicação viral. Portanto, células não ativadas e infectadas pelo HIV representam um excelente reservatório do vírus (LEVY, 2011; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

Nas células eucariotas, há um controle de exportação de transcritos de mRNA que impede a exportação daqueles que não foram ou foram parcialmente processados. Nos retrovírus, parte das proteínas virais é traduzida no citoplasma a partir de mRNA não processado ou processado em sítio único. Diante disso, a proteína Rev torna-se responsável pela exportação dos transcritos longos não processados para fora do núcleo para sua tradução, garantindo que as proteínas virais sejam expressas corretamente. Ela se liga aos mRNA não processados pelo elemento de resposta à Rev (RRE, do inglês *Rev element of response*) e à proteína de transporte Crm1 do hospedeiro, ativando uma via do próprio hospedeiro para exportar os mRNA através de poros para o citoplasma da célula (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010; JAYARAMAN et al., 2015; SEITZ, 2016).

A proteína Nef age regulando negativamente a expressão de moléculas de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) I na superfície das células infectadas inibindo o reconhecimento, por parte das células T citotóxicas (CTL, do inglês *cytotoxic T cell*), de peptídeos do HIV, reduzindo a resposta do hospedeiro ao vírus.

Após a transcrição dos genes virais e síntese de suas respectivas proteínas no citoplasma, tem início a montagem das partículas infecciosas com a agregação das proteínas Gag e Gag-Pol. A proteína Env é clivada por proteases celulares no retículo endoplasmático dando origem às glicoproteínas gp120 e gp41 que são direcionadas à membrana plasmática da célula hospedeira. A poliproteína Pol é clivada sequencialmente nas enzimas transcriptase reversa, protease, ribonuclease e integrase enquanto Gag é clivada em p24, p17, p15 e polipeptídeos, que são proteínas estruturais do capsídeo. Os transcritos completos de RNA do genoma pró-viral são encapsidados e migram em direção à membrana, onde incorporam a bicamada lipídica da membrana da célula hospedeira e as glicoproteínas gp120 e gp41 à composição de seu envelope no processo de brotamento. A partícula viral que é liberada ainda se encontra imatura e requer um processo de maturação proteolítica fora da célula hospedeira para se tornar infectante (KONVALINKA; KRÄUSSLICH; MÜLLER, 2015; MATTEI et al., 2014). A primeira progênie viral é liberada das células infectadas aproximadamente 24 horas após a infecção (SEITZ, 2016).

Figura 2 – Ciclo Replicativo do HIV



A infecção tem início com a ligação da gp120 do vírus ao receptor CD4 da célula hospedeira e uma ligação posterior desta mesma glicoproteína aos receptores de quimiocina CCR5 ou CXCR4. A gp41 é responsável pela fusão da membrana do HIV-1 com a membrana celular, que culmina na entrada do vírus na célula e na liberação do genoma de RNA viral no citoplasma. O DNA pró-viral é sintetizado pela enzima transcriptase reversa e transportado para o núcleo, onde se integra ao genoma celular. A ativação da célula por citocinas leva à transcrição do genoma do HIV-1 e transporte dos mRNA, processados ou não, para o citoplasma. No citoplasma, ocorre a síntese das proteínas virais e montagem do capsídeo, que migra para a membrana e incorpora a bicamada lipídica da membrana da célula hospedeira e as glicoproteínas gp120 e gp41 à composição do envelope viral no processo de brotamento. (Fonte: ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2015)

1.3 DESENVOLVIMENTO DA INFECÇÃO

De modo geral, a infecção pelo HIV-1 advém do contato com fluidos orgânicos, como sangue e sêmen, de uma pessoa infectada. As principais vias pelas quais a transmissão ocorre são: sexual, compartilhamento ou acidente com seringas e objetos

perfuro-cortantes, transmissão vertical e transfusão sanguínea (MINISTÉRIO DA SAUDE, 2017).

1.3.1 Infecção Primária

A maioria das infecções pelo HIV-1 ocorre pela exposição sexual genital ou pela mucosa retal. Nesses casos, o vírus penetra o epitélio da mucosa por transcitose ou pela interação direta com células dendríticas intraepiteliais através da ligação da gp120 do envelope viral ao receptor DC-SIGN da DC (McMICHAEL et al., 2010). Este receptor promove a internalização do vírus, que é transportado aos tecidos linfoides e trans-apresentado pelas DC aos linfócitos T CD4⁺ por contato direto (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010; ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2015).

Na dependência do receptor de quimiocina usado, associado à molécula CD4, as cepas do HIV-1 foram inicialmente classificadas como macrófagos (M)-trópicas ou células T (T)-trópicas. As cepas M-trópicas usam o CCR5 como co-receptor e infectam majoritariamente macrófagos, DC e células T de memória ativada enquanto cepas T-trópicas usam o CXCR4 e infectam linhagens de células T em repouso (GORRY; ANCUA, 2011). Existem cepas dual-trópicas que são capazes de se ligar a ambos receptores e infectar tanto linfócitos quanto macrófagos. O CCR5 tem como ligante endógeno as β -quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES e o CXCR4 tem o SDF-1 (COCCHI et al., 1995). Apesar dessa correlação entre a expressão de receptores e o tropismo viral, já foi observado, em muitos indivíduos infectados pelo HIV-1, que há uma alteração da produção viral que utiliza o CCR5, no início da doença, para o vírus que se liga à CXCR4 tardiamente (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2015). E, embora, estes receptores sejam os mais comuns, outros receptores de quimiocinas também podem se ligar à gp120 do envelope viral (TURVILLE et al., 2002).

Alguns dias após a infecção é possível detectar a intensa replicação viral nos linfonodos que provoca uma elevada viremia, sendo esta fase chamada de síndrome aguda do HIV, na qual se observa uma queda acentuada do número de linfócitos T CD4⁺ circulantes. Essa viremia primária garante disseminação do HIV pelo

organismo, fazendo com que novos linfócitos T auxiliares, macrófagos e DC em vários tecidos linfoides periféricos sejam infectados. Esta fase, que tem início de duas a seis semanas após o contato com o vírus, geralmente, está associada à ativação dos linfócitos T CD8⁺, responsáveis por reconhecer e matar as células infectadas que expressam peptídeos do HIV acoplados aos HLA (do inglês *human leukocyte antigens*) de classe I (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2015). Essa fase também é acompanhada pela soroconversão, isto é, produção de níveis detectáveis de anticorpos anti-HIV. Os sinais e sintomas apresentados durante este período são inespecíficos, em geral oligossintomáticos e relacionados a diferentes tipos de infecções virais, tais como febre, linfadenopatia e dor de garganta.

Entre três e quatro meses a viremia é parcialmente controlada pela resposta imune celular e humoral direcionada aos antígenos virais, os sintomas da síndrome aguda desaparecem e a contagem de linfócitos T CD4⁺ aumenta, mas, normalmente, mantém-se abaixo dos valores da fase pré-infecção.

1.3.2 Latência Clínica

A duração da latência clínica é bastante variada podendo chegar a mais de 10 anos. Nesta fase há um equilíbrio entre a persistente replicação viral, que ocorre nos órgãos linfoides, e a resposta imune do hospedeiro, pois os linfócitos T CD4⁺ continuam a ser produzidos quase na mesma extensão com que são destruídos. A viremia, que se mantém detectável durante essa fase, associada à contagem de células T CD4⁺, é o melhor indicador para a progressão da doença.

As manifestações clínicas são raras ou ausentes e o sistema imune do paciente conserva a capacidade de combater a maioria das infecções por microrganismos oportunistas. Apesar disto, a perda numérica e funcional dos linfócitos T CD4⁺ nos tecidos linfoides avança ao longo da latência clínica até níveis críticos, em geral inferiores a 200 células/mm³, tornando o indivíduo altamente suscetível a infecções oportunistas e malignidades. Portanto, o diagnóstico precoce seguido do início da terapia antirretroviral têm sido eficazes na manutenção da carga viral indetectável e melhoria da qualidade de vida evitando que indivíduo chegue à

terceira fase (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

1.3.3 Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

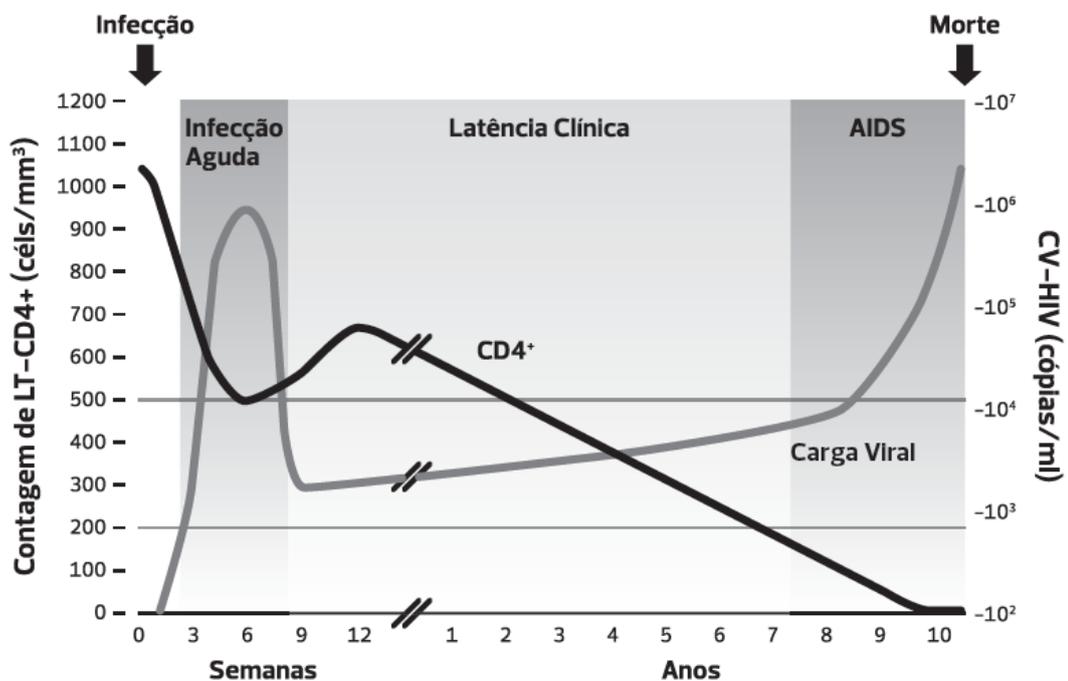
A maioria dos indivíduos infectados pelo HIV e não tratados evolui para a Aids cerca de 10 anos após a primo-infecção, quando a destruição dos linfócitos T CD4⁺ é superior à sua reposição. Nesse estágio, a contagem destas células é inferior a 200/mm³ na grande maioria dos pacientes, o que os torna suscetível a infecções oportunistas e neoplasias, visto que elas são essenciais para respostas imunológicas de origem celular e humoral. O maior impacto envolve a perda de células Th1 e Th17 envolvidas na proteção contra todos os patógenos, exceto os helmintos (SUN et al., 2015).

As células Th1, ao liberarem as citocinas interleucina (IL)-2 e interferon (IFN)- γ , coordenam uma frente de combate contra bactérias intracelulares e vírus por ativar fagócitos e células T CD8⁺ (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010). Em contraste, a resposta imune contra fungos e, mais particularmente, bactérias extracelulares, depende da produção de citocinas secretadas pelas células Th17 clássicas, as IL-17A (IL-17), IL-21 e IL-22 (SUN et al., 2015; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Adicionalmente, a perda do equilíbrio das respostas imunes em nível de mucosa pela perda funcional das células Th17 e dos linfócitos T reguladores (Treg), capazes de produzir citocinas anti-inflamatórias IL-10 e o TGF- β (do inglês *transforming growth factor beta*), compromete os eventos locais de proteção contra invasão microbiana, tal como a produção local de IgA (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Diante do exposto, com o início da Aids, o paciente perde a capacidade de controlar os patógenos. Entre as doenças infecciosas mais recorrentes destacam-se: tuberculose cavitária/disseminada, pneumocistose, neurotoxoplasmose, candidíase disseminada, neurocriptococose e citomegalovirose disseminada. Pela perda das células Th1, a frente de controle ao desenvolvimento de neoplasias executada pelas células T citotóxicas também é comprometida (HADRUP; DONIA; STRATEN, 2013).

As neoplasias mais comuns nesses pacientes são o Sarcoma de Kaposi, Linfoma não Hodgkin e câncer de colo uterino. Além dessas intercorrências devido à severa imunossupressão, paradoxalmente um processo inflamatório prolongado é observado ao longo da infecção pelo HIV-1 (LU et al., 2015). Essa metainflamação, mais característica em idosos acima de 70 anos, causa vários danos diretos aos órgãos, precipitando casos de miocardiopatia, nefropatia e neuropatias em pacientes jovens (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Em resumo, os indivíduos infectados pelo HIV-1 que chegam a esta fase, frequentemente, vão a óbito pela incapacidade imunológica de conter essas complicações clínicas oportunistas.

Figura 3 – Curso natural da Infecção pelo HIV-1



Observa-se uma fase aguda que ocorre 2-6 semanas após a infecção com aumento da carga viral plasmática e redução da contagem de linfócitos T CD4⁺, devido à intensa replicação do vírus no interior destas células e ação das células T citotóxicas. Em seguida, é iniciada a fase de latência clínica na qual o sistema imune é capaz de controlar, em diferentes níveis, a taxa de replicação do vírus, mantendo certo grau de imunocompetência. Após esta fase, que pode durar até dez anos, a depleção numérica e funcional dos linfócitos T CD4⁺ atinge níveis críticos e tem como consequência uma imunodeficiência severa, chamada Aids. (Adaptado de HIV Book 2015/2016)

1.4 HIV E RESPOSTA IMUNE: PROTEÇÃO E PATOGÊNESE

1.4.1 Eventos imunes envolvidos no controle da replicação viral

A infecção aguda pelo HIV-1 cursa com sintomas clínicos e indução de respostas imunes celulares e humorais semelhantes a outros vírus. Na dinâmica da resposta imune contra vírus, tanto as células dendríticas plasmocitoides (pDC) quanto mieloides (mDC) são as primeiras células do sistema imune inato capazes de ativar células T naíves/virgens (O'BRIEN; MANCHES; BHARDWAJ, 2013). As pDC expressam os receptores do tipo Toll (TLR) 7 e 9 que se ligam, respectivamente, ao RNA de fita simples e a motivos CpG repetidos e não metilados no DNA levando à produção de IFN do tipo 1, principalmente, IFN- α . Esta citocina interage com seus receptores expressos em diferentes células imunes e também na célula-alvo ativando a transcrição de genes, designados como genes estimulados pelo IFN (ISG, do inglês *interferon stimulating genes*), conferindo resistência à replicação viral nas células hospedeiras. No sistema imune, essa citocina ativa a imunidade inata e adaptativa aumentando a função citotóxica das células NK e das células T CD8⁺, modulando positivamente a expressão das moléculas de MHC de classe I (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; DECALF et al., 2017).

A participação das células NK na resposta protetora contra o HIV-1 envolve não apenas a eliminação rápida das células infectadas, como também a amplificação da resposta imune adquirida por aumentar a produção de IFN- α e IL-12 pelas pDC e mDC, respectivamente, o que aumenta a diferenciação dos linfócitos T CD8⁺ em células T citotóxicas e das células T CD4⁺ no fenótipo Th1 (O'BRIEN; MANCHES; BHARDWAJ, 2013).

Através do reconhecimento do RNA genômico do HIV-1 por receptores de padrão, tal como o TLR 3, as DC passam por alterações biológicas que as permitem não apenas migrar para áreas ricas em células T, como também aumentar a expressão de moléculas do MHC de classe I e II e co-estimuladoras B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), necessárias para a ativação linfocitária (RODRIGUEZ-PLATA, 2012).

Durante a sinapse entre as DC B7.1⁺B7.2⁺, a ativação dos linfócitos T CD8⁺ CD28⁺ ocorre a partir da ligação dos receptores de células T (TCR) ao peptídeo

antigênico do HIV ligado ao MHC de classe I e da interação do CD28 com membros da família B7 (STINCHCOMBE; GRIFFITHS, 2003; MANCHES et al., 2014). Entretanto, a completa ativação e aquisição de função efetora citotóxica e memória no compartimento das células T CD8⁺ HIV-específicas, depende do auxílio dos linfócitos T CD4⁺ fenótipo Th1, subtipo celular capaz de produzir IL-2 e IFN- γ (HOFFMANN et al., 2016, JONES; WALKER, 2016). Essa resposta inicial parece ser determinante para o curso da doença, pois reflete a eficácia do reconhecimento do antígeno viral pelas células do sistema imune e a capacidade de controlar a infecção após o primeiro pico de viremia.

Dada a importância da apresentação de antígenos pelas DC para recrutar linfócitos T específicos, alguns estudos têm demonstrado uma relação direta entre a expressão de diferentes alelos de HLA e a progressão da doença. De acordo com estudo de Kaslow e colaboradores (2001) em um grupo reduzido de pacientes, a presença dos alelos HLA-B27 e HLA-B57 parece favorecer uma progressão mais lenta da doença, ou não progressão. Esses indivíduos são conhecidos como não progressores (LTNP, do inglês *long-term nonprogressor*). Os LTNP conseguem controlar espontaneamente a carga viral plasmática (CVP) e manter a contagem de células T CD4⁺ superior a 700 células/mm³. A explicação para tal associação de proteção deve estar ligada à capacidade desses alelos conseguir apresentar diferentes epítopos derivados da mutação de moléculas antigênicas selvagens do HIV-1. Com isso, mais variantes virais podem ser reconhecidas e apresentadas às células efetoras do sistema imune e melhor o prognóstico do paciente.

Além das variações na expressão de alelos HLA, a qualidade da resposta ao HIV-1 parece depender de quais subfamílias de TCR são usadas. No estudo de Flerin e colaboradores (2017) foi mostrado que a frequência dos receptores de células T CD8⁺ TCRV β 18⁺ e V β 6.5⁺ é elevada nos LNTP. Em cultura, essas células respondem rapidamente aos antígenos do HIV-1 proliferando e executando não apenas sua clássica função citotóxica, como também liberando citocinas não-líticas e quimiocinas de forma mais estável.

Nas células infectadas, a identificação dos peptídeos do HIV-1 acoplados aos MHC de classe I pelos linfócitos T citotóxicos leva à morte apoptótica das células-alvo através da ação coordenada por perforinas e granzimas. Além disso, em sua

membrana, as CTL ativadas expressam o ligante de Fas (Fas-L), molécula capaz de induzir a ativação das caspases e, conseqüentemente, morte por apoptose das células que expressam Fas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; DEMERS et al., 2016). Adicionalmente, em resposta a peptídeos antígeno-específico, as CTL HIV-1 específicas também produzem IFN- γ , ativando macrófagos que podem fagocitar e destruir células infectadas (JONES; WALKER, 2016). Além da indução da apoptose, as caspases ativadas por granzimas e Fas-L clivam substratos e ativam nucleases que não distinguem entre as proteínas virais e do hospedeiro. Desta forma, elas destroem o DNA viral e do hospedeiro, eliminando assim o conteúdo genético do HIV-1 (JONES; WALKER, 2016).

Finalmente, em 2002, estudo por Chang e colaboradores revelou a capacidade das células T CD8⁺ dos LTNP de produzir uma proteína anti-viral que foi chamada de fator antiviral citostático (CAF) 1. Esta proteína, ao se ligar ao seu receptor na célula infectada, CAF-L, induz a expressão das moléculas de sinalização STAT-1 que, por sua vez, parecem induzir a expressão do gene IRF-1 inibindo a replicação viral mediada pelas LTR (CHANG et al; 2002). De forma interessante, as células T CD8⁺CAF⁺ não são citotóxicas, o que não as implica na depleção de células T CD4⁺ (SACHDEVA et al.,2008).

Quanto à resposta humoral ao HIV, recentes estudos indicam a presença de IgG anti-HIV-1 com capacidade de neutralizar diferentes isolados do vírus nos LTNP (MOIR; FAUCI, 2017). A produção desses anticorpos, no entanto, parece ser dependente da manutenção funcional das células T auxiliares foliculares, o único subtipo de células T CD4⁺ capaz de induzir e sustentar as reações do centro germinativo dos órgãos linfoides secundários, locais de intensa proliferação, maturação e seleção das células B que produzem anticorpos de alta afinidade contra antígenos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; MOIR; FAUCI, 2017). As IgG anti-gp120 nos LTNP devem proteger o indivíduo não apenas por neutralizar as partículas virais, como também por acelerar a morte das células-alvo através da citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) mediada pelas células NK (VON BREDOW et al., 2016). Nesse contexto, as células NK, através do reconhecimento da porção Fc desses anticorpos ligados a gp120, executa a morte

das células infectadas pela liberação coordenada de perforina e granzimas (LJUNGGREN et al., 1988; SMALLS-MANTEY et al., 2012).

1.4.2 HIV, imunopatogênese e progressão para Aids

Os danos causados ao sistema imune são atribuídos a efeitos citopáticos diretos e indiretos do vírus, que explicam a morte massiva de linfócitos T CD4⁺. Durante a produção viral, o processamento proteico no retículo endoplasmático das células hospedeiras é afetado, podendo bloquear a expressão do CD4 na superfície celular (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). A expressão da gp41 na membrana plasmática dos linfócitos T CD4⁺ e o brotamento das partículas virais podem aumentar a permeabilidade da membrana levando a um influxo de quantidades letais de cálcio, que induz apoptose ou lise osmótica da célula pela entrada de água. Além disso, pode ocorrer fusão das membranas plasmáticas de células T infectadas pelo HIV-1 com células não infectadas, pela interação gp120-CD4, que pode levar à formação de células gigantes multinucleadas, ou sincícios, e ser letal (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

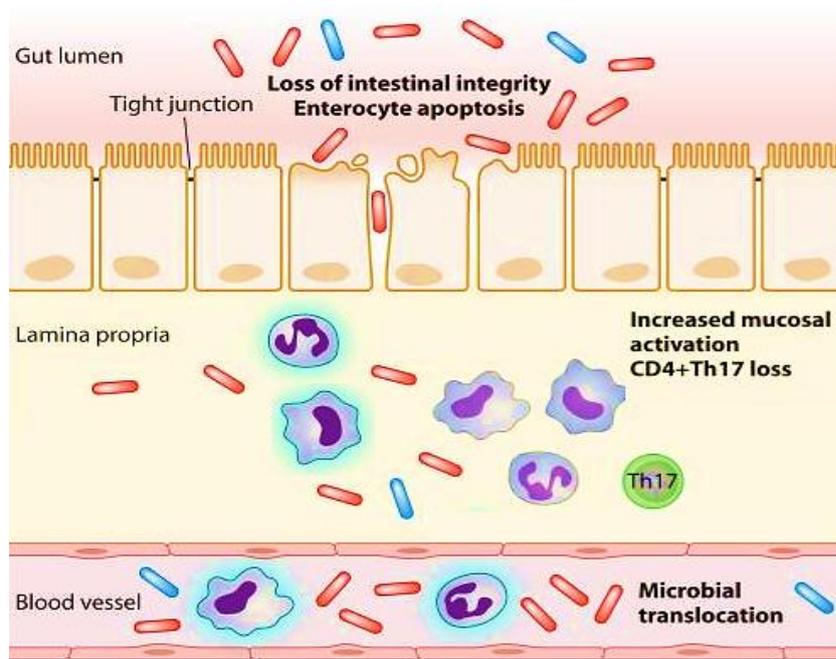
As células hospedeiras têm fatores de restrição que tentam inibir a infecção e a replicação viral. Entre eles, destacam-se: a teterina, que é induzida por IFN e bloqueia o brotamento do vírus, o APOBEC3 (do inglês *Apolipoprotein B mRNA Editing Complex 3*), que pertence à família das citidina desaminases e age bloqueando a replicação do HIV-1 pela introdução de mutações de citidina para uracila no DNAc durante a transcrição reversa, e o TRIM5 α , que interage com as proteínas do capsídeo viral causando o desnudamento prematuro do vírus e degradação do complexo da transcriptase reversa (RAN; AO; YAO, 2016).

O HIV-1, por sua vez, desenvolveu mecanismos envolvendo as proteínas Vpu e Vif que conseguem driblar esses fatores. A Vpu interage com o domínio transmembrana da teterina antagonizando seu efeito de restrição e diminui a expressão de CD4 na superfície das células pelo direcionamento da molécula de CD4, recém-sintetizada no citoplasma, para a degradação proteossomal mediada pela ubiquitina (MAK; SAUNDERS, 2006; ANSARI; SILVESTRI, 2014). A proteína Vif

liga-se ao APOBEC3 expresso pela célula hospedeira e desencadeia a sua poliubiquitinação e degradação, impedindo, portanto, a ação desta enzima nas partículas virais em formação (PEREZ-CABALLERO et al., 2009; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010; ABBAS; ASTER; KUMAR, 2013; TABAH; TARDIF; MANSKY, 2014; RICHARDS et al., 2017).

O marcador clássico de evolução para Aids é a redução progressiva da contagem e da função dos linfócitos T CD4⁺ acompanhada de uma ativação imune crônica (metainflamação) e acúmulo de linfócitos T CD8⁺ anormais. Mesmo nos indivíduos com Aids que conseguem controlar a carga viral plasmática seguindo tratamento com a TARV, o perfil inflamatório persiste. Esse fenômeno tem sido atribuído, principalmente, à persistente translocação microbiana intestinal pela perda da barreira imune em nível de mucosa, o que é ilustrado na figura 4 (MARCHETTI; TINCATI; SILVESTRI, 2013; LU et al., 2015).

Figura 4 – Translocação microbiana em pacientes com Aids



A infecção pelo HIV-1 é responsável por ruptura da barreira epitelial intestinal com perda das junções oclusivas, apoptose de enterócitos, ativação imune local e depleção de células Th17. Com isso, bactérias patogênicas e produtos microbianos presentes no lúmen intestinal atravessam a lâmina própria e atingem a circulação sistêmica provocando uma inflamação persistente. (Adaptado de MARCHETTI; TINCATI; SILVESTRI, 2013)

Diante deste perfil, os linfócitos T CD8⁺ específicos para o HIV-1 evoluem para um fenótipo anormal, característico de imunosenescência, com reduzida capacidade de reconhecer antígenos associados ao HLA, ausência de perforina em seus grânulos e elevada expressão dos receptores inibidores de morte (KIR, do inglês *killer immunoglobulin-like receptors*). Muitos membros da família KIR são classicamente expressos nas células NK e têm como função evitar a morte das células-alvo que expressam elevados níveis de MHC de classe I por inibir a liberação de granzimas e perforinas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Além disso, esses linfócitos se tornam incapazes de expressar o CCR7 e perdem o acesso aos gânglios linfáticos, que são os principais locais de replicação viral (LIEBERMAN et al., 2001; McMAHON; RAULET, 2001; DEMERS et al., 2016). Nesse contexto, a função e o perfil de citocinas e quimiocinas produzidas por macrófagos infectados pelo HIV-1 também são alterados. De acordo com Mangino e colaboradores (2011), a proteína Nef do vírus induz a produção de IL-1 β , IL-6, fator de necrose tumoral (TNF) α e IFN- β , que favorecem a ativação dos linfócitos T CD4⁺ no local da infecção, enquanto reduz a expressão do MHC de classe I, impedindo a morte das células-alvo pelas CTL (SCHWARTZ et al., 1996). Os níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias durante a doença estão associados ao aumento de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ não específicos para o HIV-1 e com marcadores de anergia (PD-1, do inglês *programmed death protein 1*) e apoptose (Fas/CD95). Essa condição é reflexo de uma exaustão imune causada pelo estado de ativação crônica que acelera os processos de imunosenescência no paciente (EGGENA et al., 2005, BANGS; McMICHAEL; XU, 2006; ZHANG et al., 2007).

Infelizmente, o vírus é capaz de permanecer latente em células T CD4⁺ quiescentes, monócitos e macrófagos por muitos anos, uma vez que a TARV disponível atualmente não consegue acessar os chamados santuários virais anatômicos. O silenciamento do vírus depende de fatores como o sítio de integração ao genoma, a disponibilidade de fatores de transcrição, a organização da cromatina do promotor, a proteína Tat e fatores celulares associados a ela, como micro-RNA (miRNA) e RNA de interferência (RNAi). Após a ligação dos fatores de transcrição NF- κ B e SP-1 ao promotor na LTR do HIV-1, a proteína Tat é ativada e interage com fatores celulares como CDK9, ciclina T1 e HAT permitindo a alongação da

transcrição. A baixa disponibilidade desses fatores celulares pode determinar o estado de latência viral nas células-alvo em repouso (TRIPATHY; ABBAS; HERBEIN, 2011).

1.5 TERAPIA ANTIRRETROVIRAL

A compreensão do ciclo viral e dos mecanismos envolvidos no estabelecimento da infecção, na década de 80, foi fundamental para a descoberta das drogas que seriam usadas como tratamento. Essa descoberta mudou o cenário da infecção pelo HIV-1, que tinha progressão rápida e fatal, para uma condição crônica passível de controle por medicamentos.

O primeiro antirretroviral aprovado pelo FDA foi a zidovudina (AZT), no ano de 1987, que pertence à classe dos inibidores da transcriptase reversa e à subclasse dos análogos de nucleosídeos. Outros fármacos desta classe foram aprovados para uso monoterápico, entretanto, foi observado que esta estratégia favorecia uma seleção mais rápida de vírus resistentes e que, apesar do controle inicial da infecção, esses fármacos apresentavam toxicidade elevada e diversos efeitos colaterais que reduziam a adesão do paciente (PALMISANO; VELLA, 2011).

Diante disso, foram aprovados antirretrovirais com outros mecanismos de ação e teve início a terapia de alta eficiência, TARV. A supressão da carga viral pela TARV é sustentada por um tempo dez vezes maior do que a observada com uso da monoterapia. Atualmente, os fármacos utilizados no tratamento da infecção são classificados em quatro grupos de acordo com seu mecanismo de ação: inibidores da protease, inibidores da integrase, inibidores de fusão/entrada e inibidores da transcriptase reversa. Este último é subdividido inibidores nucleosídicos e não nucleosídicos, respectivamente, INTR e INNTR (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015).

Entre os INTR destacam-se a AZT, a lamivudina (3TC), o tenofovir (TDF), a didanosina (ddl), zalcitabina (ddc), estavudina (d4T) e o abacavir (ABC). Esses fármacos são fosforilados dentro da célula alvo e seus metabólitos ativos agem

como inibidores competitivos da transcriptase reversa do HIV, gerando uma cadeia de DNA alterada que impede a replicação viral (PAU; GEORGE, 2014).

Os INNTR, por sua vez, não precisam ser fosforilados e inibem a transcriptase reversa de modo não competitivo pela interação com sítios de ligação alostérica da enzima induzindo mudanças conformacionais que reduzem sua eficiência catalítica. Os fármacos desta classe são a nevirapina (NVP), a delavirdina (DLV) e o efavirenz (EFZ) (PAU; GEORGE, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Os inibidores da protease viral ligam-se a esta enzima bloqueando sua atividade proteolítica necessária ao processamento das novas partículas virais para que se tornem infecciosas. Entre os inibidores conhecidos estão saquinavir (SQV), ritonavir (RTV), indinavir (IDV), nelfinavir (NFV), amprenavir (APV), lopinavir (LPV), darunavir (DRV), atazanavir (ATV), fosamprenavir (FPV) e tipranavir (TPV) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Entre os inibidores da integrase, destacam-se o raltegravir (RAL) e o dolutegravir (DTG). Estes bloqueiam a enzima integrase e a impedem de catalisar a transferência do DNAc para o cromossomo da célula hospedeira. Com isto, o genoma viral não se incorpora ao genoma do hospedeiro e não há expressão nem replicação dos genes virais (PAU; GEORGE, 2014).

Na classe dos inibidores de entrada existem apenas dois fármacos disponíveis no Brasil, o maraviroc (MRV) e o enfuvirtida (T-20). O maraviroc é um antagonista de CCR5 que se liga de modo seletivo a este receptor na membrana celular e bloqueia sua interação com a gp120 do HIV, impedindo sua entrada na célula. A eficácia deste fármaco é restrita às cepas M-trópicas, pois ele é incapaz de bloquear a entrada das cepas que usam o CXCR4 como co-receptor. Desta forma, antes da prescrição do maraviroc, recomenda-se que seja feito um ensaio de tropismo da cepa viral circulante no paciente. O enfuvirtida é um inibidor de fusão que se liga a gp41 do envelope viral e impede que ocorram as alterações conformacionais necessárias à fusão com a membrana celular. Deste modo, ele impede a infecção de novas células. O enfuvirtida é um fármaco injetável com uso restrito aos portadores de vírus multirresistentes sem outras opções terapêuticas

(PAU; GEORGE, 2014; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

De acordo com a recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS), a primeira linha de tratamento deve incluir dois INTR e um antirretroviral de outra classe. No Brasil, a terapia inicial é composta pela associação dos INTR lamivudina e tenofovir com o inibidor da integrase dolutegravir. Os fármacos inibidores de protease e inibidores de entrada são preservados como segunda linha de tratamento, quando o paciente deixa de responder às demais abordagens terapêuticas.

A introdução da TARV reduziu substancialmente a morbidade e a mortalidade dos indivíduos infectados, e o acesso ao tratamento vem aumentando nos últimos anos. Ela é capaz de inibir a infecção de novas células suscetíveis, mas não impede a liberação de novas progênes virais de células nas quais o pró-vírus foi integrado e a latência foi estabelecida (KUMAR; ABBAS; HERBEIN, 2014). Os reservatórios virais latentes persistem por toda a vida, mesmo com a carga viral suprimida abaixo dos níveis de detecção (VAN DER SLUIS et al., 2013). Uma vez interrompida a terapia, o vírus pode voltar a replicar rapidamente aumentando a carga viral plasmática. Estima-se que esses reservatórios se reduzam ao longo de décadas de tratamento ininterrupto, o que também é um problema devido a um maior risco de efeitos colaterais, surgimento de mutações que conferem resistência e dificuldade em manter a adesão do paciente (WENDER; KEE; WARRINGTON, 2008). Ademais, quando iniciada em fases mais tardias da infecção, a reconstituição do sistema imune dos pacientes pela terapia também é limitada devido à resposta inflamatória patológica e à exaustão imune (WALKER et al., 2015).

Tabela 1 – Classes de antirretrovirais utilizados na terapia anti-HIV autorizados pelo Ministério da Saúde*

| INIBIDOR NUCLEOSÍDICO DA TRANSCRIPTASE REVERSA (INTR) | INIBIDOR NÃO NUCLEOSÍDICO DA TRANSCRIPTASE REVERSA (INNTR) | INIBIDOR DE INTEGRASE | INIBIDOR DA PROTEASE | INIBIDOR DE FUSÃO | INIBIDOR DE CCR5 |
|--|--|-----------------------------|--|-------------------|------------------|
| Zidovudina Didanosina Zalcitabina Estavudina Lamivudina Tenofovir Abacavir | Nevirapina Efavirenz | Raltegravir Dolutegravir | Saquinavir Ritonavir Indinavir Nelfinavir Amprenavir Lopinavir Atazanavir Darunavir | Efuvertida | Maraviroc |

* Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos (Ministério da Saúde, 2017)

1.6 REATIVAÇÃO DO VÍRUS HIV-1

A depleção dos reservatórios celulares de vírus latente é fundamental para as terapias que visam erradicar a infecção. Os linfócitos T CD4⁺ de memória em repouso constituem um reservatório importante do vírus latente devido, em parte, a sua longa meia-vida (BOSQUE; PLANELLES, 2009). Como estes linfócitos infectados não apresentam um fenótipo específico, é difícil direcionar o tratamento para eles e parece ser necessário reativar a infecção em todas as células que contêm o vírus.

As diferentes abordagens terapêuticas sobre os reservatórios virais latentes visam a cura esterilizante, com erradicação do vírus do organismo hospedeiro, ou a cura funcional, que é o controle imunológico do vírus na ausência da terapia (WANG et al., 2017). Em consequência à reativação, espera-se a identificação e o controle do HIV-1 pelo sistema imune do paciente que também estará sujeito à ação dos antirretrovirais. Apesar do risco de imunossupressão grave, a reativação e

expressão do complexo gp41/gp120 na superfície das células infectadas pode ser, adicionalmente, um importante sinalizador para tentativas de destruição terapêutica com imunotoxinas específicas para essas glicoproteínas ou para radioimunoterapia (WOLSCHEIDORF et al., 2012). Essa estratégia, conhecida como “*shock and kill*”, é considerada uma das mais promissoras na busca pela cura da infecção e, com isso, o desenvolvimento de agentes reversores da latência (LRA) tornou-se alvo de inúmeras pesquisas *in vitro* e *ex vivo*. Em nossa opinião, acreditamos que essas estratégias terão maior sucesso em pacientes com o sistema imune mais preservado, isto é, antes do advento da Aids.

Diversos fatores estão envolvidos no mecanismo de latência do HIV-1. Nas células em repouso, são encontrados baixos níveis dos fatores de transcrição NF-κB e P-TEFb (do inglês *positive transcription elongation factor*), essenciais na regulação positiva da transcrição por induzir a RNA polimerase II. Nesse sentido, agonistas da PKC, como a prostatina e o acetato miristato de forbol (PMA, do inglês *phorbol 12-myristate 13-acetate*), conhecidos por induzir a expressão desses fatores, foram testados quanto à capacidade de reativar as células com vírus latente e mostraram-se promissores. O PMA é um potente ativador de células mononucleares e indutor da proliferação e produção de citocinas através desta via. A Prostatina age sobre células ativadas induzindo a ativação do fator de transcrição NF-κB, também conhecido como p65, que em linfócitos T quiescentes está fora do núcleo (WILLIAMS et al., 2004). Em estudo de Díaz e colaboradores (2015), a Briostatina, também agonista da PKC, foi capaz de reativar a infecção latente através da ativação da via NF-κB em células do SNC infectadas pelo HIV-1, estimulando as regiões promotoras das LTR e a transcrição do genoma viral.

O NF-κB tem três efeitos principais: recrutamento de HAT, remoção da subunidade p50 envolvida no remodelamento da cromatina nas regiões das LTR do HIV-1 e, finalmente, recrutamento do P-TEFb para aumentar a elongação da transcrição gênica. Como a maioria dos reservatórios latentes é estabelecida e mantida em nível de transcrição, a reduzida disponibilidade desses fatores parece ser o principal mecanismo de restrição à expressão dos pró-vírus integrados *in vivo* (CONTRERAS; LENASI; PETERLIN, 2006; WILLIAMS et al., 2004).

Em linfócitos T de memória em repouso, a reativação induzida do vírus latente é mediada, predominantemente, pela ativação celular via TCR usando anticorpos monoclonais anti-CD3/anti-CD28, IL-2 ou pela ativação do fator de transcrição NFAT com ionomicina (IO) (BOSQUE; PLANELLES, 2009). Entretanto, os resultados usando essas abordagens em associação à TARV não foram eficientes em erradicar os reservatórios virais, além de terem se mostrado altamente tóxicas ao paciente. Esses estímulos não têm efeito sobre os pró-vírus latentes em linfócitos T ativados porque, provavelmente, os fatores de transcrição envolvidos já estão ativados. Isso demonstra que o estabelecimento do estado de latência do vírus não é exclusivamente devido à ausência desses fatores e que o mecanismo molecular responsável por reativar o vírus latente pode ser dependente do estado de ativação dos linfócitos T.

Acredita-se que esses ensaios tenham falhado também devido à resposta inflamatória decorrente da ativação do NF- κ B que limitou a concentração das citocinas testadas, não sendo suficiente para a ativação sistêmica desse fator na população de células T de memória infectada. Para a aplicação clínica, essa abordagem precisaria dissociar a ativação do vírus da ativação de genes celulares, uma vez que a responsividade de muitas citocinas inflamatórias ao NF- κ B expõe os pacientes a um estado de inflamação intensa (WOLSCHEMENDORF et al., 2012; VAN DER SLUIS et al., 2013). Diante disso, muitos pesquisadores têm buscado alvos mais direcionados à replicação do HIV-1, tal como as histonas desacetilases (HDAC).

As HDAC são enzimas que atuam no silenciamento do genoma viral. Alguns inibidores destas enzimas, como o ácido valpróico, podem reativar o vírus latente impedindo a desacetilação das histonas, o que mantém a cromatina de DNA mais aberta e o promotor viral na LTR mais acessível à interação com fatores de transcrição (VAN DER SLUIS et al., 2013). Infelizmente, os testes clínicos demonstraram uma incapacidade do ácido valpróico em alterar os reservatórios virais. Por outro lado, Huang e colaboradores (2007) demonstraram que miRNA contribuem para o estabelecimento da latência em células quiescentes e que a ativação destas células por PMA e IL-2 é capaz de reativar a transcrição viral.

Algumas citocinas pró-inflamatórias intensificam a replicação viral em células mononucleares do sangue periférico, mas a função destas citocinas na indução da replicação viral em células T CD4⁺ com a infecção latente ainda é questionada. De acordo com Jeeninga e colaboradores (2008), os pró-vírus latentes podem ser reativados pelo tratamento com TNF- α , uma citocina pró-inflamatória, e por genisteína ou 5-Azacitidina, que alteram a metilação do DNA. A associação desses ativadores parece ter um efeito sinérgico na reativação do pró-vírus. Ademais, estudo de Chun e colaboradores (1998) demonstrou que a associação da IL-6, TNF- α e IL-2, é capaz de induzir a replicação viral em células T CD4⁺ purificadas de pacientes com ou sem a TARV. *In vitro*, a presença dos antirretrovirais suprimiu completamente a replicação viral induzida pelas citocinas. O microambiente dos tecidos linfoides, que abrigam os reservatórios virais latentes, tem elevada expressão de citocinas, incluindo as analisadas no estudo. Diante disto, é possível supor que o ressurgimento, frequentemente observado, da carga viral detectável em pacientes que interrompem a TARV seja consequência da reativação viral por estímulo dessas citocinas (CHUN et al., 1998).

Mais recentemente, alguns estudos têm investigado compostos naturais derivados do metabolismo secundário de plantas como candidatos para a reativação viral. Dentro da família Euphorbiaceae, por exemplo, diferentes espécies têm sido usadas de modo popular com fins medicinais (BITTNER et al., 2001). A identificação de alguns desses compostos ativadores da PKC motivou a busca por uma provável ação como reversor de latência no contexto da infecção pelo HIV-1 (HASSAN; MOHAMED; MOHAMED, 2012; EL-MEKKAWY et al., 2000; JOSÉ et al., 2014). De forma interessante, estudo por Hassan e colaboradores (2012) demonstrou que agonistas da PKC presentes em ésteres derivados da semente de *Croton tiglium* inibem o efeito citopático induzido pelo HIV-1 em células linfocitárias (EL-MEKKAWY et al., 2000). Ainda, estudo de Wang e colaboradores (2017) identificou um derivado de ingenol, isolado a partir de raízes da *Euphorbia kansui*, capaz de reverter de modo significativo a latência do HIV-1. Acredita-se que o mecanismo promotor da transcrição do vírus também seja decorrente da ação agonista da PKC, permitindo, assim, a ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e P-TEFb (WANG et al., 2017).

1.7 A *Synadenium grantii* E SEU POTENCIAL EFEITO SOBRE A REATIVAÇÃO DO HIV-1

1.7.1 Identificação

A família de plantas Euphorbiaceae é composta por mais de 300 gêneros e 8.900 espécies heterogêneas e distribuídas em regiões que variam de árida à tropical úmido. Devido a sua variedade, elas podem se apresentar sob a forma de ervas, arbustos ou grandes árvores que são encontradas, predominantemente, na África, na Índia e nas Américas (DUN; SINGH, 2007; BITTNER et al., 2001; MARTINS et al., 2017). A utilização de plantas para fins medicinais tem crescido de modo significativo nos últimos anos e vem sendo incentivada pela OMS (CUNHA et al., 2009). Diante da potencial aplicação médica e da existência de espécies tóxicas nessa família, estudos buscam revelar a composição fitoquímica e avaliar os efeitos destas plantas através de ensaios *in vitro* com diferentes linhagens celulares e *in vivo* em ratos e camundongos.

Em alguns gêneros da família Euphorbiaceae, como *Euphorbia*, *Jatropha*, *Ricinus*, *Manihot* e *Synadenium*, foi observada a presença de moléculas bioativas como flavonoides, saponinas, terpenos, ésteres, alcaloides, glicosídeos cianogênicos, taninas, lectinas e glicoproteínas (PREMARATNA; SHADAKSHARASWAMY; NANJAPPA, 1981; BITTNER et al., 2001; SOUZA et al., 2005; RAJESH et al. 2006; ROGÉRIO et al. 2007). Entretanto, muitas espécies desta família são conhecidas por serem tóxicas devido ao látex que possui atividade irritante na pele e a relatos de que a exposição crônica pode resultar em efeito carcinogênico. As substâncias tóxicas são diterpenos específicos chamados de forbóis com ação pró-inflamatória acentuada e promotora do crescimento tumoral pela ativação da PKC. O estudo de Hohmann e Molnar (2004) demonstrou a existência de diferentes grupos de diterpenos com efeitos tóxicos, que podem ter relevância terapêutica quando utilizados na concentração adequada.

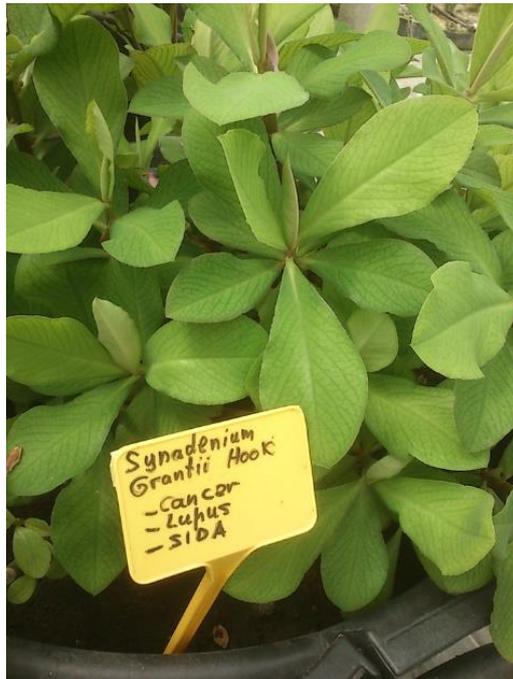
O gênero *Synadenium* contém 19 espécies e, em algumas delas, foram descritas propriedades farmacológicas com ação anti-inflamatória, antitumoral, analgésica, antiparasitária, imunorreguladora e fibrinolítica (PREMARATNA;

SHADAKSHARASWAMY; NANJAPPA, 1981; JAGER, 1996; ORTÊNCIO, 1997; SOUZA et al., 2005; RAJESH et al., 2006; ROGÉRIO et al., 2007; VALADARES; CASTRO; CUNHA, 2007; AFONSO-CARDOSO et al., 2011). No centro-oeste do Brasil, a espécie *Synadenium umbellatum*, conhecida popularmente como cola-nota, tem sido usada empiricamente como antitumoral e anti-inflamatória. Sua propriedade antitumoral foi comprovada por Nogueira e colaboradores (2008) em estudo *in vitro* usando linhagens de células de tumor de ascite K-562 e Ehrlich (EAT), no qual a viabilidade celular foi avaliada após incubação com o extrato etanólico das folhas (0,15-20 mg/mL) ou concentrações equivalentes de suas frações clorofórmicas, hexânicas ou metanólicas. Também por esse grupo, foi demonstrado efeito anti-angiogênico, de modo dose-dependente, *in vivo* em ratos portadores de EAT. Nesta análise, os ratos foram tratados intraperitonealmente com 5, 10 e 25 mg/kg do extrato durante 10 dias e foi observada, na maior dose, redução dos níveis de fator de crescimento endotelial vascular (NOGUEIRA et al., 2008).

Além do extrato das folhas, o látex da *S. umbellatum* também parece ter propriedades medicinais sendo usado como anticoagulante e no tratamento de diabetes mellitus, hanseníase, Doença de Chagas, leucemia e tumores malignos (ORTÊNCIO, 1997; LUZ et al., 2015). Cunha e colaboradores (2009) avaliaram a toxicidade pré-clínica do látex e do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* por via oral em ratas Wistar, e não relataram alterações fisiológicas nem comportamentais na dose de 200 mg/kg. Entretanto, a análise histopatológica dos animais tratados com o látex demonstrou congestão e infiltrado leucocitário nos rins, fígado e pulmões.

A *Synadenium grantii* Hook. f., também chamada de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns, é uma planta da família Euphorbiaceae nativa do Oeste da África e conhecida no sul do Brasil como leitossinha ou janaúba (LUZ et al., 2015). Ela se apresenta como um arbusto suculento que pode atingir até 5 metros de altura, com folhas ovais, pecíolos curtos e flores vermelha-escuro (COSTA et al., 2012). Assim como a *S. umbellatum*, ela tem sido usada na medicina popular para o tratamento de diferentes distúrbios. Entretanto, deve-se ressaltar que nenhuma das duas espécies está inserida na Farmacopeia Brasileira e que ainda não há indicação de uso no Formulário Nacional Brasileiro (LUZ et al., 2015).

Figura 5 – *Synadenium grantii* Hook. f.



Synadenium grantii Hook. f. (Fonte: <http://badiaverde.blogspot.com.br/2013/08/synadenium-grantii-hook.html>).

1.7.2 *Synadenium grantii* Hook. f.: efeitos biológicos

A *Synadenium grantii* Hook. f. (*S. grantii*) é aplicada pela medicina popular no tratamento de alergias, hemorragias, doenças neoplásicas e gastrointestinais, como úlcera péptica e gastrite (MACHADO, 2008). No leste do Paraná, a *S. grantii* é usada como preparações obtidas a partir de uma diluição caseira, chamada de *garrafada*, com 18 gotas do látex (0,7 g) em 1 litro de água, que deve ser mantida na geladeira e ingerida na quantidade de um copo três vezes ao dia (ORTÊNCIO, 1997).

As principais formas de extração dos componentes ativos do látex são com etanol, metanol, clorofórmio, acetato de etila e hexano (MARTINS et al., 2017). No estudo de Costa e colaboradores (2012), foi avaliada a atividade anti-úlcera em ratas Wistar que receberam, por via oral, 0,5 mL do látex puro ou diluído (50 µL-100mL) da *Synadenium grantii* no grupo experimental. Ranitidina (100 mg/kg) ou Omeprazol (20 mg/kg) foram usados como controle positivo e água como controle negativo. Todas essas abordagens foram conduzidas antes da indução das lesões gástricas,

provocadas pela administração oral de etanol. Após essa indução, os animais foram eutanasiados e, com base no cálculo do índice de lesão ulcerativa (GAMBERINI, 1992), os autores observaram uma modesta redução de 6% do dano à mucosa gástrica dos animais previamente tratados com o látex diluído. Surpreendentemente, esses autores observaram uma redução de 90% das lesões no grupo tratado com o látex puro, quando comparado ao controle negativo, e este demonstrou-se mais eficaz do que a Ranitidina e o Omeprazol. É provável que essa proteção esteja associada à habilidade do látex puro em formar uma camada protetora que impede o dano causado por agentes agressivos, como o etanol. Outra possibilidade é que as substâncias químicas presentes no látex, como os fenóis e saponinas, tenham ação anti-úlceras.

Em relação à toxicidade oral do látex puro e diluído, avaliada em ratas Wistar, não foram observadas alterações macroscópicas no fígado, rins, glândulas supra-renais, baço, útero, ovários, pâncreas e estômago. Este resultado diverge do relato de Cunha e colaboradores (2009) que demonstraram alterações teciduais nas concentrações de 50-200 mg/kg de *S. umbellatum*. O resultado da análise bioquímica de albumina, creatinina e proteína C-reativa não mostrou alteração, enquanto a análise de enzimas hepáticas revelou aumento de aspartato e alanina aminotransferase no grupo tratado com o látex puro comparado ao controle e ao látex diluído. Diante disso, os autores sugeriram que o efeito biológico da *S. grantii* estaria associado a potencial sensibilização e efeito alérgico mediado por uma eosinofilia acompanhada de uma queda do número de linfócitos observada nas ratas.

A propriedade antitumoral da *S. grantii* é associada aos terpenos que a constituem que têm expressiva atividade citotóxica e cuja extração, a partir do látex, é mais bem-sucedida com os reagentes hexano e clorofórmio (MARTINS et al., 2017). Um estudo realizado na África, por Andersen e colaboradores (2010), isolou seis antocianinas presentes nas folhas da *S. grantii*, que possuem ações não apenas anti-tumorais, como também imunorreguladoras e fibrinolíticas. O extrato bruto da casca dessa planta apresentou estas mesmas ações e se mostrou anti-inflamatório em estudo *in vivo*, onde foi capaz de reduzir o edema das patas de ratos na dose de 50 mg/kg/dia, sendo mais eficiente que o anti-inflamatório não esteroide

ibuprofeno (MUNHOZ et al., 2014). Este efeito anti-inflamatório pode ser associado aos compostos presentes nesse extrato bruto, que possuem propriedades antioxidantes e inibidoras da produção de espécies reativas de oxigênio, além de potente ação redutora do ferro (MUNHOZ et al., 2014).

Na análise do efeito antitumoral de diferentes frações da *S. grantii*, obtidas por cromatografia, o extrato obtido a partir do caule, e não das folhas, mostrou-se mais eficiente em reduzir o potencial proliferativo de linhagens de células humanas de tumor (glioma, mama, rim e pulmão) (CAMPOS et al., 2016). Esse efeito é promovido pelo princípio ativo isolado do látex, o 3, 4, 12, 13-tetraacetilforbol-20-fenilacetato, que é um éster diterpeno do tipo forbol raro, com potencial efeito terapêutico antitumoral (MARTINS et al., 2017).

Estudos fitoquímicos com a *S. grantii* mostram a presença de flavonoides, saponinas, terpenos, ésteres de forbol, lecitinas e glicoproteínas. Os ésteres de forbol identificados nesta espécie são similares ao PMA, isolado a partir de sementes de *Croton tiglium*, que também pertence à família Euphorbiaceae (EL-MEKKAWY et al., 2000; HASSAN; MOHAMED; MOHAMED, 2012). Com isso, sugere-se que esses compostos sejam capazes de inibir o efeito citopático causado pelo vírus nas células hospedeiras por ativar a PKC, o que induziria translocação nuclear do NF- κ B e, provavelmente, reativação dos vírus latentes (UZABAKILIHOC; LARGEAU; CASADWALL, 1987). Ademais, sabendo que a ativação da PKC modula a expressão de várias citocinas envolvidas na resposta imune, esses compostos derivados da *S. grantii* poderiam exercer ações imunomoduladoras nos linfócitos T dos pacientes infectados pelo HIV-1, o compartimento celular mais comprometido no sistema imune, que impacta na progressão da doença.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o efeito *in vitro* do extrato alcóolico do látex de *Synadenium grantii* (Janaúba) na capacidade replicativa do HIV-1 e o perfil de citocinas produzidas por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes infectados pelo HIV-1.

2.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar a viabilidade das células T CD4⁺ e T CD8⁺ dos pacientes HIV-1 positivos na presença de diferentes concentrações do extrato da Janaúba (JALEx).
- ✓ Quantificar a carga viral nas culturas de CMSP dos pacientes quando mantidas na presença de diferentes concentrações do JALEx.
- ✓ Dosar os níveis de diferentes citocinas secretadas pelas CMSP dos pacientes em resposta a diferentes concentrações do JALEx.
- ✓ Analisar o perfil de citocina relacionado aos fenótipos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios no compartimento das células T CD4⁺ e CD8⁺ nas culturas de CMSP dos pacientes mantidas na presença do JALEx.
- ✓ Correlacionar a carga viral *in vitro* com as diferentes citocinas produzidas nas culturas de CMSP na presença do JALEx.

3. METODOLOGIA

3.1 PACIENTES

Para realização do presente estudo, foram recrutados 15 pacientes soropositivos para HIV-1 e com Aids, submetidos à terapia antirretroviral de alta eficiência (TARV) e atendidos pelo professor Paulo Damasco no ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO). Foram colhidas amostras de sangue dos pacientes que concordaram em participar e que afirmaram estar cientes do procedimento a ser realizado através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG/UNIRIO) (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética: 30286514.4.0000.5258).

Para minimizar as interferências, foram excluídos pacientes que faziam uso de drogas imunossupressoras, os que usavam drogas ilícitas ou que possuíam comorbidades de mediação imune, tal como alergia e autoimunidade. Dados referentes aos pacientes, contagem das células T CD4⁺ e T CD8⁺ e carga viral plasmática foram obtidos a partir dos prontuários médicos.

3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE JANAÚBA

A obtenção do látex que deu origem aos extratos foi feita pelo laboratório KyoLab (Valinhos – SP). Para tal, foram feitas incisões mecânicas no tronco de espécimes cultivados em Barretos, no Estado de São Paulo, Brasil. O látex bruto coletado foi diluído em etanol a 80%, filtrado e seco em evaporador rotatório. O pó resultante da evaporação foi solubilizado em DMSO para concentração estoque.

Os extratos de ésteres diterpeno do tipo forbol, ricos em 3, 4, 12, 13-tetraacetilforbol-20-fenilacetato e 4-desoxiforbol, 12,13-ditiglato, foram fornecidos pelo professor Amilcar Tanuri do laboratório de Virologia Molecular da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Para atingir a concentração de 10 mg/ml, foi feita diluição

em DMSO. Diluições seriadas nas concentrações de 20 µg, 2 µg e 0,2 µg/mL foram obtidas a partir da diluição do extrato de látex da Janaúba (JALEx) em Solução Balanceada de Hank's (LGC Biotecnologia).

3.3 OBTENÇÃO E ESTIMULAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO *IN VITRO*

Para o nosso estudo 15 ml de sangue periférico dos pacientes infectados pelo HIV-1 que atendiam aos critérios estabelecidos no item 3.1 foram colhidos por meio de agulhas e tubos heparinizados estéreis (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NY). O sangue total foi centrifugado em gradiente de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Up) a 2000 RPM por 20 minutos e o plasma obtido foi congelado para posterior determinação da carga viral. As células foram lavadas com solução de Hank's (Thermo Fisher), avaliadas quanto à viabilidade com azul de Trypan (Sigma-Aldrich Co) e contadas utilizando a câmara de Neubauer. Em seguida, 2×10^6 de CMSP viáveis foram mantidas em 2 mL de meio RPMI 1640 (LGC Biotecnologia) completo em placas de 24 poços de fundo chato. O meio de cultura foi considerado completo quando acrescido de soro fetal bovino (SFB) a 10% e de penicilina/estreptomicina a 1%.

As culturas foram mantidas por 4, 8 e 24 horas na presença só de meio de cultura (controle) ou na presença de diferentes concentrações do JALEx (0,01 µg/mL, 0,1 µg/mL e 1 µg/mL). Como controle positivo, algumas culturas foram mantidas na presença de ativadores da PKC, PMA (Sigma-Aldrich Co) a 20 ng/mL e ionomicina (Sigma-Aldrich Co) a 600 ng/mL. As placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Para otimizar a marcação intracelular de citocina por citometria, 2 µL de brefeldina A (10 µg/mL, Sigma-Aldrich) foram adicionados 4 horas antes do tempo término da cultura. Após os diferentes tempos de incubação, os sobrenadantes das culturas foram colhidos e congelados a -20 °C para determinação da carga viral *in vitro* e do perfil de citocinas. As células foram recuperadas e analisadas por citometria de fluxo.

3.4 ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO

A porcentagem e o perfil de citocinas produzidas pelas células TCD4⁺ e TCD8⁺ foram definidos através da marcação com anticorpos monoclonais (mAbs) fluoresceinados (BioLegend, San Diego, CA, USA) em diferentes combinações. De forma breve, 200 µl de CMSP previamente incubadas foram marcadas na superfície com 2 µl de mAbs dirigidos contra os marcadores CD3-PE e CD4-FITC ou CD8-FITC. Os tubos foram mantidos a temperatura ambiente por 20 minutos e protegidos da luz. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com solução de lavagem contendo PBS (do inglês *Phosphate Buffered Saline* – LGC Biotecnologia) 1X e SFB a 1% e submetidas à fixação e permeabilização com solução Cytotfix/Cytoperm (BD Pharmingen, San Diego, CA).

Após 20 minutos de incubação a 4 °C e protegidas da luz, as células foram lavadas novamente e submetidas à marcação intracelular com 2 µl de mAbs anti-IFN-γ-PE-Cy7, anti-IL-21-APC e anti-IL-17-PE-Cy5 ou anti-IL-10-PE-Cy5. Em seguida, as células foram incubadas por 20 minutos à 4 °C ao abrigo da luz, lavadas uma última vez (PBS 1X com 1% de SFB) e submetidas à análise por citometria. A viabilidade celular foi avaliada através da incubação das células com 2 µl de 7-aminoactinomicina D (7-AAD - ReD systems) por 20 minutos ao abrigo da luz. Todas as análises foram conduzidas após a aquisição de 100 mil a 200 mil eventos celulares usando os citômetros Accuri C6 (Accuri, Ann Arbor, MI, USA) ou Attune (Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer). Os linfócitos foram determinados através dos padrões de tamanho e granulosidade após a exclusão de células mortas e debris.

3.5 DOSAGEM DE SECREÇÃO DE CITOCINAS

A quantificação das citocinas IL-1β, IFN-γ, TNF-α, IL-17, IL-21, IL-6 e IL-10 nos sobrenadantes das culturas de CMSP dos pacientes infectados pelo HIV-1 foi realizada através da técnica de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) usando o kit BD OptEIA, seguindo as

instruções do protocolo fornecido pelo fabricante (BD, Pharmigen, San Diego). Brevemente, 50 µL dos sobrenadantes diluídos 1:5 foram adicionados a cada poço contendo anticorpo primário anti-citocina, o anticorpo de captura. A placa foi incubada durante 2 horas e, após esse tempo, 100 µL do anticorpo secundário anti-citocina (previamente tratado com a enzima conjugada estreptavidina-horseradish peroxidase) foram adicionados a cada poço e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, 100 µL de substrato TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina) foram adicionados aos poços e a reação foi revelada 30 minutos depois, através da adição de uma solução de ácido fosfórico a 1,0 M. A absorbância a 450 nm dos poços das placas foi lida em leitor de ELISA (DynerxTechnologies, USA). Foram utilizadas citocinas humanas recombinantes variando de 4,5-500 pg/mL para construir curvas-padrão.

3.6 DOSAGEM DA CARGA VIRAL POR QRT-PCR

A quantificação do número de cópias de RNA do HIV-1 nos sobrenadantes das culturas de células dos pacientes foi feita com o kit comercial Abbot Real Time HIV-1 através da técnica NASBA (do inglês *nucleic acid sequence based amplification*) seguindo as instruções do fabricante (Abbot Laboratories, Chicago, Illinois EUA), com sensibilidade de 40 cópias/mL (1,60 log₁₀ cópias/mL).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas do estudo foram conduzidas pelo programa de gráfico GraphPad Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad software). O teste t de Student foi utilizado para comparar a produção de citocinas secretadas por culturas de CMSP ou pelas células T CD4⁺ e T CD8⁺ mantidas sob diferentes condições experimentais. A correlação de Pearson foi usada para determinar a existência de alguma relação entre a taxa de replicação viral *in vitro* com as citocinas estudadas. A significância para todos os experimentos foi definida como p<0,05.

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES

Os pacientes participantes do estudo apresentaram idade média de $49 \pm 12,8$ anos e tempo médio de diagnóstico da infecção pelo HIV-1 de $17,1 \pm 7,7$ anos. Todos os pacientes tinham Aids levando-se em consideração o número de células T CD4⁺ [15/15 (<200 células/mm³)] e a ocorrência de infecções oportunistas (9/15) no momento do diagnóstico. Oito pacientes pertenciam ao gênero feminino e sete ao masculino. A maioria (12/15) dos pacientes apresentou carga viral indetectável, ou seja, inferior a 40 cópias de RNA viral/mL de sangue. Três pacientes apresentaram carga viral detectável, mas relataram início recente (2/3) da terapia ou abandono ao longo do tratamento (1/3). Todas as terapias em uso pelos pacientes do estudo incluíam diferentes classes farmacológicas: inibidores da transcriptase reversa análogos aos nucleosídeos associados a inibidores de protease ou a inibidores da transcriptase reversa não análogos. A contagem média de células T CD4⁺ e T CD8⁺ por microlitro de sangue foi de 845 (desvio-padrão de 343,7) e 851,1 (desvio-padrão de 334,3), respectivamente. Esses dados estão sumarizados na tabela abaixo.

Tabela 2 – Características dos Pacientes HIV-1⁺

| Pacientes HIV-1 | Dados |
|--|--------------------|
| Nº de Pacientes (n) | 15 |
| Gênero: Feminino/Masculino (n) | 8/7 |
| Idade em anos (média ± dp) | 49 ± 12,8 |
| Tempo de diagnóstico em anos (média ± dp) | 17,1 ± 7,7 |
| Contagem de células T CD4⁺/mm³ (média ± dp) | 845 ± 343,7 |
| Contagem de células T CD8⁺/mm³ (média ± dp) | 851 ± 334,3 |
| Carga Viral indetectável (n) | 12/15 |

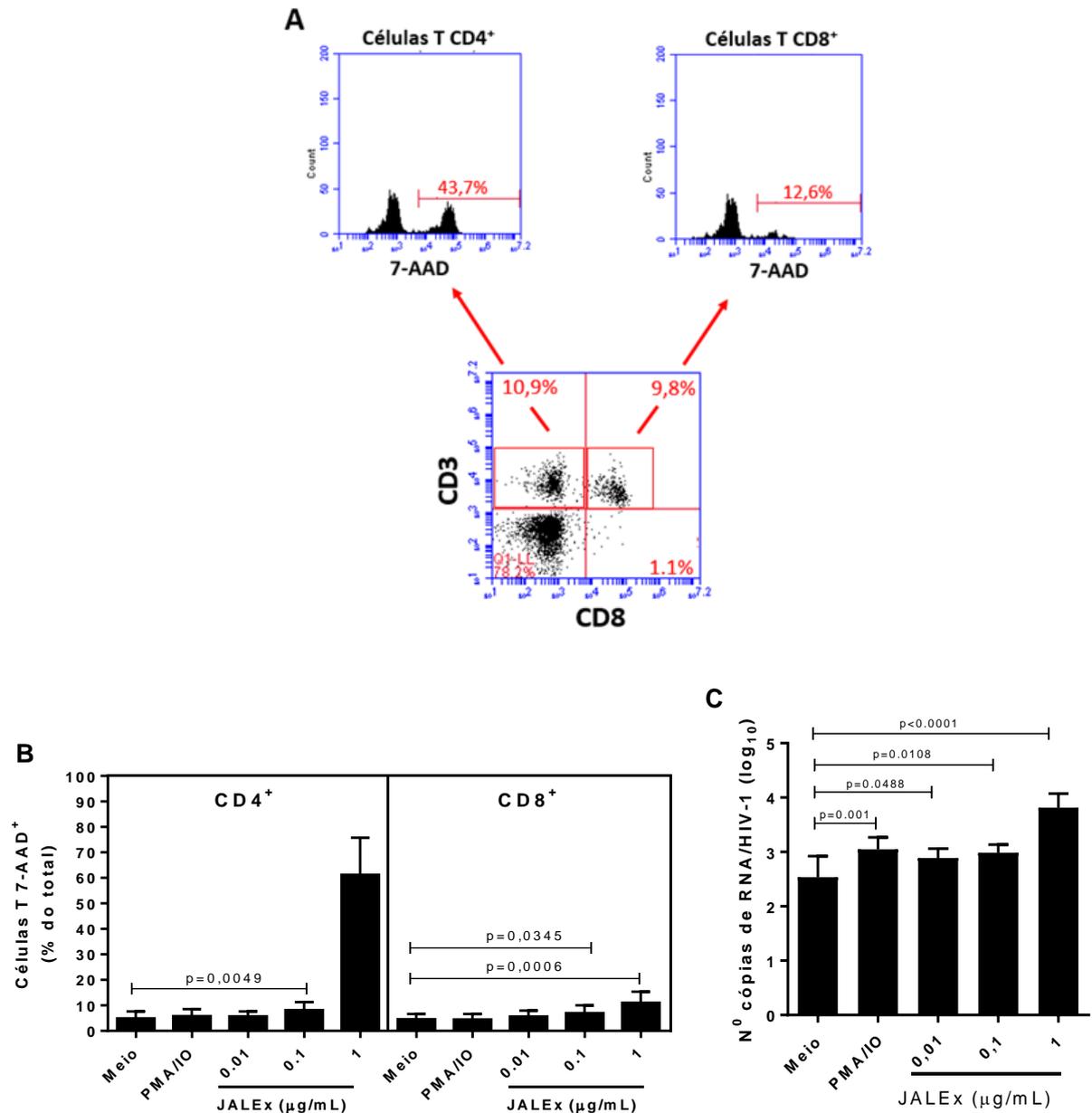
*dp: Desvio Padrão

Dados dos pacientes infectados pelo HIV-1 com Aids sob terapia antirretroviral recrutados para o nosso estudo. Os esquemas foram: TDF + 3TC + Lopinavir/RTV (n=5), TDF + 3TC + EFZ (n=3), AZT + 3TC + ATV (n=1), TDF + 3TC + ATV/r (n=3), TDF + 3TC + RTV + Darunavir + Dolutegravir (n=1) e AZT+3TC+TDF (n=2). 12/15 pacientes tinham carga viral indetectável, isto é, <40 cópias de RNA do HIV-1/mL de plasma (< 1,6 log₁₀). Os pacientes 1, 5 e 14 tinham CVP de 2.73 Log₁₀, 3,27log₁₀ e 3,271 log₁₀, respectivamente.

4.2 EFEITO DO EXTRATO ALCÓOLICO DO LÁTEX DE *S. grantii* SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS T E A REPLICAÇÃO DO HIV-1

Nosso primeiro objetivo foi determinar o impacto de diferentes concentrações do JALEx na viabilidade das células T CD4⁺ e T CD8⁺ dos pacientes com Aids. Na figura 6B pode ser observado que a concentração de 1 µg/mL do JALEx reduziu em média 61% da viabilidade das células T CD4⁺ em 24 h (variando de 43 a 81%). Esta mesma concentração provocou a morte de 11% dos linfócitos T CD8⁺ (variando de 5,1 a 21%). A taxa de morte das células T CD4⁺ (4,5 a 15,7%) e T CD8⁺ (1,5 a 12,1%) também foi significativamente maior nas culturas mantidas com 0,1 µg/mL do JALEx quando comparado às culturas mantidas apenas na presença de meio de cultura (1,2 a 10,2%). Nem a menor concentração do JALEx, nem a combinação de PMA/IO, alteraram a viabilidade dessas células quando comparado aos controles com meio (Fig. 6B). Apesar da taxa de replicação viral, representada na figura 6C como número de cópias de RNA do HIV-1/mL em escala Log₁₀, ter sido significativamente maior em todas as culturas estimuladas quando comparada à cultura controle, seu índice foi superior após a adição de 1 µg/mL do JALEx (Fig. 6C). Portanto, devido ao elevado potencial tóxico desta concentração na viabilidade celular e no favorecimento da replicação do HIV-1 *in vitro*, os próximos ensaios referentes à análise do perfil de citocinas foram conduzidos nas concentrações de 0,1 µg/mL e 0,01 µg/mL.

Figura 6 – Efeito do extrato alcoólico do látex da Janaúba na viabilidade das células T e replicação do HIV-1 em culturas de células de pacientes com Aids



Diferentes concentrações de JALEx (0,01, 0,1 e 1 µg/mL) foram adicionadas às culturas de CMSP (1×10^6 /mL) obtidas de pacientes com Aids. Após 24 h, a (B) viabilidade celular, determinada pela incorporação do 7-AAD, e a (C) taxa de replicação viral, foram determinadas. Em (A), dot-plot e histogramas representativos das estratégias de identificação das células T CD4⁺ e T CD8⁺ positivas para 7-AAD. Na figura, os valores médios referentes à porcentagem de células identificadas na citometria sendo positivas para 7-AAD (B), assim como os valores médios do número de cópias de RNA do HIV-1/mL (mostrado em escala Log₁₀) (C) foram comparados e os valores significativos, isto é, $p < 0,05$, estão mostrados.

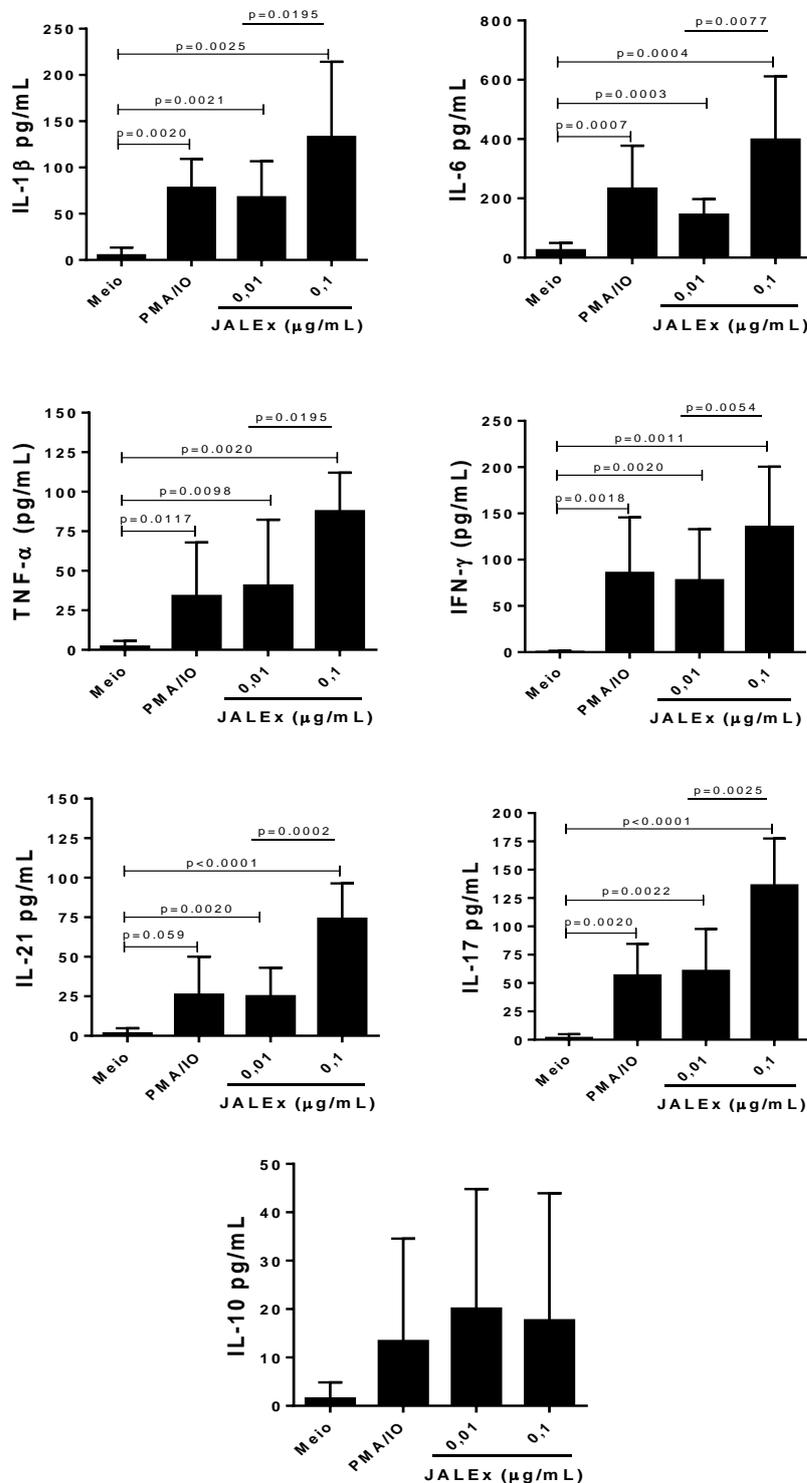
4.3 EFEITO DO EXTRATO ALCÓOLICO DO LÁTEX DE *S. grantii* SOBRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM CULTURAS DE CMSP

Muitos dos eventos imunes contra diferentes agentes infecciosos envolvem a produção de citocinas (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2015). Diante disto, avaliamos o perfil de citocinas inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-17 e IL-21) e anti-inflamatória (IL-10) secretado pelas culturas de CMSP de pacientes com Aids quando mantidos por 24h na presença do JALEx (0,1 e 0,01 $\mu\text{g/mL}$), usando a combinação de PMA/IO como controle positivo. Quando comparado às culturas de células mantidas apenas na presença de meio de cultura (controle negativo), PMA/IO e JALEx, principalmente na maior concentração, elevaram, de forma significativa, a produção de quase todas as citocinas, exceto IL-10 (Fig. 7).

4.4 EFEITO DO EXTRATO ALCÓOLICO DO LÁTEX DE *S. grantii* SOBRE A PERCENTAGEM DE CÉLULAS T EFETORAS DE PACIENTES COM AIDS

Resultado prévio demonstrou a habilidade do JALEx em induzir a produção de diferentes citocinas inflamatórias em culturas de CMSP. Como a infecção pelo HIV-1 tem profundo impacto na produção de citocinas pelas células T (VALDIVIA et al., 2017), nosso próximo objetivo foi reavaliar a produção de algumas citocinas no compartimento das células T por citometria de fluxo. Como pode ser observado na figura 8B, quando comparado à cultura controle, a combinação de PMA/IO e a maior concentração de JALEx (0,1 $\mu\text{g/mL}$) foram capazes de elevar a percentagem de células T CD4⁺ (Fig. 8B) e T CD8⁺ (Fig. 8C) positivas para IFN- γ , IL-17 e IL-21, sem mudança na proporção das células capazes de produzir IL-10. O JALEx, na menor concentração (0,01 $\mu\text{g/mL}$) também elevou a percentagem de células T CD4⁺ IL-21⁺ e T CD8⁺ IL-21⁺ quando comparado à cultura controle (Fig. 8B e 8C). Quando comparamos as duas concentrações do extrato de Janaúba, 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de JALEx foi superior em elevar a proporção de células T CD4⁺ capazes de produzir IFN- γ ($p=0,031$) e IL-21 ($p<0,0001$). No compartimento das células T CD8⁺, essa mesma concentração também se mostrou superior em elevar a percentagem desses linfócitos positivos para IFN- γ ($p=0,0471$), IL-17 ($p=0,0336$) e IL-21 ($p=0,0017$).

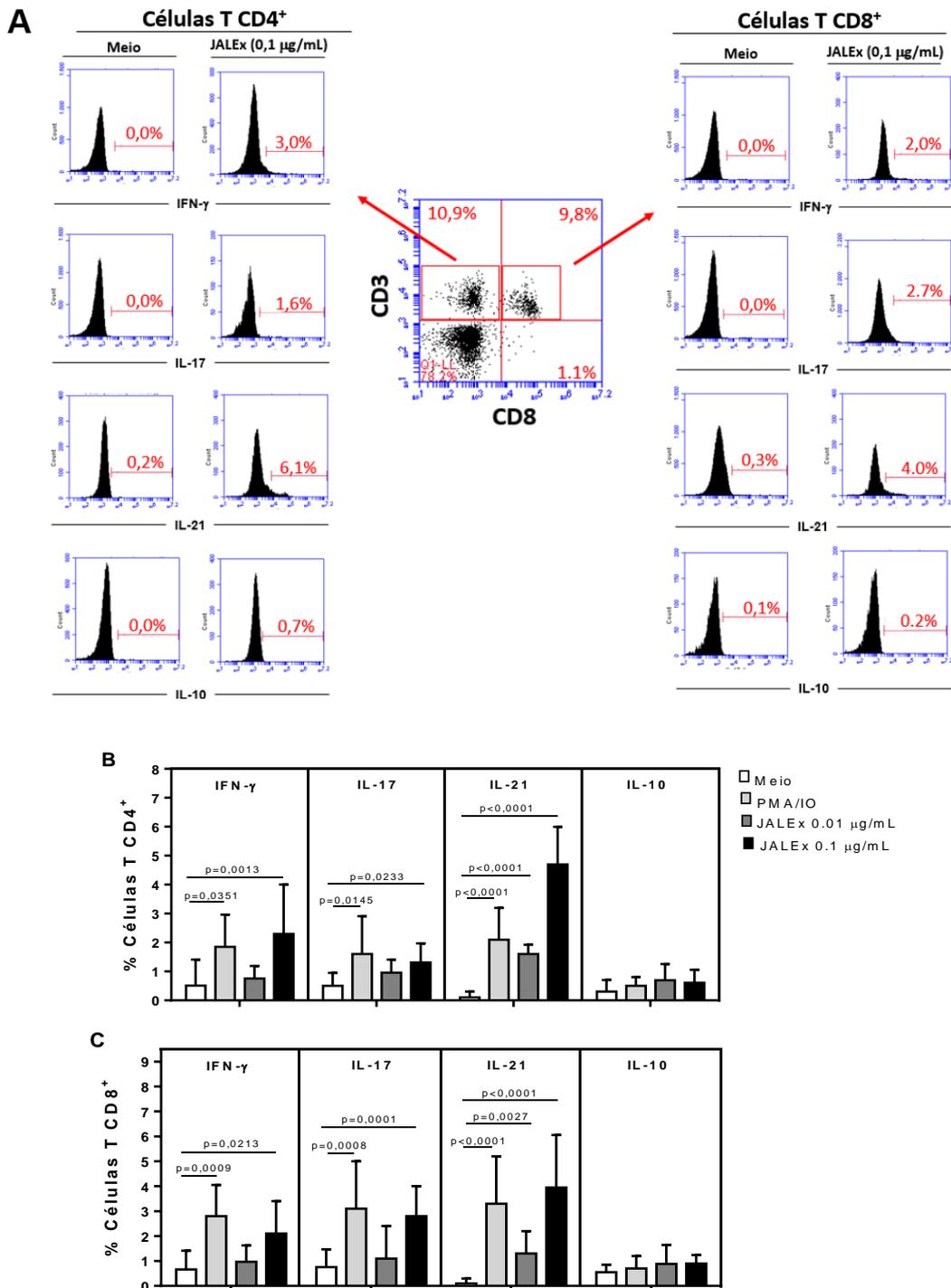
Figura 7 – Dosagem de citocinas em culturas de CMSP de pacientes com Aids mantidas na presença de extrato alcoólico do látex da Janaúba (JALEx)



Culturas de CMSP (1×10^6 /mL) foram mantidas na presença de 0,1 e 0,01 $\mu\text{g/mL}$ de JALEx por 24 horas. Como controle negativo e positivo, algumas culturas foram mantidas na presença apenas de meio de cultura ou com a combinação de PMA/IO, respectivamente. Após 24 h, os sobrenadantes foram recolhidos e submetidos à dosagem de diferentes citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-17, IL-

21 e IL-10) pela técnica de ELISA. Os valores médios de cada citocina foram comparados como demonstrado na figura e os valores de p indicados.

Figura 8 – Habilidade do JALEx em modular a produção de citocinas pelas células T de pacientes com Aids



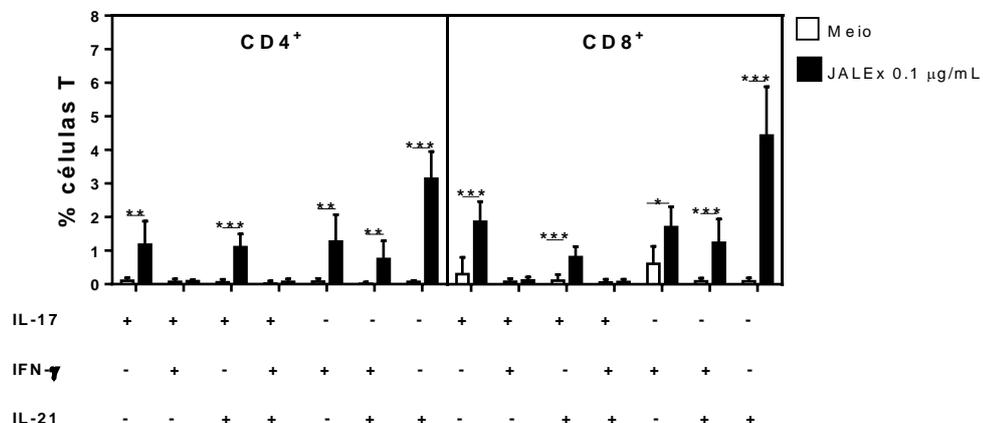
Culturas de CMSP (1×10^6 /mL) foram mantidas na presença de 0,1 e 0,01 µg/mL de JALEx por 24 horas. Como controle negativo e positivo, algumas culturas foram mantidas na presença apenas de

meio de cultura ou com a combinação de PMA/IO, respectivamente. Após 24 h, a porcentagem de diferentes subtipos de células T CD4⁺ (B) e T CD8⁺ (C) capazes de produzir IFN- γ , IL-17 e IL-21 ou positivos para IL-10 foi determinada por citometria. Em (A) temos as estratégias de identificação dos diferentes subtipos de células T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de cada citocina. O percentual médio de cada subtipo celular na cultura controle foi comparado aos poços estimulados e os valores de p indicados nas figuras.

4.5 EFEITO DO EXTRATO ALCÓOLICO DO LÁTEX DE *S. grantii* SOBRE OS DIFERENTES SUBTIPOS DE CÉLULAS T PRODUTORAS DE IL-21 EM PACIENTES COM AIDS

Resultados anteriores mostraram que 0,1 μ g/mL de JALEx foi capaz de aumentar a proporção de células T CD4⁺ e T CD8⁺ produtoras de citocinas relacionadas aos fenótipos Th1/Tc-1 e Th17/Tc-17 e, principalmente, de IL-21. Sabe-se que alguns subtipos de células T são capazes de produzir IL-21 (TIAN; ZAJAC, 2016). De forma interessante, como pode ser observado na figura 9, 0,1 μ g/mL de JALEx elevou não apenas a porcentagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺ positivas somente para IL-17 ou para IFN- γ , como também a proporção dessas que produzem, de forma combinada, a IL-21. Ademais, a maior contribuição do JALEx foi elevar a porcentagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺ produtoras apenas de IL-21.

Figura 9 – O extrato alcoólico do látex da Janaúba eleva *in vitro* diferentes subtipos de células T produtoras de IL-21 em pacientes com Aids



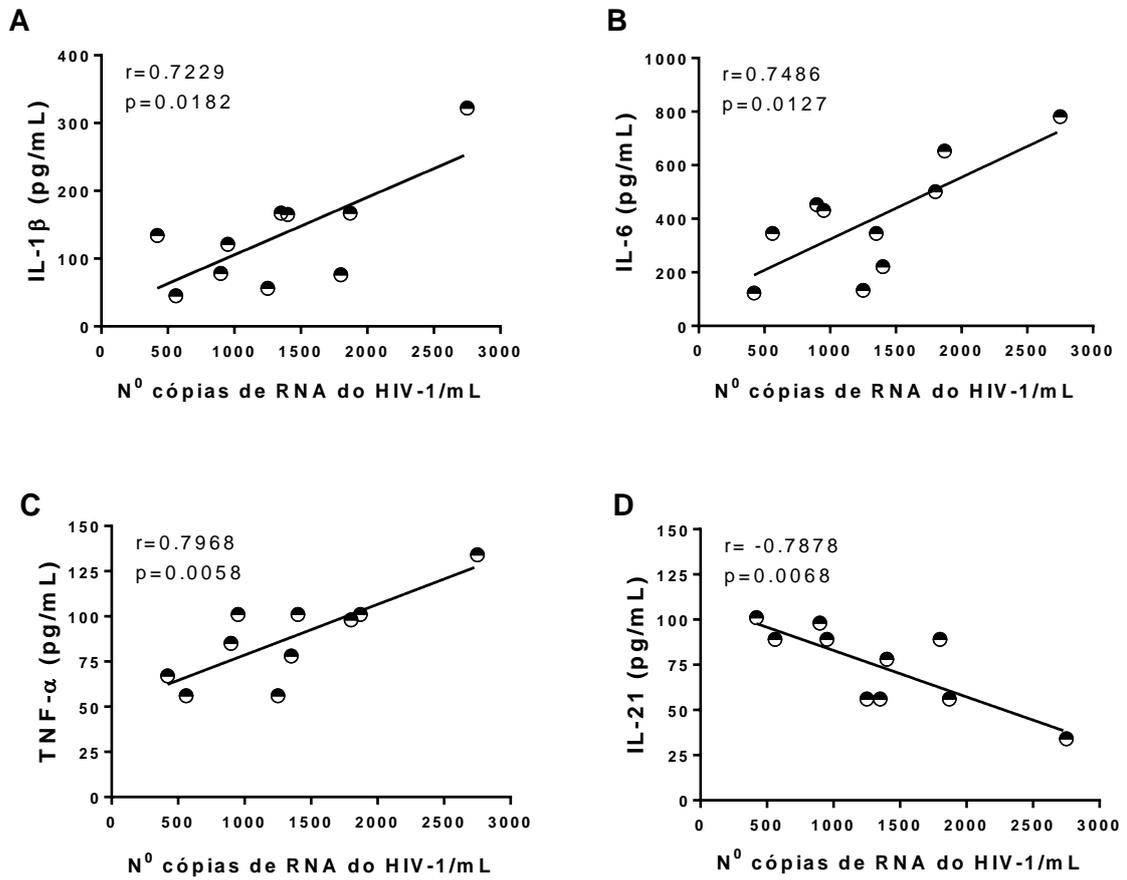
Culturas de CMSP (1×10^6 /mL) foram mantidas na presença de 0,01 μ g/mL de JALEx por 24 horas. Como controle negativo algumas culturas foram mantidas na presença apenas de meio de cultura. A

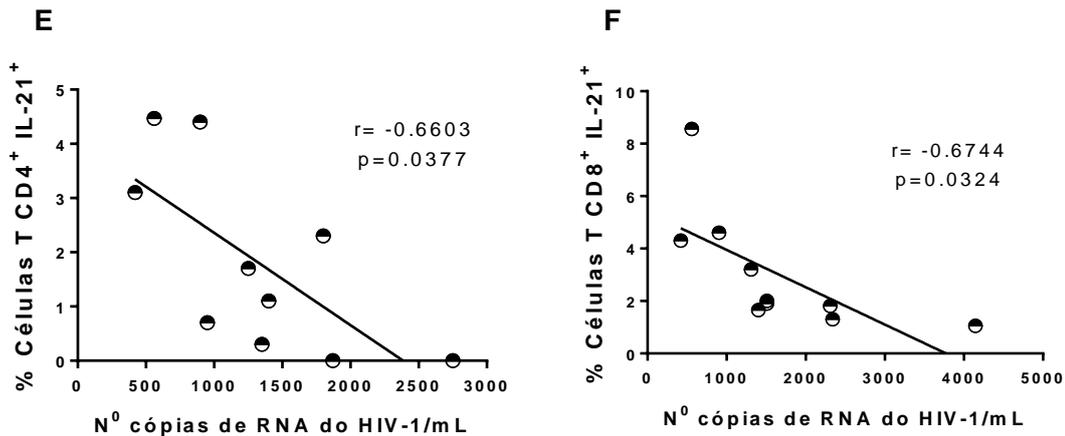
percentagem de diferentes subtipos de células T CD4⁺ e T CD8⁺ capazes de produzir diferentes combinações das citocinas IFN- γ , IL-17 e IL-21 foi determinada por citometria. O percentual médio de cada subtipo celular na cultura controle foi comparado aos poços estimulados com JALEx e (*), (**), e (***) indicam $p < 0,05$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente.

4.6 CORRELAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DE IL-21 E A REPLICAÇÃO VIRAL NA CULTURA EM RESPOSTA AO EXTRATO ALCÓOLICO DO LÁTEX DE *S. grantii*

Apesar do JALEx na concentração de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ ter induzido a produção de várias citocinas pelas células T CD4⁺ e T CD8⁺, essa mesma concentração favoreceu a replicação do HIV-1 *in vitro*. Portanto, nosso último objetivo foi avaliar se a produção das citocinas tem alguma relação com a taxa de replicação viral. De todas as correlações testadas, apenas os níveis de IL-21, secretado nas culturas de CMSP (Fig. 10D) ou produzido pelas células T CD4⁺ (Fig. 10E) e T CD8⁺ (Fig. 10F) em resposta a JALEx (0,1 $\mu\text{g/mL}$), foram inversamente correlacionados à replicação viral (Fig. 10). Em contraste, o número de cópias de RNA do HIV-1/mL foi diretamente correlacionado aos níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , que são citocinas pró-inflamatórias, secretados pelas CMSP em resposta a 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 10). Nenhuma correlação foi observada entre as células T CD4⁺ e T CD8⁺ positivas apenas para IL-17, IFN- γ ou IL-10 e a replicação viral em culturas (dados não mostrados). De forma similar, os níveis secretados de IL-17, IFN- γ e IL-10 pelas CMSP estimuladas com 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de JALEx não apresentaram nenhuma relação com a replicação viral em cultura (dados não mostrados).

Figura 10 – Correlações entre a replicação viral *in vitro* e a secreção de citocinas em culturas de CMSP de pacientes com Aids mantidas na presença do extrato alcoólico do látex da Janaúba





A replicação viral, determinada por RT-PCR em culturas de CMSP mantidas na presença de 0,1 µg/mL de JALEx, foi correlacionada à secreção de IL-1β, IL-6, TNF-α e IL-21, dosadas por ELISA, e à porcentagem de células T CD4⁺ (E) e T CD8⁺ (F) positivas para a IL-21, determinada por citometria. A correlação de Pearson foi aplicada e o valor p indicado em cada gráfico.

5. DISCUSSÃO

Atualmente, a infecção pelo HIV-1 acomete aproximadamente 36,7 milhões de pessoas no mundo, destas, 830 mil só no Brasil. A terapia antirretroviral disponível é muito eficiente em controlar a replicação viral, reduzir as infecções oportunistas e, portanto, aumentar a expectativa de vida dos pacientes. Entretanto, a cura da infecção e adequada reconstituição imune nestes indivíduos ainda não foram alcançadas e permanecem como o objetivo central de inúmeras pesquisas. O mecanismo de latência viral em diferentes tipos celulares em repouso, principalmente linfócitos T CD4⁺ de memória, é um importante obstáculo para a cura.

A literatura sugere que um dos mecanismos para o estabelecimento da latência viral em células T CD4⁺ em repouso é o baixo nível do fator de transcrição NF-κB nestas células. Eventos inflamatórios que induzem a expressão de NF-κB irão, portanto, favorecer a replicação viral devido à habilidade deste transativador ligar-se a elementos de resposta presentes nas regiões das LTR do HIV-1 (JIANG; DANDEKAR, 2015). Quando ligado às LTR, o NF-κB recruta as HAT, o que permite a abertura da cromatina, facilitando a transcrição do genoma viral (JIANG; DANDEKAR, 2015).

A descoberta de LRA vem crescendo nos últimos anos, com destaque para citocinas ativadoras policlonais de linfócitos T e ativadores da PKC nos reservatórios virais, o que induz a ativação do NF- κ B. Nesse sentido, derivados do metabolismo secundário de plantas da família Euphorbiaceae foram descritos como potenciais LRA. No estudo de Wang e colaboradores (2017), um ingenol derivado da espécie *Euphorbia kansui* foi capaz de reativar o vírus latente por um mecanismo que envolve a ativação da PKC γ e as vias de sinalização dos fatores de transcrição NF- κ B e P-TEFb. Também foi demonstrado que agonistas da PKC são importantes na proteção de linfócitos T CD4⁺ primários contra a infecção pelo HIV-1 através da regulação negativa da expressão dos receptores de quimiocina necessários à entrada (JIANG; DANDEKAR, 2015). Ainda sobre esse tema, demonstramos que o extrato alcóolico do látex da Janaúba (JALEx) foi capaz de reativar a replicação viral. Neste extrato foram identificados ésteres de forbol que são conhecidos pelo efeito agonista da PKC (TSAI et al., 2016; MARTINS et al., 2017). Diante disso, é possível sugerir que o mecanismo pelo qual a Janaúba induz a reativação da replicação viral envolve a via de sinalização da PKC e do NF- κ B.

No presente estudo, conduzido em culturas de CMSP de pacientes com Aids, a maior concentração do JALEx (1 μ g/mL) induziu uma morte expressiva das células T CD4⁺. Esse resultado está de acordo com o estudo conduzido por Campos e colaboradores (2016) que demonstrou efeito citotóxico do látex de plantas da família Euphorbiaceae como um potencial mecanismo antitumoral em linhagens celulares de tumor de mama, de rim e glioma (CAMPOS et al., 2016). Acreditamos que a redução preferencial da viabilidade de células T CD4⁺ em resposta à maior concentração do JALEx esteja associada à maior replicação viral detectada nas culturas de CMSP dos pacientes com Aids. Outro achado obtido pelo nosso grupo que reforça essa suspeita, foi a maior produção de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β , IL-6, TNF- α , que, sabidamente, ativam o NF- κ B (RHODUS et al., 2005), nas culturas mantidas na presença de JALEx.

Adicionalmente, a morte preferencial das células T CD4⁺ em nosso sistema pode ser também uma consequência das ações citotóxicas executadas pelas células NK e CTL que liberam perforina e granzima sobre as células-alvo com replicação viral ativa (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2015). Com menor impacto, a maior

concentração de JALEx também induziu maior morte de células T CD8⁺ nas culturas de CMSP de pacientes com Aids quando comparado às culturas controles. Apesar de não termos explorado os mecanismos por trás desse evento, é possível que o estresse metabólico decorrente da morte massiva das células T CD4⁺ altere as condições físico-químicas, tal como redução do pH na cultura. Diante desses dados, todos os ensaios de dosagem de citocinas foram conduzidos nas duas menores concentrações do JALEx (0,1 µg/mL e 0,01 µg/mL).

Citocinas são os principais produtos solúveis produzidos pelas células T CD4⁺ capazes de orquestrar diferentes padrões de proteção contra os patógenos. Nesse sentido, a evolução da infecção pelo HIV-1 para Aids está relacionada não apenas à queda na contagem de células T CD4⁺ circulantes, como também à perda numérica e funcional nos principais compartimentos envolvidos na proteção contra vírus, bactérias e fungos, as células Th1 e Th17 (MILNER; SANDLER; DOUEK, 2010; LYADOVA; PANTELEEV, 2015). A perda destas células é um evento precoce e antecede a queda na contagem de células T CD4⁺ circulantes, uma vez que envolve a morte em sítios específicos como as mucosas (DANDEKAR; GEORGE; BÄUMLER, 2010).

A morte desses linfócitos, principalmente das células Th17 em nível de mucosa, compromete a barreira imune contra a invasão microbiana a partir do intestino (MARCHETTI; TINCATI; SILVESTRI, 2013). As citocinas produzidas pelas células Th17 são importantes na produção de mucinas e peptídeos antimicrobianos pelas células epiteliais brônquicas e enterócitos (LYADOVA; PANTELEEV, 2015). Conseqüentemente, há maior translocação microbiana, o que contribui de forma significativa para o perfil inflamatório crônico observado nos pacientes que progridem para Aids (DANDEKAR; GEORGE; BÄUMLER, 2010). Esse perfil inflamatório prolongado pode comprometer a eficácia da TARV em controlar a replicação do HIV-1 nos tecidos linfóides associados à mucosa.

No presente estudo, nós observamos que a concentração de 0,1 µg/mL de JALEx foi capaz de elevar a porcentagem de células T CD4⁺ produtoras de IFN-γ, uma citocina classicamente produzida em resposta imunes coordenadas pelos linfócitos Th1 (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2015). A produção de IFN-γ por estes linfócitos é fundamental no combate de microrganismos intracelulares por ativar vias

microbicidas dos macrófagos e potencializar a função das células NK e CTL (LYADOVA; PANTELEEV, 2015). Ademais, o extrato de Janaúba, na mesma concentração, aumentou de forma significativa, a proporção de células T CD4⁺ IL-17⁺. A resposta imune sob coordenação dos linfócitos Th17 é essencial no combate a infecções por bactérias extracelulares e fungos por favorecer o recrutamento de neutrófilos para o local de infecção (MILNER; SANDLER; DOUEK, 2010; ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2015). Esses dados, apesar de serem preliminares, sugerem que o extrato alcoólico do látex da Janaúba pode ser um interessante adjuvante na reconstituição imune de pacientes infectados pelo HIV-1 submetidos à TARV.

Apesar da importância das células T CD4⁺, os linfócitos T CD8⁺ ativados (CTL), através de suas ações citotóxicas, são centrais no combate às infecções virais e neoplasias (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2015; DEMERS et al., 2016). Classicamente, essas CTL, por liberarem grandes quantidades de IFN- γ , são conhecidas como Tc1 (DOBRZANSKI; REOME; DUTTON, 2001; YEN et al., 2009), enquanto, as células T CD8⁺ que produzem IL-17, são conhecidas como Tc17 e possuem função citotóxica limitada (YEN et al., 2009). Apesar disto, as células Tc17 apresentam uma plasticidade funcional que as permite produzir IFN- γ enquanto perdem a expressão de IL-17 (GONZALEZ; TABORDA; RUGELES, 2017). De forma interessante, e à semelhança do que foi observado no compartimento das células T CD4⁺, o JALEx (0,1 μ g/mL) também elevou a percentagem de células T CD8⁺ capazes de produzir IFN- γ e IL-17. Esse resultado reforça a ampla ação imunoestimuladora do JALEx no compartimento da imunidade específica mediada pelas células T. No futuro, também será interessante avaliar o papel do JALEx em modular a função das células B.

O poder ativador imune do JALEx observado no presente estudo deve ser ainda potencializado pela não capacidade desse extrato em induzir IL-10. Sabe-se que a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória produzida, majoritariamente, por linfócitos T CD4⁺ reguladores (Treg) e tem como função principal limitar a resposta imune e a inflamação (MACATANGAY; RINALDO, 2010). Nos indivíduos infectados pelo HIV-1, um aumento da produção de IL-10 e da frequência de Treg em tecidos linfoides é observado, o que pode ser causado pela ligação desta célula à gp120 do vírus (JI; CLOYD, 2009). Essa ligação pode ser compreendida como um mecanismo

de inibir respostas imunes contra seus antígenos, facilitando sua permanência no hospedeiro. A contribuição desse aumento na frequência das Treg na infecção ainda é assunto de debate. Para alguns autores, expansão desses linfócitos, de fato, prejudica a resposta imune protetora contra o vírus (MACATANGAY; RINALDO, 2010). Para outros, a presença dessas células Treg ajuda a controlar o estado inflamatório crônico no qual o paciente é condicionado, que acelera tanto a imunosenescência quanto a replicação viral (O’GARRA et al., 2004; MACATANGAY; RINALDO, 2010).

A IL-10 exerce parte de seu efeito anti-inflamatório pela inibição do fator de transcrição NF- κ B, mecanismo pelo qual ela provavelmente suprime a produção de diferentes citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- α (WANG et al., 1995; DRIESSLER et al., 2004; HOVSEPIAN et al., 2013). Deste modo, é possível compreender porque a ativação da via da PKC e do NF- κ B pelo JALEx não resultou em variações significativas da IL-10. Nesse contexto, o potencial terapêutico do látex da Janaúba deve ser ponderado, pois, assim como o uso de citocinas para a reversão da latência viral, provocou um perfil inflamatório *in vitro* que pode ser crítico quando aplicado *in vivo* (WOLSCHEENDORF et al., 2012). Além disto, a proposta de erradicação da infecção pelo HIV-1 através da reativação da replicação viral deve estar associada à administração da TARV, que atuará no controle dessa replicação.

Em nossa opinião, o achado imunológico mais interessante foi o aumento na porcentagem de diferentes subtipos de células T CD4⁺ e T CD8⁺ capazes de produzir IL-21 em resposta ao JALEx. Apesar das células Th17 ativadas serem uma fonte importante de IL-21, essa citocina é particularmente secretada pelas células T CD4⁺ foliculares, T_{FH} (do inglês *follicular helper T*) (YI; INGRAM; ZAJAC, 2010; TIAN e ZAJAC, 2016). As células T_{FH} são fundamentais nas reações do centro germinativo dos folículos secundários de tecidos e órgãos linfoides responsáveis por dar suporte à resposta imune humoral mediada pelas células B (YI; INGRAM; ZAJAC, 2010). As interações entre as células T_{FH} e os linfócitos B são fundamentais para os fenômenos de hipermutação somática, troca da cadeia pesada na porção constante das imunoglobulinas e geração de plasmócitos e células B de memória (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2015). Portanto, a possibilidade do JALEx favorecer a produção anticorpos protetores é interessante e precisa ser investigada.

Ademais, a produção de IL-21 pelas células T tem sido inversamente relacionada à expressão de moléculas de exaustão clonal, como PD-1 e Tim-3, em pacientes cronicamente infectados pelo vírus da hepatite C (HCV, do inglês *hepatites C virus*) (YI; COX; ZAJAC, 2010; FENG et al., 2013), o que sugere manutenção de competência funcional. Finalmente, no contexto de infecções virais crônicas, tais como HCV e HIV-1, a presença de células T CD8⁺IL-21⁺ tem sido associada a um melhor desfecho da doença (YI; INGRAM; ZAJAC, 2010; YUE et al., 2010; FENG et al., 2013).

No presente estudo, conduzido com células de pacientes com Aids, uma correlação negativa foi observada entre a replicação do HIV-1 em culturas de CMSP estimuladas com JALEx (0,1 µg/mL) e a produção de IL-21. Não sabemos se essa relação inversa está associada à menor replicação viral e preservação das células T, a um papel da IL-21 em ajudar no controle da replicação viral, ou a ambos os fenômenos. Um aspecto importante a ser levado em consideração é a habilidade da IL-21 em excesso bloquear a expressão do marcador FoxP3 nas células Treg (LI; YEE, 2008), o que reduz a capacidade do indivíduo de controlar processos inflamatórios. Portanto, apesar de animadores, os atuais achados obtidos pelo nosso grupo são preliminares e devem ser investigados à luz do conhecimento sobre homeostase imune.

6. CONCLUSÕES

- ✓ O extrato alcóolico do látex da *Synadenium grantii*, popularmente conhecida como Janaúba, favoreceu a replicação viral em culturas de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com Aids;
- ✓ Este extrato, na concentração de 0,1 µg/mL, aumentou de modo significativo a produção de citocinas pró-inflamatórias e de citocinas relacionadas aos fenótipos de células Th1 e Th17 de linfócitos T CD4⁺ e também aos fenótipos Tc1 e Tc17 de linfócitos T CD8⁺;
- ✓ O JALEx aumentou a percentagem de diferentes subtipos celulares produtores de IL-21;
- ✓ A produção de IL-1β, IL-6 e TNF-α por CMSP, após estímulo com o JALEx, foi diretamente correlacionada à replicação viral enquanto a produção de IL-21 foi inversamente correlacionada a esta;
- ✓ Apesar de preliminares, os resultados obtidos sugerem um potencial efeito imunomodulador do JALEx e revelam a capacidade deste extrato em reativar a replicação do HIV-1 *in vitro*.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; ASTER, J. C.; KUMAR, V. Robbins e Cotran – Patologia Básica. Rio de Janeiro: Elsevier, 9ª edição, 2013.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILAI, S. Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Elsevier, 8ª edição, 2015.

AFONSO-CARDOSO, S. R.; SILVA, C. V.; FERREIRA, M. S.; SOUZA, M. A. Effect of the *Synadenium carinatum* latex lectin (ScLL) on *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection in murine macrophages. *Experimental Parasitology*, 128: 61–67, 2011.

AGOSTO, L. M.; GAGNE, M.; HENDERSON, A. J. Impact of chromatin on HIV replication. *Genes*, v. 6, n. 4, p. 957-976, 2015.

ANDERSEN, O. M.; JORDHEIM, M.; BYAMUKAMA, R.; MBABAZI, A.; OGWENG, G.; SKAAR, I.; KIREMIRE, B. Anthocyanins with unusual furanose sugar (apiose) from leaves of *Synadenium grantii* (Euphorbiaceae). *Phytochemistry*, 71(13): 1558-63, 2010.

ANSARI, A.; SILVESTRI, G. Natural Hosts of SIV: Implications in AIDS. In: SAUTER, D. e KIRCHHOFF, F.; *Properties of Human and Simian Immunodeficiency Viruses*. Elsevier, 1ª edição, cap.4, p, 69-84, 2014.

BANGS, S. C.; MCMICHAEL, A. J.; XU, X. N. Bystander T cell activation - implications for HIV infection and other diseases. *Trends in Immunology*, v. 27, n. 11, p. 518-524, 2006.

BARRE-SINOUSSE, F.; CHERMANN, J.C.; REY, F.; NUGEYRE, M.T.; CHAMARET, S.; GRUEST, J.; DAUGUET, C.; AXLER-BLIN, C.; VEZINET-BRUN, F.; ROUZIQUX, C.; ROZENBAUM, W.; MONTAGNIER, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science*, v. 220, n. 4599, p. 868-871. 1983.

BIN HAMID, F.; KIM, J.; SHIN, C.G. Cellular and viral determinants of retroviral nuclear entry. *Canadian Journal of Microbiology*. Ottawa, v. 62, n. 1, p. 1-15, 2016.

BITTNER, M.; ALARCÓN, J.; AQUEVEQUE, P.; BECERRA J.; HERNÁNDEZ, V.; HOENEISEN, M.; SILVA, M. Estudio químico de especies de La familia Euphorbiaceae em Chile. Boletín de la Sociedad Chilena de Química 46: 1-15, 2001.

BOSQUE, A.; PLANELLES, V. Induction of HIV-1 latency and reactivation in primary memory CD4+ T cells. Blood. 113(1):58-65, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 204/GM/MS, de 17 de fevereiro de 2016. Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 de fevereiro de 2016. Seção 1, página 23.

BRASIL. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos. Brasília, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Boletim Epidemiológico HIV/Aids. Brasília, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Manual Técnico para diagnóstico da infecção pelo HIV. Brasília, 2013.

CAMPOS, A.; VENDRAMINI-COSTA, D. B.; LONGATO, G. B.; ZERMIANI, T.; RUIZ, A. L.; DE CARVALHO, J. E.; PANDIELLA, A.; CECHINEL FILHO, V. Antiproliferative effect of *Synadenium grantii* Hook f. stems (Euphorbiaceae) and a Rare Phorbol Diterpene Ester. International Journal of Toxicology, 35(6), p. 666-71, 2016.

CHANG, T. L.; MOSOIAN, A.; PINE, R.; KLOTMAN, M. E.; MOORE, J. P. A Soluble Factor(s) Secreted from CD8+ T Lymphocytes Inhibits Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication through STAT1 Activation. Journal of Virology, v.76, n.2, p.569-81, 2002.

CHUN, T. W.; ENGEL, D.; MIZELL, S. B.; EHLER, L. A.; FAUCI, A. S. Induction of HIV-1 Replication in Latently Infected CD4+ T Cells Using a Combination of Cytokines. Journal of Experimental Medicine, v. 188, n. 1, p. 83-91, Jul 1 1998.

CHUN, T. W.; FINZI, D.; MARGOLICK, J.; CHADWICK, K.; SCHWARTZ, D.; SILICIANO, R. F. In vivo fate of HIV-1- infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nature Medicine* 1(12):1284– 90, 1995.

COCCHI, F.; DEVICO, A.L.; GARZINO-DEMO, A.; ARYA, S.K.; GALLO, R.C.; LUSSO, P. Identification of RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*, v. 270, n. 5243, p.1811-1815, 1995.

CONTRERAS, X.; LENASI, T.; PETERLIN, B. M. HIV latency: present knowledge, future directions. *Future Virology*, Londres, v. 1, n. 6, p. 733-745, 2006.

COSTA, L. L. G.; DAVID, V. C.; PINTO, R. M. C.; MINOZZO, B. R.; KOZLOWSKI JUNIOR, V. A.; CAMPOS, L. A.; SILVA, R. Z.; BELTRAME, F. L. Anti-ulcer activity of *Synadenium grantii* latex. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 22, n. 5, p. 1070-1078, 2012.

CUNHA, L. C.; AZEREDO, F. S.; MENDONÇA, A. C. V.; VIEIRA, M. S.; PUCCI, L. L.; VALADARES, M. C.; FREITAS, H. O. G.; SENA, A. A. S.; JUNIOR, R. S. L. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19: 403-411, 2009.

DANDEKAR, S.; GEORGE, M. D.; BÄUMLER, A. J. Th17 cells, HIV and the gut mucosal barrier: Current Opinion in HIV and AIDS. *Current Opinion in HIV and AIDS*, v. 5, n. 2, p. 173-178, 2010.

DAW, M. A.; EL-BOUZEDI, A.; AHMED, M. O.; DAU, A. A. Molecular and epidemiological characterization of HIV-1 subtypes among Libyan patients. *BMC Research Notes*, v.10, 2017.

DE CRIGNIS, E.; MAHMOUDI, T. HIV Eradication: Combinatorial Approaches to Activate Latent Viruses. *Viruses*, v.6, p.4581-608; 2014.

DECALF, J.; DESDOUITS, M.; RODRIGUES, V.; GOBERT, F. X.; GENTILI, M.; MARQUES-LADEIRA, S.; CHAMONTIN, C.; MOUGEL, M.; CUNHA DE ALENCAR,

B.; BENARROCH, P. Sensing of HIV-1 Entry Triggers a Type I Interferon Response in Human Primary Macrophages. In: (Ed.). *Journal of Virology*, v.91, 2017.

DEMERS, K. R.; MAKEDONAS, G.; BUGGERT, M.; ELLER, M. A.; RATCLIFFE, S. J.; GOONETILLEKE, N.; LI, C. K.; ELLER, L. A.; RONO, K.; MAGANGA, L.; NITAYAPHAN, S.; KIBUUKA, H.; ROUTY, J. P.; SLIFKA, M. K.; HAYNES, B. F.; MCMICHAEL, A. J.; BERNARD, N. F.; ROBB, M. L.; BETTS, M. R. Temporal Dynamics of CD8+ T Cell Effector Responses during Primary HIV Infection. In: (Ed.). *PLoS Pathogens*, v.12, 2016.

DIAZ, L.; MARTINEZ-BONET, M.; SANCHEZ, J.; FERNANDEZ-PINEDA, A.; JIMENEZ, J. L.; MUNOZ, E.; MORENO, S.; ALVAREZ, S.; MUNOZ-FERNANDEZ, M. A. Bryostatin activates HIV-1 latent expression in human astrocytes through a PKC and NF- κ B-dependent mechanism. *Scientific Reports*. 22;5:12442, 2015.

DOBRZANSKI, M. J.; REOME, J. B.; DUTTON, R. W. Immunopotentiating role of IFN-gamma in early and late stages of type 1 CD8 effector cell-mediated tumor rejection. *Clinical Immunology*, v. 98, n. 1, p. 70-84, 2001.

DRIESSLER, F.; VENSTROM, K.; SABAT, R.; ASADULLAH, K.; SCHOTTELIUS, A. J. Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF-kappaB activity: a role for p50. *Clinical e Experimental Immunology*, v. 135, n. 1, p. 64-73, 2004.

DUN, D.; SINGH, B.S.M. P. The family Euphorbiaceae in India: a synopsis of its profile, taxonomy and bibliography/ N.P. Balakrishnan: T. Chakrabarty, 2007.

EGGENA, M. P.; BARUGAHARE, B.; JONES, N.; OKELLO, M.; MUTALYA, S.; KITYO, C.; MUGYENYI, P.; CAO, H. Depletion of Regulatory T Cells in HIV Infection Is Associated with Immune Activation. *The Journal of Immunology*, n. 174, v. 7, p. 4407–4414, 2005.

EL-MEKKAWY, S.; MESELHY, M. R.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M.; KAWAHATA, T.; OTAKE, T. Anti-HIV-1 phorbol esters from the seeds of *Croton tiglium*. *Phytochemistry*, v. 53, n. 4, p. 457-464, 2000.

FENG, G.; ZHANG, J. Y.; ZENG, Q. L.; JIN, L.; FU, J.; YANG, B.; SUN, Y.; JIANG, T.; XU, X.; ZHANG, Z.; YUAN, J.; WU, L.; WANG, F. S. HCV-Specific Interleukin-

21+CD4+ T Cells Responses Associated with Viral Control through the Modulation of HCV-Specific CD8+ T Cells Function in Chronic Hepatitis C Patients. *Molecules and Cells*, v. 36, n. 4, p. 362-7, 2013.

FINZI, D.; BLANKSON, J.; SILICIANO, J. D.; MARGOLICK, J. B.; CHADWICK, K.; PIERSON, T.; SMITH, K.; LISZIEWICZ, J.; LORI, F.; FLEXNER, C.; QUINN, T. C.; CHAISSON, R. E.; ROSENBERG, E.; WALKER, B.; GANGE, S.; GALLANT, J.; SILICIANO, R. F. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nature medicine*. v. 5, n. 5, p. 512–517, 1999.

FLERIN, N. C.; CHEN, H.; GLOVER, T. D.; LAMOTHE, P. A.; ZHENG, J. H.; FANG, J. W.; NDHLOVU, Z. M.; NEWELL, E. W.; DAVIS, M. M.; WALKER, B. D.; GOLDSTEIN, H. T-Cell Receptor (TCR) Clonotype-Specific Differences in Inhibitory Activity of HIV-1 Cytotoxic T-Cell Clones Is Not Mediated by TCR Alone. In: (Ed.). *Journal of Virology*, v.91, 2017.

GAMBERINI, M. T. Atividades anti-úlceras e antiácidas do extrato aquoso e frações obtidas da *Baccharis trimera* Mart. (carqueja). Dissertação (Mestrado) – Instituto de Farmácia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

GEIJTENBEEK, T. B.; TORENSMA, R.; VAN VLIET, S. J.; VAN DUIJNHOFEN, G. C.; ADEMA, G. J.; VAN KOOYK, Y.; FIGDOR, C. G. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*, 100(5):575–85, 2000.

GONZALEZ, S. M.; TABORDA, N. A.; RUGELES, M. T. Role of Different Subpopulations of CD8+ T Cells during HIV Exposure and Infection. *Frontiers in Immunology*, v. 8, 2017.

GORRY, P. R.; ANCUTA, P. Coreceptors and HIV-1 pathogenesis. *Current HIV/AIDS Reports*, v. 8, n. 1, p. 45-53, 2011.

GRANDGENETT, D.P.; PANDEY, K.K.; BERA, S.; AIHARA, H. Multifunctional facets of retrovirus integrase. *World Journal of Biological Chemistry*. Hong Kong, v. 6, n. 3, p. 83-94, 2015.

HADRUP, S.; DONIA, M.; STRATEN, P. T. Effector CD4 and CD8 T Cells and Their Role in the Tumor Microenvironment. In: (Ed.). *Cancer Microenvironment*, v.6, p.123-33, 2013.

HASSAN, E. M.; MOHAMMED, M. M. D.; MOHAMED, S. M. Two New Phorbol-Type Diterpene Esters from *Synadenium grantii* Hook F. Leaves. *Records of Natural Products*, 6:3, p. 255-262, 2012.

HEMELAAR, J.; GOUWS, E.; GHYS, P. D.; OSMANOV, S. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *Aids*, v.25, n.5, p.679-89, 2011.

HOFFMANN, M.; PANTAZIS, N.; MARTIN, G.E.; HICKLING, S.; HURST, J.; MEYEROWITZ, J.; WILLBERG, C.B.; ROBINSON, N.; BROWN, H.; FISHER, M.; KINLOCH, S.; BABIKER, A.; WEBER, J.; NWONKOLO, N.; FOX, J.; FIDLER, S.; PHILLIPS, R.; FRATER, J. Exhaustion of activated CD8 T cells predicts disease progression in primary HIV-1 infection. *Plos Pathogen*. San Francisco, v. 12, n. 7, e1005661, 2016.

HOHMANN, J.; MOLNAR, J. [Euphorbiaceae diterpenes: plant toxins or promising molecules for the therapy?]. *Acta Pharmaceutica Hungarica*, v. 74, n. 3, p. 149-57, 2004.

HOVSEPIAN, E.; PENAS, F.; SIFFO, S.; MIRKIN, G. A.; GOREN, N. B. IL-10 Inhibits the NF- κ B and ERK/MAPK-Mediated Production of Pro-Inflammatory Mediators by Up-Regulation of SOCS-3 in *Trypanosoma cruzi*-Infected Cardiomyocytes. In: (Ed.). *PLoS One*, v.8, 2013.

HUANG, J.; WANG, F.; ARGYRIS, E.; CHEN, K.; LIANG, Z.; TIAN, H.; HUANG, W.; SQUIRES, K.; VERLINGHIERI, G.; ZHANG, H. Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4⁺ T lymphocytes. *Nature Medicine*. 13(10):1241-7, 2007.

IGARASHI, T.; IMAMICHI, H.; BROWN, C. R.; HIRSCH, V. M.; MARTIN, M. A. The emergence and characterization of macrophage-tropic SIV/HIV chimeric viruses (SHIVs) present in CD4⁺ T cell-depleted rhesus monkeys. *Journal of Leukocyte Biology*; 74(5):772–80, 2003.

INGOLE, N. A.; SARKATE, P. P.; PARANJPE, S. M.; SHINDE, S. D.; LALL, S. S.; MEHTA, P. R. HIV-2 Infection: Where Are We Today? In: (Ed.). *Journal of Global Infectious Diseases*, v.5, p.110-3, 2013.

JAGER, A. K. Screening of Zulu medicinal plants for prostaglandin-synthesis inhibitors. *Journal of Ethnopharmacology* v.52: p .95-100, 1996.

JAYARAMAN, B.; MAVOR, D.; GROSS, J.D.; FRANKEL, A.D. Thermodynamics of Rev-RNA interactions in HIV-1 Rev-RRE assembly. *Biochemistry*. Washington, v. 54, n. 42, p. 6545-6554, 2015.

JEENINGA, R. E.; WESTERHOUT, E. M.; VAN GERVEN, M. L.; BERKHOUT, B. HIV-1 latency in actively dividing human T cell lines. In: (Ed.). *Retrovirology*, v.5, p.37, 2008.

JI, J., CLOYD, M. W. HIV-1 binding to CD4 on CD4+CD25+ regulatory T cells enhances their suppressive function and induces them to home to, and accumulate in, peripheral and mucosal lymphoid tissues: an additional mechanism of immunosuppression. *International Immunology*, 21(3):283–294, 2009.

JIANG, G.; DANDEKAR, S. Targeting NF- κ B Signaling with Protein Kinase C Agonists As an Emerging Strategy for Combating HIV Latency. In: (Ed.). *AIDS Research and Human Retroviruses*, v.31, 2015. p.4-12, 2015.

JIN, H.; LI, D.; SIVAKUMARAN, H.; LOR, M.; RUSTANTI, L.; CLOONAN, N.; WANI, S.; HARRICH, D. Shutdown of HIV-1transcription in T cells by Nullbasic, a mutant Tat protein. *mBIO*. Washington, v. 7, n. 4, e00518-16, 2016.

JONES, R. B.; WALKER, B. D. HIV-specific CD8+ T cells and HIV eradication. *The Journal of Clinical Investigation*. New Haven, 126, n. 2, p. 455-463, 2016.

JOSÉ, D. P.; BARTHOLOMEEUSEN, K. ; DA CUNHA, R. D.; ABREU, C. M.; GLINSKI, J.; DA COSTA, T. B. F.; RABAY, A. F. M. B.; FILHO PIANOWSKI, L. F.; DUDY CZ, L. W.; RANGA, U.; PETERLIN, B. M.; PIANOWSKI, L. F.; TANURI, A.; AGUIAR, R. S. Reactivation of latent HIV-1 by new semi-synthetic ingenol esters. *Virology*, v. 462-463, p. 328-339, 2014.

KASLOW, R. A.; RIVERS, C.; TANG, J.; BENDER, T. J.; GOEPFERT, P. A.; HABIB, R.; WEINHOLD, K.; MULLIGAN, M. J.; MULLIGAN AND THE NIAID VACCINE EVALUATION GROUP. Polymorphisms in HLA class I genes associated with both favorable prognosis of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 infection and positive cytotoxic T-lymphocyte responses to ALVAC-HIV recombinant Canarypox vaccines. *Journal of Virology*, v. 75, n. 10, p. 8681-89, 2001.

KONVALINKA, J; KRÄUSSLICH, H.G.; MÜLLER, B. Retroviral proteases and their roles in virion maturation. *Virology*. Nova Iorque, v. 479-480, p. 403-417, 2015.

KUMAR, A.; ABBAS, W.; HERBEIN, G. HIV-1 Latency in Monocytes/Macrophages. In: (Ed.). *Viruses*, v.6, p.1837-60, 2014.

LEVY, J.A. *HIV and the Pathogenesis of AIDS*. 3rd ed. Washington: ASM Press; 2007.

LEVY, J.A. Virus-host interactions in HIV pathogenesis: directions for therapy *Advances in Dental Research*..; 23(1):13-8. 2011.

LI, Y.; YEE, C. IL-21-mediated Foxp3 suppression leads to enhanced generation of antigen-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes. In: (Ed.). *Blood*, v.111, p.229-35, 2008.

LIEBERMAN, J.; SHANKAR, P.; MANJUNATH, N.; ANDERSSON, J. Dressed to kill? A review of why antiviral CD8 T lymphocytes fail to prevent progressive immunodeficiency in HIV-1 infection. *Blood*, v. 98, n. 6, p. 1667-1677, 2001.

LJUNGGREN, K.; BROLIDEN, P. A.; MORFELDT-MANSON, L.; JONDAL, M.; WAHREN, B. IgG subclass response to HIV in relation to antibody-dependent cellular cytotoxicity at different clinical stages. *Clinical e Experimental Immunology*, v. 73, n. 3, p. 343-7, 1988.

LU, W.; MEHRAJ, V.; VYBOH, K.; CAO, W.; LI, T.; ROUTY, J. P. CD4:CD8 ratio as a frontier marker for clinical outcome, immune dysfunction and viral reservoir size in virologically suppressed HIV-positive patients. In: (Ed.). *Journal of the International AIDS Society*, v.18, 2015.

LUZ, L. E. C.; PALUDO, K. S.; SANTOS, V. L. P.; FRANCO, C. R. C.; KLEIN, T.; SILVA, R. Z.; BELTRAME, F. L.; BUDEL, J. M. Cytotoxicity of latex and pharmacobotanical study of leaves and stem of *Euphorbia umbellata* (Janaúba). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 25, n. 4, p. 344-352, 2015.

LYADOVA, I. V.; PANTELEEV, A. V. Th1 and Th17 Cells in Tuberculosis: Protection, Pathology, and Biomarkers. *Mediators of Inflammation*, 2015.

MACATANGAY, B. J.; RINALDO, C. R. Regulatory T cells in HIV immunotherapy. *Journal of HIV Therapy*, v. 4, n. 6, p. 639-47, 2010.

MACHADO, A. A. Caracterização fitoquímica e avaliação da citotoxicidade de *Synadenium carinatum* Boiss (Euphorbiaceae). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2008.

MAK, T. W.; SAUNDERS, M. E. *The Immune Response*. Amsterdã: Elsevier, 1ª edição, 2006.

MANCHES, O.; FRLETA, D.; BHARDWAJ, N. Dendritic cells in progression and pathology of HIV infection. *Trends in Immunology*. v. 35, n. 3, p. 114-22, 2014.

MANGINO, G.; PERCARIO, Z. A.; FIORUCCI, G.; VACCARI, G.; ACCONCIA, F.; CHIARABELLI, C.; LEONE, S.; NOTO, A.; HORENKAMP, F. A.; MANRIQUE, S.; ROMEO, G.; POLTICELLI, F.; GEYER, M.; AFFABRIS, E. HIV-1 Nef Induces Proinflammatory State in Macrophages through Its Acidic Cluster Domain: Involvement of TNF Alpha Receptor Associated Factor 2. *PLoS One*, v.6, n.8, 2011.

MARCHETTI, G.; TINCATI, C.; SILVESTRI, G. Microbial Translocation in the Pathogenesis of HIV Infection and AIDS. In: (Ed.). *Clinical Microbiology Reviews*, v.26, p.2-18, 2013.

MARTINS, M. M.; LUCARELLI, A. P.; OLIVEIRA, J. S.; MONTOR, W. R. *Synadenium grantii* e o câncer de mama. *Arquivos Médicos dos Hospitais das Faculdades de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo*, 62(2): 98-101, 2017.

MATTEI, S.; ANDERS, M.; KOVALINKA, J.; KRÄUSSLICH, H.G.; BRIGGS, J.A.G.; MÜLLER, B. Induced maturation of human immunodeficiency virus. *Journal of Virology*. v. 88, n. 23, p. 13722-13731, 2014.

McMAHON, C. W.; RAULET, D. H. Expression and function of NK cell receptors in CD8+T cell. *Current Opinion in Immunology*, v. 13, n. 4, p. 465-470, 2001.

McMICHAEL, A. J.; BORROW, P.; TOMARAS, G. D.; GOONETILLEKE, N.; HAYNES, B. F. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nature Reviews Immunology*. v. 10, n. 1, p. 11-23, 2010.

MELO-REIS, PR; ANDRADE, LS; SILVA, CB; ARAUJO, LMM; PEREIRA, MS.; MRUE, F.; CHEN-CHEN, L. Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex. *Brazilian Journal of Biology*. v. 70, p. 189-94, 2010.

MILNER, J. D.; SANDLER, N. G.; DOUEK, D. C. Th17 cells, Job's syndrome and HIV: opportunities for bacterial and fungal infections. *Current Opinion in HIV and AIDS*, v. 5, n. 2, p. 179-183, 2010.

MOIR, S.; FAUCI, A. S. B cell responses to HIV infection. *Immunological Reviews*, v.275, n.1, p.33-48, 2017.

MOUSSEAU, G.; MEDIOUNI, S.; VALENTE, S.T. Targeting HIV transcription: The quest for a functional cure. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Berlin, v. 389, p. 121-145, 2015.

MUNHOZ, A. C.; MINOZZO, B. R.; CRUZ, L. S.; OLIVEIRA, T. L.; MACHADO, W. M.; PEREIRA, A. V.; FERNANDES, D.; MANENTE, F. A.; VELLOSA, J. C.; NEPEL, A.; BARISON, A.; BELTRAME, F. L. Chemical and pharmacological investigation of stem bark of *Synadenium grantii*. *Planta Medica*, 80(6): p. 458-64, 2014.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. *Imunobiologia de Janeway*. Porto Alegre: ArtMed, 7ª edição. 2010.

NOGUEIRA, I. A. L.; LEÃO, A. B. B.; VIEIRA, M. S.; BENFICA, P. L.; CUNHA, L. C.; VALADARES, M. C. Antitumoural and antiangiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax. *Journal of Ethnopharmacology* 120, 474–478, 2008.

O'BRIEN, M.; MANCHES, O.; BHARDWAJ, N. Plasmacytoid Dendritic Cells in HIV Infection. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 762, p. 71-107, 2013.

O'GARRA, A.; VIEIRA, P. L.; VIEIRA, P.; GOLDFELD, A. E. IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. In: (Ed.). Journal of Clinical Investigation, v.114, p.1372-8, 2004.

ORTÊNCIO, W. B. Medicina popular do Centro-Oeste. 2. ed. Brasília, Thesaurus, 1997.

PAIARDINI, M.; MÜLLER-TRUTWIN, M. HIV-associated chronic immune activation. Immunological Reviews, v. 254, n. 1, p. 78-101, 2013.

PALMISANO, L.; VELLA, S. A brief history of antiretroviral therapy of HIV infection: success and challenges. Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita, v. 47, n. 1, p. 44-8, 2011.

PAU, A. K.; GEORGE, J. M. Antiretroviral Therapy: Current Drugs. Infectious Disease Clinics of North America, v. 28, n. 3, p. 371-402, 2014.

PEREZ-CABALLERO, D.; ZANG, T.; EBRAHIMI, A.; MCNATT, M. W.; GREGORY, D. A.; JOHNSON, M. C.; BIENIASZ, P. D. Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells. Cell, v. 139, n. 3, p. 499-511, 2009.

PREMARATNA, A.; SHADAKSHARASWAMY, M.; NANJAPPA, S. S. Isolation, purification and properties of a lectin from the latex of *Synadenium grantii* Hook F.. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics v. 18 p. 32-35, 1981.

RAJESH, R.; NATARAJU, A.; GOWDA, C. D. R.; FREY, B. M.; FREY, F. J.; VISHWANATH, B. S. Purification and characterization of 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot. Biochemistry 88: 1313-1322, 2006.

RAN, X.; AO, Z.; YAO, X. Apobec3G-Based Strategies to Defeat HIV Infection. Current HIV Research, v. 14, n. 3, p. 217-24, 2016.

REIS, M. N. G.; BELLO, G.; GUIMARAES, M. L.; STEFANI, M. M. A. Characterization of HIV-1 CRF90_BF1 and putative novel CRFs_BF1 in Central West, North and Northeast Brazilian regions. In: (Ed.). PLoS One, v.12, 2017.

RHODUS, N. L.; CHENG, B.; MYERS, S.; MILLER, L.; HO, V.; ONDREY, F. The feasibility of monitoring NF-kappaB associated cytokines: TNF-alpha, IL-1alpha, IL-6,

and IL-8 in whole saliva for the malignant transformation of oral lichen planus. *Molecular Carcinogenesis*, v. 44, n. 2, p. 77-81, 2005.

RICHARDS, C. M.; LI, M.; PERKINS, A. L.; RATHORE, A.; HARKI, D. A.; HARRIS, R. S. Reassessing APOBEC3G Inhibition by HIV-1 Vif-Derived Peptides. *Journal of Molecular Biology*, v. 429, n. 1, p. 88-96, 2017.

RODRIGUEZ-PLATA, M. T.; URRUTIA, A.; CARDINAUD, S.; BUZON, M. J.; IZQUIERDO-USEROS, N.; PRADO, J. G.; PUERTAS, M. C.; ERKIZIA, I.; COULON, P. G.; CEDENO, S.; CLOTET, B.; MORIS, A.; MARTINEZ-PICADO, J. HIV-1 Capture and Antigen Presentation by Dendritic Cells: Enhanced Viral Capture Does Not Correlate with Better T Cell Activation. *Journal of Immunology*, v.188, n.12, p.6036-45, 2012.

ROGÉRIO, A. P.; CARDOSO, C. R.; FONTANARI, C.; SOUZA, M. A.; AFONSO-CARDOSO, S. R.; SILVA, E. V. G.; KOYAMA, N. S.; BASEI, F. L.; SOARES, E. G.; CALIXTO, J. B.; STOWELL, S. R.; BARUFFI, M. D.; FACCIOLI, L. H. Anti-asthmatic potential of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. *Glycobiology* 17: 795-804, 2007.

SACHDEVA, N.; ASTHANA, V.; BREWER, T. H.; GARCIA, D.; ASTHANA, D. Impaired restoration of plasmacytoid dendritic cells in HIV-1-infected patients with poor CD4 T cell reconstitution is associated with decrease in capacity to produce IFN- α but not proinflammatory cytokines. *The Journal of Immunology*, v. 181, n. 4, p. 2887-97, 2008.

SAINZ, T.; SERRANO-VILLAR, S.; DIAZ, L.; GONZALEZ TOME, M. I.; GURBINDO, M. D.; DE JOSE, M. I.; MELLADO, M. J.; RAMOS, J. T.; ZAMORA, J.; MORENO, S.; MUNOZ-FERNANDEZ, M. A. The CD4/CD8 ratio as a marker T-cell activation, senescence and activation/exhaustion in treated HIV-infected children and young adults. *AIDS*. v.27, n.9, p.1513-6, 2013.

SANTOS, N. S. de O.; ROMANOS, R. T. V.; WIGG, M. D. *Virologia Humana*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 3ª edição, 2015.

SCHWARTZ, O.; MARECHAL, V.; LE GALL, S.; LEMONNIER, F.; HEARD, J. M. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nature Medicine*, v.2, n. 3, p. 338-42, 1996.

SCRIPTURE-ADAMS, D. D.; BROOKS, D. G.; KORIN, Y. D.; ZACK, J. A. Interleukin-7 induces expression of latent human immunodeficiency virus type 1 with minimal effects on T-cell phenotype. *Journal of Virology*, 76 (24):13077–82, 2002.

SEITZ, R. Human Immunodeficiency Virus (HIV). In: (Ed.). *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, v.43, p.203-22, 2016.

SHAROVA, N.; SWINGLER, C.; SHARKEY, M.; STEVENSON, M. Macrophages archive HIV-1 virions for dissemination in trans. *The EMBO Journal*, 24(13):2481–9, 2005.

SMALLS-MANTEY, A.; DORIA-ROSE, N.; KLEIN, R.; PATAMAWENU, A.; MIGUELES, S. A.; KO, S. Y.; HALLAHAN, C. W.; WONG, H.; LIU, B.; YOU, L.; SCHEID, J.; KAPPES, J. C.; OCHSENBAUER, C.; NABEL, G. J.; MASCOLA, J. R.; CONNORS, M. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity against Primary HIV-Infected CD4+ T Cells Is Directly Associated with the Magnitude of Surface IgG Binding. *Journal of Virology*, v. 86, n. 16, p. 8672-80, 2012.

SOUSA, R.; CHUNG, Y. J.; ROSE, J. P.; WANG, B. C. Crystal structure of bacteriophage T7 RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Nature*. 364(6438):593-9, 1993.

SOUZA, M. A.; PEREIRA, F. A.; CARDOSO, C. R. B.; SILVA, A. G.; SILVA, E. G.; ANDRADE, L. R.; PENA, J. D. O.; LANZA, H.; AFONSO-CARDOSO, S. R. Isolation and partial characterization of D-galactose-binding lectin from the latex of *Synadenium carinatum*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48: 705-716, 2005.

STINCHCOMBE, J. C.; GRIFFITHS, G. M. The role of the secretory immunological synapse in killing by CD8+ CTL. *Seminars in Immunology*, 2003.

SUN, H.; KIM, D.; LI, X.; KISELINOVA, M.; OUYANG, Z.; VANDEKERCKHOVE, L.; SHANG, H.; ROSENBERG, E. S.; YU, X. G.; LICHTERFELD, M. Th1/17 Polarization

of CD4 T Cells Supports HIV-1 Persistence during Antiretroviral Therapy. *Journal of Virology*, v. 89, n. 22, p. 11284-11293, 2015.

TABAH, A. A.; TARDIF, K.; MANSKY, L. M. Anti-HIV-1 activity of Trim 37. In: (Ed.). *Journal of General Virology*, v.95, p.960-7, 2014.

TAKAHASHI K.; WESSELINGH S.L.; GRIFFIN, D.E.; MCARTHUR, J.C.; JOHNSON, R.T.; GLASS, J.D. Localization of HIV-1 in human brain using polymerase chain reaction/in situ hybridization and immunocytochemistry. *Annals of Neurology* 39(6):705–11, 1996.

TANTISIRIWAT, W., POWDERLY, W.G. Prophylaxis and treatment of opportunistic infection in patients on HAART. *The AIDS Read*. Nova Iorque, v. 9, n.2, p. 122-30, 1999.

TIAN, Y.; ZAJAC, A. J. IL-21 and T cell differentiation: consider the context. *Trends in Immunology*, v. 37, n. 8, p. 557-68, 2016.

TRIPATHY, M. K.; ABBAS, W.; HERBEIN, G. Epigenetic regulation of HIV-1 transcription. *Epigenomics*, v. 3, n. 4, p. 487-502, 2011.

TSAI, J. Y.; REDEI, D.; FORGO, P.; LI, Y.; VASAS, A.; HOHMANN, J.; WU, C. C. Isolation of Phorbol Esters from *Euphorbia grandicornis* and Evaluation of Protein Kinase C- and Human Platelet-Activating Effects of Euphorbiaceae Diterpenes. *Journal of Natural Products*, v. 79, n. 10, p. 2658-2666, 2016.

TURVILLE, S. G.; CAMERON, P. U.; HANDLEY, A.; LIN, G.; PÖHLMANN, S.; DOMS, R.W.; CUNNINGHAM, A. L. Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nature Immunology*; 3(10):975-83, 2002.

UNAIDS, UNAIDS DATA 2017, Disponível em: <http://www.unaids.org/en/resources/documents/2017/2017_data_book>. Acessado em: 26/02/2018.

UZABAKILIHOC, B.; LARGEAU, C.; CASADWALL, E. Latex constituents of *Euphorbia candelabrum*, *E. grantii*, *E. tirucalli* and *Euphorbia umbellatai*, *Phytochemistry* 26, 3041–3045, 1987.

- VALADARES, M. C.; CASTRO, N. C.; CUNHA, L. C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 43: 631-638, 2007.
- VALDIVIA, A.; LY, J.; GONZALEZ, L.; HUSSAIN, P.; SAING, T.; ISLAMOGLU, H.; PEARCE, D.; OCHOA, C.; VENKETARAMAN, V. Restoring Cytokine Balance in HIV-Positive Individuals with Low CD4 T Cell Counts. In: (Ed.). *AIDS Research and Human Retroviruses*, v.33, p.905-18, 2017.
- VAN DER SLUIS, R. M.; VAN MONTFORT, T.; POLLAKIS, G.; SANDERS, R. W.; SPEIJER, D.; BERKHOUT, B.; JEENINGA, R. E. Dendritic Cell-induced Activation of Latent HIV-1 Provirus in Actively Proliferating Primary T Lymphocytes. In: (Ed.). *PLoS Pathogens*, v.9, 2013.
- VIARD, J. P.; MOCROFT, A.; CHIESI, A.; KIRK, O.; ROGE, B.; PANOS, G.; VETTER, N.; BRUUN, J. N. Influence of age on CD4 cell recovery in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy: evidence from the EuroSIDA study. *The Journal of Infectious Diseases*. Chicago, v. 183, p. 1290–1294, 2001.
- VICENZI, E.; POLI, G. Novel factors interfering with human immunodeficiency virus-type 1 replication in vivo and in vitro. *Tissue Antigens*, 81(2):61-71, 2013.
- VON BREDOW, B.; ARIAS, J. F.; HEYER, L. N.; MOLDT, B.; LE, K.; ROBINSON, J. E.; ZOLLA-PAZNER, S.; BURTON, D. R.; EVANS, D. T. Comparison of Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity and Virus Neutralization by HIV-1 Env-Specific Monoclonal Antibodies. In: (Ed.). *Journal of Virology*, v.90, p.6127-39, 2016.
- WALKER, N. F.; SCRIVEN, J.; MEINTJES, G.; WILKINSON, R. J. Immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-infected patients. In: (Ed.). *HIV AIDS (Auckl)*, v.7, p. 49-64, 2015.
- WANG, P.; LU, P.; QU, X.; SHEN, Y.; ZENG, H.; ZHU, X.; ZHU, Y.; LI, X.; WU, H.; XU, J.; LU, H.; MA, Z.; ZHU, H. Reactivation of HIV-1 from Latency by an Ingenol Derivative from *Euphorbia Kansui*. In: (Ed.). *Scientific Reports*, v.7, 2017.

WANG, P.; WU, P.; SIEGEL, M. I.; EGAN, R. W.; BILLAH M. M. Interleukin (IL)-10 Inhibits Nuclear Factor B (NFB) Activation in Human Monocytes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 16, p. 9558-63, 1995.

WENDER, P. A.; KEE, J.-M.; WARRINGTON, J. M. Practical Synthesis of Prostratin, DPP, and Their Analogs, Adjuvant Leads Against Latent HIV. *Science*, v. 320, n. 5876, p. 649-52, 2008.

WILLIAMS, S. A.; CHEN, L. F.; KWON, H.; FENARD, D.; BISGROVE, D.; VERDIN, E.; GREENE, W. C. Prostratin antagonizes HIV latency by activating NF-kappaB. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(40):42008–17, 2004.

WOLSCHEENDORF, F.; BOSQUE, A.; SHISHIDO, T.; DUVERGER, A.; JONES, J.; PLANELLES, V.; KUTSCH, O. Kinase Control Prevents HIV-1 Reactivation in Spite of High Levels of Induced NF- κ B Activity. In: (Ed.). *Journal of Virology*, v.86, 2012.

XIAO, P.; LI, J.; FU, G.; ZHOU, Y.; HUAN, X.; YANG, H. Geographic Distribution and Temporal Trends of HIV-1 Subtypes through Heterosexual Transmission in China: A Systematic Review and Meta-Analysis. In: (Ed.). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v.14, 2017.

YEN, H. R.; HARRIS, T. J.; WADA, S.; GROSSO, J. F.; GETNET, D.; GOLDBERG, M. V.; LIANG, K. L.; BRUNO, T. C.; PYLE, K. J.; CHAN, S. L.; ANDERS, R. A.; TRIMBLE, C. L.; ADLER, A. J.; LIN, T. Y.; PARDOLL, D. M.; HUANG, C. T.; DRAKE, C. G. Tc17 CD8 T cells: functional plasticity and subset diversity. *Journal of Immunology*, 183(11):7161-8, 2009.

YI, J. S.; COX, M. A.; ZAJAC, A. J. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology*, v. 129, n.4, p.474-81, 2010.

YI, J. S.; INGRAM, J. T.; ZAJAC, A. J. IL-21 deficiency influences CD8 T cell quality and recall responses following an acute viral infection. *Journal of Immunology*, 185(8):4835-45, 2010.

YUE, F. Y.; LO, C.; SAKHDARI, A.; LEE, E. Y.; KOVACS, C. M.; BENKO, E.; LIU, J.; SONG, H. HIV-specific IL-21 producing CD4+ T cells are induced in acute and

chronic progressive HIV infection and are associated with relative viral control. *Journal of Immunology*, v. 185, n. 1, p. 498-506, 2010.

ZHANG, J. Y.; ZHANG, Z.; WANG, X.; FU, J. L.; YAO, J.; JIAO, Y.; CHEN, L.; ZHANG, H.; WEI, J.; JIN, L.; SHI, M.; GAO, G. F.; WU, H.; WANG, F. S. PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8⁺ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood*, v. 109, n. 11, p. 4671-4678, 2007.

8. ANEXO

O artigo a seguir, contendo parte dos resultados deste trabalho, foi submetido à publicação.

Reactivation of latent HIV-1 *in vitro* using an alcoholic extract from *Euphorbia umbellata* (Euphorbiaceae) latex.

Ana Valadão¹, Paula Pezutto¹, Viviane A. Oliveira Silva², Barbara Simonson Gonçalves³, Átala D. Rossi¹, Rodrigo Delvechio¹, Antonio Carlos Siani⁴, João Batista de Freitas Tostes⁴, Marcelo Trovó⁵, Paulo Damasco³, Gabriel Gonçalves¹, Rui Manuel Reis^{6,7}, Renato Santana¹, Cleonice Alves de Melo Bento³, Amilcar Tanuri^{1*}

¹Laboratory of Molecular Virology , Department of Genetics, IB, Federal University of Rio de Janeiro; ²Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Barretos, Brazil; ³Department of Microbiology and Parasitology and General Medicine Department/UNIRIO; ⁴Department of Natural Products, Institute of Drug Technology, Oswaldo Cruz Foundation;⁵ Departamento de Botânica, IB, Federal University of Rio de Janeiro ; Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Medicine, University of Minho, Braga, Portugal⁶; ICVS/3B's – PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal⁷.

* Corresponding Author

Amilcar Tanuri, Laboratory of Molecular Virology , Department of Genetics, IB, Federal University of Rio de Janeiro. Av. Carlos Chagas Filho 373, CCS, Bloco A, Sala 121 Cidade Universitária, CEP: 21941-902 Rio de Janeiro - RJ, Brasil. Email: atanuri1@gmail.com

Abstract

Euphorbia umbellata (*E. umbellata*) belongs to Euphorbiaceae family popularly known in Brazil as Janauba and contains in its latex a combination of phorbol esters with a strong affinity to different PKC isoforms. In this work we could show the presence of 4 deoxi-phorbol esters able to reactivate HIV latency through nuclear interiorization of NFκB and activation of HIV LTR promoter. Our *E. umbellata* latex could activate the latent HIV in human PBMCs isolated from HIV+ patients under HAART therapy showing virological suppression. The same way our extract could reactivate latent SIV in non-human primate primary CD4 lymphocytes in in vitro assays. These results strongly indicate that the phorbol esters present in *S. grantii* latex are good candidate compounds for future clinical trials for HIV eradication.

INTRODUCTION

The Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) is caused by the Human Immunodeficiency Virus (HIV), which was identified in 1983(1,2) from patients with AIDS and at risk for AIDS. In those 34 years of the pandemic, more than 20 million people died from AIDS-related causes, and by 2011 more than 34 million people were infected with HIV (UNAIDS, 2017 see in http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/20170720_Data_book_2017_en.pdf).

The pandemic of HIV infection is an important socioeconomic burden and is considered one of the largest documented epidemics in history. The pathogenesis of HIV infection involves infection and replication in CD4 + T lymphocytes, macrophages and dendritic cells. Replication and destruction of CD4 + T cells, which are key effector cells in the host immune response, leads to a clinical picture of immunosuppression known as AIDS(3).

The current strategy used in the treatment of HIV infection is called Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART), which is based on a combination of antiretroviral drugs, which target different stages of the HIV replicative cycle. The primary goal of HAART is to block viral replication and slow down the progression of immunodeficiency, restoring, immunity, to improve the quality of life of the infected person (8). Although HAART allow these HIV+ individuals to live relatively normal lives, these patients continue to suffer from immunological, neurological, and metabolic co-morbidities associated with HIV infection (9).

Even when an undetectable viral load is achieved with effective HAART therapy, it is possible to detect latent viral reservoirs where HIV proviral DNA remains at rest on memory CD4 + T cells and are responsible for some degree of chronic activation of the immune system (10). These cells containing latent viral genomes become viral reservoirs inaccessible to HAART that can only act on actively replicating viruses. Once HAART is stopped, viral load increases rapidly, and systemic infection reestablishes (11). Therefore, the complete eradication of HIV from an infected individual is one of the most challenging areas of HIV research today.

New latent virus reactivating compounds also called latency reactivating agents (LRA) when utilized in conjunction with HAART may be capable to eliminate transcriptionally inactive viruses, ultimately resulting in the eradication of HIV infection. This strategy is called *shock and kill* and it postulates that memory CD4 + lymphocytes treated with LRA along with HAART could purge totally or partially the viral reservoir while blocking replication of emergent latent virus, leading to a HIV eradication or at least a functional cure (12).

Different molecules with therapeutic potential have been reported as possible candidates for elimination of viral reservoirs. Among these agents we highlight the action of so-called Protein Kinase C (PKC) agonists (10). This class of molecules, we can mention Prostratin (13), Bryostatin (14), Ingenol (15) and Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA;16). These compounds can reactivate latent HIV in lymphoid and myeloid cells and also reactivate CD4 and CD8 lymphocytes. Although several transcriptional regulatory mechanisms for HIV latency have been described in the context of epigenetic silencing and "repression", recent work suggests that reactivation of latent HIV is positively

correlated with cellular and NF- κ B activation, demonstrating the importance of this factor in latency reactivation (17).

Many natural compounds have been investigated for their antiviral and latency-reversing properties, with some even being indicated as candidates for clinical trials. Among these compounds, many are derived from the secondary metabolism of plants, such as terpenoids (18), polyphenols (19), alkaloids (20) and phorbol esters (21). Among these plants, the Euphorbiaceae family is found worldwide spread and has been used by traditional healers for the treatment of several diseases(22-26). *Euphorbia umbellata* belongs to Euphorbiaceae family and it is popularly known in Brazil as Janauba or *leiteirinha* and is used, in traditional medicine, as a latex preparation (diluted in water) for the treatment of gastric disorders, such as peptic ulcer and gastritis, as well as neoplastic diseases, allergy, diabetes, influenza, and leprosy among other diseases (27). Several papers have reported the isolation of lectins, phorbols, terpenes, flavonoids and other phenolic compounds from *E. umbellata* latex (28, 29, 30). This plant contains phorbol esters in its latex similar to PMA isolated from the seeds of *Croton tiglium*, another representative of the Euphorbiaceae family. These compounds are efficient in inhibiting the cytopathic effect generated by HIV infection on lymphocyte cells, as well as activating protein kinase C (PKC), which together with nuclear translocation of NF- κ B are important for the reactivation of HIV latency (31).

In this work we evaluated the ability of an alcoholic extract obtained from Janauba latex to reactivate latent HIV and investigated the molecular mechanisms involved in this process and its direct action on *ex vivo* human PBMC HIV- cell cultures as well CD4 Lymphocytes isolated from SIV infected non-human-primates.

MATERIAL AND METHODS

from *Euphorbia umbellata*. *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns, the current accepted name for *Synadenium grantii* Hook.f., was collected and identified with the respective voucher specimen kept at the RFA Herbarium under the number Trovó, M.L.O 764. The crude latex was collected directly from incision mechanically made in the trunk of cultivated specimens in the Barretos, São Paulo state, Brazil. The latex was straightly diluted in 80% ethanol (1:10 v/v) to produce a white rubber-like precipitate that was filtered off by gravity in filter paper. The filtrate was dried in a rotary evaporator to afford a fine white powder, which was diluted in DMSO to attain the fix concentration of 20 mg/mL to provide the stock for cell testing. This extract material was labeled as **JALEx** (Janaúba Alcoholic Latex Extract). **JALEx** was chromatographed in a silica gel column using a solvent gradient (0-5%) of ethyl ether in chloroform to enrich the phorbol-containing fractions and favor their detection and characterization in the same GC conditions of **JALEx** analysis.

Chemical profile of JALEx. **JALEx** was analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) by using an Agilent 6890N chromatograph (Palo Alto, CA) equipped with a capillary column DB-H17HT (30 m × 0.25 mm × 0.15 µm film thickness). Helium was the carrier gas at 1.0 mL/min and inlet pressure of 3.14 psi, 10:1 split/splitless ratio. The oven temperature programmed from 150°C to 340°C at 4°C/min and then held for 17 minutes. The injection volume was 1 µL of a 2 mg/mL chloroform solution. Data were processed using MSD Productivity Chem Station Software operating with ion source at 250°C and electron impact ionization at 70 eV. Individual components were characterized by their fragmentation patterns in the mass spectra.

Analysis of the reactivation potential of latent HIV after treatment with JALEx. Human lymphocyte cell line models for the latency study (J-Lat 8.4 and 10.6) were used. These cells are derived from Jurkat cells, which have integrated into their genome, the modified HIV genome, containing an open reading frame for encoding the GFP protein substituting the viral nef gene. These cells, J-Lat 8.4 and 10.6, have different levels of reactivation capacity, depending on the site of integration of the HIV genome. In this way, J-Lat 10.6 is a more responsive cell than J-Lat 8.4, always showing reactivation levels higher than those observed by strain 8.4. J-Lat cells are cultured in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin / streptomycin antibiotics. J-Lat cells at density of 10⁵ cells in wells of the 24-well plate were treated with different concentrations of **JALEx** dissolved in DMSO over a 24-hour period. After this interval, cells were analyzed for flow cytometric reading (BD Accuri C6) for GFP expression. Positive controls for reactivation of

latent virus were either ingenolB (0.32 μ M), or PMA(1 μ M). This assay was performed in three independent experiments.

Analysis of the cytotoxicity of natural extracts by viability dye. Evaluation of the cytotoxicity of the compounds was performed by incubating J-Lat cells (clones 8.4 and 10.6) with the dilutions of the compounds previously tested in the reactivation assays. The cell viability assessment was performed on 96-well plates in three independent experiments, each in six-fold, with each well containing 10^4 cells. After 5 days of culture, vital resazurin dye (CellTiter Blue, Promega) was added which, when metabolized by cells that were alive, would become another byproduct, resorufin, of pink color that emits fluorescence which is therefore measured in Fluorimeter (Glomax).

Analysis of the activation of PKCs. To assess the mechanism of action of HIV latency reactive by Janauba compounds, J-Lats cells at the density of 10^5 cells per well of the 24-well plate were treated with different specific inhibitors of PKC α , PKC δ and PKC γ isoforms Go6976, Go6983, Ro-31-8220, respectively for 24 hours (32-34). After this time, cells were treated with the positive control of PKC activation (1 μ MPMA) and two concentrations of **JALEx** previously determined in the reactivation and cytotoxicity assays. Untreated cells were referred to as MOCK. The following concentrations of the alcoholic extract were tested: 0.01 μ g / mL and 0.001 μ g / mL and the percentage of GFP positive cells was assessed by flow cytometry, from the reactivation of HIV integrated into the J-Lats genome.

In addition, the PKC activation was evaluated by immunofluorescences to detect cell relocation of different PKC isoforms. For this, HeLa cells were plated at the density of 10^4 cells per well of 96-well black bottomed glass bottom plates. These cells were transfected with three different plasmids encoding three PKC isoforms fused to GFP (PKC α -GFP, PKC δ -GFP and PKC γ -GFP) for 24 hours and then treated with 1 μ g / mL and 0.1 μ g / mL of the **JALEx**, for 10 minutes or 24 hours. Cells were visualized in a fluorescence confocal microscope (Molecular Devices, Inc) and the redistribution of PKC isoforms was evaluated.

Phosphorylation of some PKC isoforms was also investigated in order to better analyze its activation pathway. For this, Jurkat cells were treated with 0.01 μ g / mL and 0.001 μ g / mL of chloroform extract and with 1 μ M PMA as a positive control of PKC phosphorylation for various time intervals (10, 30 minutes and 1, 6 and 24 hours). The cells were then removed from the plates and lysed in lysis buffer (50 mM Tris (pH 7.6–8), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 10 mM NaPyrophosphate, 1% NP-40 and containing protease inhibitors cocktail(Sigma L2884) for 1h. Soluble proteins were quantified by the Bradford method (Sigma) and 30 μ g total proteins of each condition was evaluated on 10% polyacrylamide gels by SDS-PAGE electrophoresis and

transferred onto a Hybond-C-supported nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) using a mini Trans-Blot® Turbo Transfer System (BioRad) at 100 v for 30 min. After transfer of the proteins to nitrocellulose membrane, it was incubated with different primary antibodies: anti-PKC phosphorylated PKC (pan, δ , θ) (Cell Signaling) at the 1: 500 dilution and β -tubulin (Cell Signaling), at the dilution of 1: 2000, the latter used as the gel loading control. Blot detection was achieved by chemiluminescence (ECL Western Blotting Detection Reagents, RPN2109, GE Healthcare), and acquired by ImageQuant™ LAS 4000 mini (GE Healthcare). The quantification was done using band densitometry analysis, performed with the Image J software (version 1.41; National Institutes of Health).

Analysis of nuclear translocation of NF- κ B and dependence of NF- κ B for reactivation of latent HIV. In order to verify whether **JALEx** induces the internalization of NF- κ B, HeLa cells were plated at the density of 2×10^4 cells per well in 96-well plates with black borders. Cells were treated with 1 μ g / mL and 0.1 μ g / mL of **JALEx** for 6 or 24 hours. As a positive control of internalization, 1 μ M PMA was used and untreated cells were called MOCK. After this time, the immunofluorescence protocol for anti-p65 labeling, which detects the endogenous subunit of NF- κ B in red, and labeling of the cell nucleus with DAPI, visualized in blue, was started. The photos were acquired using fluorescence confocal microscopy (Molecular Devices, Inc).

In order to evaluate the role of NF- κ B in reactivation of latent HIV, Jurkat cells (10^6 cells) were transfected with two different plasmids: pNL4.3-LUC (NF κ B WT), provided by Dr. Renato S. de Aguiar (UFRJ) which is derived from pNL4.3-Luc-ER- (AIDS Reagent Program) and had the env stop codon reverted to its original sequence; And the plasmid p-LTR-MUT (NF κ B MUT) which was generated by site-directed mutagenesis by altering the two NF- κ B binding sites, rendering that plasmid nonfunctional for NF- κ B binding. Both constructs show the luciferase sequence under the control of the HIV viral promoter. Jurkat cells (10^6 cells) were transiently transfected with 8 μ g of each plasmid pNL4.3-LUC (NF κ B WT) or p-LTR-MUT (NF κ B MUT) with the aid of the Neon Transfection System kit (Thermo Fisher Scientific) According to the manufacturer's recommendations. After transfections, the cells were equally divided into two groups: treated or untreated with 1 μ g / mL of **JALEx**, for 24 hours. After this interval, cells were lysed in luciferase lysis buffer (Promega) and luciferase activity was assessed in a luminometer (Glomax, Promega).

Analysis of surface marker expression and cytokine production in primary cells treated with JALEx. In order to expand the results obtained in HIV latency model cells, we performed assays with **JALEx** in Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 4 healthy donors. After separation of buffy

coat by means of Ficoll centrifugation, CD4 + T cells were isolated using the Dynabeads CD4 Positive Isolation Kit (Thermo Fisher) kit, according to the manufacturer's recommendations. For isolation of 10^7 PBMCs from each of the 4 donors, for each of the conditions to be tested. After this step, the TCD4 + cells were treated with 1 μ M PMA, 10 μ g / mL (10^{-3}) or 1 μ g / mL (10^{-4}) of Janauba **JALEx**, in addition to MOCK (untreated cells), for 24 hours. After this period, the expression of some cell surface molecules was evaluated, such as expression of the CD4 receptor and CCR5 and CXCR4 co-receptors, as well as the expression of activation markers such as CD25, CD38, HLA-DR and CD69 by means of specific antibody labeling and flow cytometric analysis (BD Accuri C6). Comparatively, this assay was also performed on cells of MT4 lymphocyte line, maintaining the same number of cells treated, with the same concentrations of **JALEx**, in the same time interval.

All the cell supernatant from the TDC4 + cells was collected for analysis of the cytokine production by the cells treated with **JALEx**. This analysis was performed by means of a colorimetric multiplex immunoassay Bio-Plex Pro Human Cytokine 17-plex Assay (Bio-Rad) containing fluorescent microspheres conjugated to different monoclonal antibodies specific for each target cytokine. The following cytokines were measured: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-17, G-CSF, GM-CSF, MCP-1 / MCAF, MIP-1 β , IFN γ and TNF- α .

QVOA assay using SIVmac239 in NHP CD4+ Lymphocytes. To compare the ability of the compounds to stimulate virus replication in latently infected cells we used a variation of the quantitative viral outgrowth assay (QVOA) described by Laird et al. (35). Cells for the QVOA were isolated from viremic SIVmac239-infected cynomolgus macaques at the Wisconsin National Primate Research Center (WNPRC). PBMC isolated by density gradient centrifugation were enriched for CD4+ T cells using the CD4 T cell enrichment kit for non-human primates (Miltenyi Biotec, San Diego, CA). After enrichment cells were plated at 1×10^6 cells per well. These cells were co-cultured with "stimulator" CEMx174 cells that were irradiated with 10,500 rads prior to co-culture. The ratio of stimulator cells to CD4+ T cells was 2:1. Purified CD4+ T cells were stimulated with JALEx, concanavalin A, ingenol, or no mitogen overnight. After stimulation cells were washed and re-plated in serial dilutions in triplicate. At this point additional, non-irradiated CEMx174 cells were added to each well to serve as targets for induced virus to infect. The target cells were added at a 2:1 ratio to the CD4+ T cells. Co-cultures were maintained for 1 week after addition of target cells. On the last day supernatant was collected and RNA was isolated to test for the presence of SIV. RNA was isolated using the Viral Total Nucleic Acid kit for the Maxwell 16 MDx instrument (Promega, Madison, WI). Viral RNA was quantified using a qRT-PCR assay targeting the gag gene as described previously (36) except that analysis was performed using the Lightcycler 480 rather than the Light Cycler 2.0.

Analysis of JALEx effect on both viability and cytokine production by T cells from AIDS patients. In order to analyze the ability of Janauba (JALEx) in regulating different T cell phenotypes in the context of HIV-1 infection, peripheral blood of 15 adult HAART-treated Aids patients (8 women and 9 men), with plasma viral load of 953 ± 1.924 copies of RNA/mL and $CD4^+$ ($845 \pm 345/\text{mm}^3$) and $CD8^+$ ($845 \pm 345/\text{mm}^3$) higher than $350 \text{ cells}/\text{mm}^3$, were collected and PBMC were obtained from Ficoll-Paque gradient. Viable PBMC were quantified by trypan blue exclusion and suspended in RPMI-1640 medium supplemented with $2 \mu\text{M}$ of L-glutamine (GIBCO, Carlsbad, CA, USA), 10% of fetal calf serum, 20 U/mL of penicillin, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of streptomycin and 20 mM of HEPES buffer. Approximately 1×10^6 PBMC/mL were cultured for 24 hours in 24-well plates with 1 mL of complete medium in the presence or absence of different concentration of **JALEx** (1, 0.1 and 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As positive control, PBMC cultures were stimulated with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, 20 ng/mL) plus ionomycin (600 ng/mL). To optimize intracellular cytokine staining, brefeldin A (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added to the cultures in the last 4 hours of incubation time. For the fluorescence labeling, mouse anti-human fluorescent monoclonal antibodies (mAbs) directed against CD4-FITC, CD8-FITC were purchased from BD Bioscience (San Diego, CA, USA). Briefly, anti-CD4 and anti-CD8 mAbs were added to the PBMC ($2 \times 10^5/\text{tube}$) and incubated for 30 min at room temperature in the dark. The cells were washed with PBS and then permeabilized with Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen, San Diego, CA) at 4°C for 20 min. After washing, the antibodies for intracellular staining (anti-IL-17-PE-Cy7, anti-IFN- γ -PE-Cy5, anti-IL-10-PE-Cy7, anti-IL-21-PE), or the corresponding anti-IgG1 isotype control, were added in various combinations and incubated for 30 min at 4°C . The cells were analyzed in the Attune® (Thermo Fischer, Co) and FlowJo software. Isotype control antibodies and single-stained samples were periodically used to check the settings and gates on the flow cytometer. After acquisition of 100,000 to 200,000 events, lymphocytes were gated based on forward and side scatter properties after the exclusion of dead cells, by using propidium iodide, and doublets. The analysis of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells viability was determined using 7-aminoactinomycin D (7-AAD) (R&D systems). Further, the gated cells were negative for CD14 marker. The $CD4^+$ T lymphocyte count ($CD4^+$) was performed on a flow cytometer (FACS Count, Becton Dickson®). Plasma HIV RNA quantification was done using the RT-PCR with Abbott M2000 Sq HIV VL technology

Statistical analysis. The statistical analysis was performed using Prism 5.0 software (GraphPad Software). The Student's t test was applied to compare the proportion of different AIDS-derived cytokine-secreting T cells in cell cultures maintained in the presence or absence of Janauba. The significance in all experiments was defined as $p < 0.05$.

RESULTS

The **JALEx** soluble in water and ethanol was characterized mainly by a mixture of triterpenes and phorbol ester diterpenes. The GC profile and MS data indicated that the first group was predominant throughout the extract, with two main constituents standing out. (Figure 1). The triterpenes profile is in accordance with data from the literature that report the isolation of euphol, lanosterol, friedelin and 3 β -friedelinol in the latex, leaves and stem of *E. umbellata* (37), whilst studies with the latex have led to the characterization of euphol and the steroid citrostadienol (38). A phorbol esters-rich fraction was obtained by chromatographing the crude **JALEx** in a silica gel open column using mixtures of chloroform-ether as eluent (Figure 1B). The class of phorbol ester has been represented by the 12-O-tigloyl-4-deoxyphorbol-13-isobutirate (39), 12-deoxyphorbol-13-(2-methylpropionate), phorbol 12,13,20-triacetate (40), 4-deoxyphorbol-12,13-ditiglate and 3,4,12,13-tetraacetylphorbol-20-phenylacetate (41) distributed in several plant tissues (Supplemental Figure 1).

Analysis of latent reactivation potential of latent cytotoxicity and extracts produced from JALEx.

In this work, we used the alcoholic extracts from **JALEx** resuspended in DMSO for carrying out specific cell based assays. The reactivation of latent HIV present in J-Lat cells, 8.4 and 10.6, from lymphocytic lineage latency models was performed with various concentrations of **JALEx**, ranging from 10 to 0.0000001 $\mu\text{g} / \text{mL}$. In parallel to the reactivation assay, the cytotoxicity assay was performed to evaluate whether the concentrations of **JALEx** would be toxic to these cell lines. Figure 2 presents the results for reactivation and cytotoxicity assays. Figure 2A shows the positive reactivation controls (PMA 1 μM and ING-B 0.32 μM) for the J-Lat line 8.4, showing a percentage of about 12% of green cells, positive for reactivation of latent HIV. Concentrations of 10 to 0.01 $\mu\text{g} / \text{mL}$ of **JALEx** showed activation percentage similar to positive controls, dropping to less than 5% reactivation at dilutions of 0.001 to 0.0000001 $\mu\text{g} / \text{mL}$. In relation to the cytotoxicity of this compound in these cells (Figure 1B, in annex), we observed that the highest concentration of the tested extract, 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ was toxic for this cell line, while the other concentrations were well tolerated, showing a good cell viability. Figure 2 B shows that for the J-Lat line 10.6, reactivation levels were more expressive when compared to line 8.4, as expected, with positive controls and extract dilutions of 10 to 0.01 $\mu\text{g} / \text{mL}$ presented about 75% green cells, while at the lowest dilutions of 0.000001 to 0.0000001 $\mu\text{g} / \text{mL}$ the tested extract we observed decay for up to 10% green positive cells. In relation to the cytotoxicity of **JALEx** for J-Lat 10.6, we also detected that the concentration of 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ was toxic for this cell line,

whereas the other concentrations presented cells viability between 80% and 75%.

Analysis the action of PKC inhibitors in HIV reactivation by JALEx.

In order to evaluate whether **JALEx** is able to activate PKC pathway and identify whether this pathway is responsible for latent HIV transcriptional activation, J-Lat 8.4 and 10.6 cells were treated for 24h with different PKC inhibitors (Go 6666, Go 6983 and Ro-31-8220). After this period, the cells were incubated with PKC activation positive control(PMA 1 μ M), in addition to the concentrations of **JALEx** of 0.01 and 0.001 μ g/mL, which previously were not toxic in the cytotoxicity assay and were able to reactivate latent HIV. The readout for this assay was flow cytometry for quantification of the percentage of GFP positive cells. In this assay we used PMA as a positive control. PMA is Phorbol esters and can replace diacylglycerol (DAG) in the activation of PKCs and unlike DAG, as phorbol esters are not rapidly metabolized, treatment of cells with these compounds results in a prolonged activation of PKCs (16). Figure 3 shows a similar pattern of latent HIV activation after PMA and **JALEx** treatment in both J-Lat lines when PKCs inhibitors were added to culture. With the pretreatment of the cells with the PKC inhibitors, we observed very low reactivation rates for J-Lat 8.4 cells which were incubated with the inhibitors G6666, G6983 and Ro-31-8220, respectively, and were then treated with **JALEx** at a concentration of 0.01 μ g / mL. The percentage of reactivation of the J-Lat 8.4 cells incubated with Gö6976, Gö 6983 and Ro-31-8220 was 0.03, 0.02 and 0.06%, respectively, when later incubated with **JALEx** at a concentration of 0.001 μ g/mL. The percent of reactivation of J-lat 10.6 after treatment with the inhibitors Gö6976, Gö6983 and Ro-31-8220 was 6.76; 1.41 and 11.89%, respectively, followed by treatment with **JALEx** at a concentration of 0.001 μ g / mL when compared to cultures without PKC inhibitors.

Analysis of PKC isoforms activated by JALEx.

The PKC family is involved in control of several functions of cellular proteins by phosphorylation of hydroxyl groups in serine / threonine residues of these proteins. Moreover, the catalytic domain present in the structure of PKCs is essential for its autophosphorylation and, consequently, its cellular activation and relocation. PKCs are part of a large family of proteins that comprise different isoforms spanning different regulatory and catalytic domains. The isoforms are divided into three subgroups: the conventional isoforms α , β I, β II and γ ; The new ones encompassing the δ , ϵ , η and θ isoforms and the atypical isoforms ι and λ isoforms. This division is based on the differences found in its structures and pathways of activation, which may or may not be Ca²⁺-dependent.

For these reasons, we investigated whether phosphorylation of different PKC isoforms was occurring in response to treatment of Jurkat cells with **JALEx**. In these experiments two concentrations of **JALEx** (0.01 μ g / mL and 0.001 μ g /

mL) was used and PMA was utilized as positive control of PKC phosphorylation. Cells were collected at different time intervals (10, 30 minutes and 1, 6 and 24 hours). Figure 4A shows western blottings for analysis of the phosphorylation pattern in PKCs of conventional and novel isoforms. We observed that the phosphorylation of conventional PKCs, identified by anti-pan-PKC-phosphorylated antibody labeling, occurs quite rapidly, after 10 minutes of treatment with JALEx, in the two concentrations tested. This activation is long lasting, remaining phosphorylated for up to 24 hours after the treatments. The same pattern was observed at the same time intervals for cells treated with PMA. For the novel PKC isoforms, PKC θ exhibited a rapid phosphorylation pattern that did not sustain over time. PKC δ showed an early phosphorylation pattern maintained for up to 24 h after treatment with **JALEx**, which in this time interval at the concentration of 0.001 $\mu\text{g} / \text{mL}$ exhibited more pronounced phosphorylation. Figure 4B shows fold change in relation to the negative control (DMSO) the proportion of times we had the phosphorylation / degradation of PKC isoforms. Values above one show that there was phosphorylation of a certain PKC isoform, and values below one, the non-activation of a given PKC isoform, for each treatment, and interval. We observed that after 1 h of treatment with both **JALEx** and PMA concentrations, conventional isoforms exhibited their maximum phosphorylation. Whereas for new isoform PKC θ exhibited in 10 minutes at the concentration of 0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of JALEx for maximum phosphorylation, whereas for PKC δ maximum phosphorylation was visualized after 24 h of treatment with 0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of **JALEx**.

Because of its phosphorylation and activation, PKCs are translocated to the plasma membrane by the action of RACK proteins (41). To verify if **JALEx** would be able to promote the translocation of different PKC isoforms to the plasma membrane, HeLa cells were transfected with plasmids expressing three PKC isoforms fused to GFP (PKC α -GFP, PKC δ -GFP and PKC γ -GFP). After transfection, the cells were treated with 1 and 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of **JALEx** for 24 h, concentrations that had previously been tested for reactivation and cytotoxicity for 10 minutes or 24 hours. Figure 5 shows fluorescence confocal microscopy images showing a diffuse pattern of PKC isoform distribution in untreated cell cytoplasm (MOCK). The images of Figure 5 A refer to 10 minutes of treatment with PMA (positive control) and also 10 minutes of treatment with **JALEx** at concentrations of 1 and 0.1 $\mu\text{g} / \text{mL}$. These images evidenced a distribution pattern close to the plasma membrane, showing that this short period of treatment with **JALEx** was enough to cause the translocation of the PKC isoforms, especially PKC α and PKC δ .

Figure 5 B refers to the 24-hour treatment, both with PMA positive control and with **JALEx** at concentrations of 1 and 0.1 $\mu\text{g} / \text{mL}$. We observed a pattern of distribution of the three PKC isoforms near the plasma membrane of cells, a

fact that is not observed in untreated cells (MOCK), where the diffuse distribution pattern of the three isoforms remains unchanged.

Analysis of nuclear translocation of NF- κ B and dependence of NF- κ B for reactivation of latent HIV

As previously described in the literature, activation of PKC leads to nuclear translocation of the NF- κ B transcription factor, thanks to proteasomal degradation of IKK (43-45). For this reason, we evaluated the effect of the treatment with **JALEx** on nuclear translocation of NF- κ B by two methodologies. In the first one, from confocal fluorescence microscopy, we analyzed the occurrence of nuclear translocation of NF- κ B after treatment of HeLa cells with 1 and 0.1 μ g / mL of **JALEx** for 6 or 24 hours, and labeling with anti-p55 antibody, which detects the endogenous subunit of NF- κ B, in red. Figure 6A shows that 6 h after treatments we observed no significant translocation of NF- κ B to the nucleus of HeLa cells in any of the conditions tested, maintaining a pattern of NF- κ B distribution similar to that observed in untreated cells (MOCK). Already 24 h after the treatments, we visualized the cells with their red nuclei, confirming higher nuclear translocation levels of NF- κ B (Figure 6B). To better quantify the translocation of NF- κ B, Figure 6C shows the graph where the mean values of the fluorescence intensity between the nucleus and the cytoplasm of 100 HeLa cells were calculated under all conditions at the time intervals of 6 and 24 h after the treatments. We observed that in 6 h (light gray bars) we had few cells with internalization pattern, exhibiting their levels like those observed in untreated cells. As early as 24 h (dark gray bars) we visualized a higher proportion of cells with internalized NF- κ B as compared to their fluorescence in the cytoplasm of the cells. For the treatment condition with **JALEx** at the concentration of 1 μ g / mL, we observed the highest internalization pattern, higher than the PMA.

The second methodology to evaluate the recruitment of NF- κ B by the **JALEx** involved an assay with LTR-luciferase reporter plasmids to quantify the nuclear translocation of NF- κ B. HIV transcription is sensitive to the activation of its LTR promoter by the NF- κ B transcription factor, since there are multiple NF- κ B binding copies in its promoter (46, 47). In order to verify whether the transcriptional activation of HIV carried out by **JALEx** would be mediated by binding of NF- κ B to the HIV LTR promoter, Jurkat cells were transfected with NF κ B WT or NF κ B MUT. Each of these constructs expresses a luciferase reporter gene under the control of the HIV viral LTR promoter, but NF κ B WT contains intact NF- κ B binding sites, while NF κ B MUT contains mutations that prevent binding of this transcription factor to the viral promoter. Transfected cells were treated with 1 μ g / mL of **JALEx** and luciferase activity was assessed by luminometer. Figure 7 shows that treatment with the extract

induced a 5-fold increase in luciferase expression in cells transfected with pNFkB WT. No luciferase activity was observed in cells transfected with pNFkB MUT, suggesting that the transcriptional activation promoted by the **JALEx** is dependent on the intact NF- κ B binding sites in the LTR promoter of HIV.

Analysis of surface marker expression and cytokine production in primary human CD4⁺ lymphocytes treated *ex vivo* with JALEx.

To analyze whether the effects of treatment with **JALEx** would have an impact on primary human cells, we performed assays on CD4⁺ T cells isolated from PBMCs from 4 healthy donors. CD4⁺ T cells were treated with 1 μ M PMA, 10 μ g / mL (10^{-3}) or 1 μ g / mL (10^{-4}) of **JALEx**, in addition to MOCK (untreated cells) for 24 hours. After this period, expression of the CD4 receptor and CCR5 and CXCR4 co-receptors, in addition to the expression of activation markers such as CD25, CD38, HLA-DR and CD69 were assessed by specific antibody labeling and flow cytometric analysis. Figure 8 shows the expression pattern of all such surface molecules.

We observed in Figure 8A that the treatment with 1 μ g / mL (10^{-4} - slashed bars) of **JALEx** was responsible for the negative regulation of CD4 and CXCR4 levels and did not alter the CCR5 co-receptor expression. The same pattern was observed for cells treated with PMA (black bars). Figure 8 B shows CD25, CD38 and HLA-DR activation markers, all expressed at higher levels when compared to control cells after treatment with 1 μ g / mL extract (10^{-4} -hatched bars). The values are expressed as fold change over the control values (Mock - untreated). The same activation pattern is observed in PMA-treated cells (Fig. 8B, black bars). Figure 8 C shows that CD69 activation marker expression is 75-fold higher relative to control cells in both treatments. Figure 8 D shows expression of CD4, CCR5, CXCR4 in lymphocyte line MT4 cells after treatment with positive control (1M PMA - black bar) 10 μ g / mL of **JALEx** (hatched bar) and 1 μ g / mL extract (striped bar). The pattern observed in CD4⁺ T cells was the same observed in lineage cells, with abrupt negative regulation of CD4 and CXCR4. However, we did not notice a slight negative regulation, about 0.25 times in relation to the untreated control in relation to CCR5 expression. These suggest that **JALEx** could block HIV infection of cells since there is a negative regulation of the receptor and one of the co-receptors used by the virus during its cell infection.

To evaluate if there was a change in cytokine production by cells treated with the **JALEx**, all cell supernatant from human CD4⁺ T cells was collected. This analysis was performed by means of a multiplex immunoassay to quantify the production of 17 different cytokines. Figure 9 shows that there were increased production of the following cytokines: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p70), IL-17, G-CSF, GM-CSF, MCP-1 / MCAF, IFN γ and TNF- α . The highest levels of production in relation to the untreated cells were observed for IFN γ

and TNF- α , with a quantification of 5,000 pg / mL and 1,800 pg / mL in the condition of 1 μ g / mL of the **JALEx**. The high expression pattern of the cytokines followed the pattern exhibited by the treatment with PMA, being the concentration of 1 μ g / mL of the extract that produced the most changes, when compared to the concentration of 10 μ g / mL of the extract.

Ability of JALEx on cytokines-secreting T cells from Aids patients

Previous findings showed the ability of Janauba in up-regulating pro-inflammatory cytokines by PBMC cultures from healthy subjects. In HIV-1 infection, progression for AIDS is mainly characterized by CD4⁺ T cell depletion of some Th phenotypes, such as Th1 and Th17 cells, which impacts negatively on immune protection against different pathogens. The first event analyzed was T cell viability in PBMC cultures from Aids patients when maintained in the presence of different **JALEx** concentrations by cytometry. As demonstrated in Figure 10 A, highest **JALEx** dose (1 μ g/mL) induced significant CD4⁺ T cells death (ranging 43% to 82%), and this should be linked to extension of virus replication detected in this cell cultures (Figure 10 B). At same dose, **JALEx** also induced lower, but significant, CD8⁺ T cells death (ranging from 5.2 to 19.8%) (Figure 10 B). Take into account these findings, our assays aiming to evaluate the *in vitro* T cells cytokine profile those patients were stimulated with 0.01 and 0.1 μ g/mL of **JALEx**. As observed in the figure 10A, after 24 h of culturing, 0.1 μ g/mL of JALEx was more efficient with regard to elevate the frequency of CD4⁺ and CD8⁺ T cells positives for IL-17, IFN- γ , and IL-21 cytokines. Moreover, when compared with PMA/IO, **JALEx** at 0.1 μ g/mL was more efficient at elevating the frequency of IL-21-secreting (CD4⁺ and CD8⁺) T cells (Figure 11 A and B). In addition, **JALEx** (0.1 μ g/mL) enhanced not only the percentage of single IL-21-secreting (CD4⁺ and CD8⁺) T cells, but also Th1 and Th17-like subsets positives for IL-21. In contrast, no difference was observed regarding either IFN- γ - or IL-17-secreting CD4⁺ and CD8⁺ T cells from PBMC cultures from Aids patients following addition of **JALEx** at 0.1 μ g/mL (Figure 11C). This result is very interesting due to protective roles played by IL-21 cytokine against different chronic virus infections, such as HCV and HIV (48,49)

Study of JALEx effects in latently SIV-infected macaque cells.

Finally, we explored the capacity of JALEx to induce latent viruses present in CD4 + lymphocytes from SIVmac239-infected cynomolgus macaques. We obtained a large population of purified resting memory CD4⁺ T cells from a single viremic macaque and prepared replicate serial dilutions of these cells to seed into quantitative viral outgrowth assays (QVOA). Cells in these assays were stimulated in triplicate at each cell dilution with JALEx or other compounds known to reactivate latent HIV/SIV through PKC activation (ingenol and

concanavalin A). To compare the ability of these compounds to reactivate latent SIV, we measured the frequency of infected cells (quantified as infectious units per million cells; IUPM) across treatments; a higher frequency of infected cells after stimulation with a given compound would suggest that this compound was more efficient at reversing latency. The highest frequency of infected cells was observed in cultures treated with JALEx, although this frequency was not significantly different from those observed in other cultures (Supplemental Table 1). Notably, however, JALEx was the only compound capable of reactivating SIV in each replicate culture at each dilution of input cells tested in this experiment.

DISCUSSION

In this work we addressed the ability of an ethanolic extract obtained from *Euphorbia umbellata* latex (**JALEx**) to reactivate HIV/SIV latency in several *in vitro* experiments. The traditional medical use of this Euphorbiaceae are well known in South America and this plant is vastly used diluting a small volume of crude latex in drinkable water and consuming this solution regularly (21). **JALEx** contains a series of bioactive phorbol esters (see Supplemental Figure 1). These class of molecules such as PMA are known PKC agonist implicated in lymphocyte activation as well HIV reactivation in well conducted *ex vivo* studies and these activities requires both PKC α and PKC θ isoforms activation (50). Modifications in phorbol ring can lead molecules able to induce carcinogenesis and others such as a deoxy in ring position 4 (4-deoxyphorbol) can lead to molecules unable to induce carcinogenesis but retaining its PKC activation capacity (51). The presence of this modified phorbol esters was previously shown in *Euphorbia umbellata* latex (40). Therefore, our **JALEx** is not likely to induce cell carcinogenesis retaining the capacity to reactivate HIV/SIV latency. Many LRA fit in this class such as prostatin (13), bryostatin (14), ingenol B (15), and phorbols such as PMA (16). Prostratin and bryostratin, are strong PKC agonist and they are very toxic when injected intravenously. In fact, bryostatin was used in a phase II study with 17 patients with progressive non-Hodgkin's lymphoma of indolent type (NHL), previously treated with chemotherapy. These patients received a median of 6 intravenous infusions of 25 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ bryostatin 1 given once weekly over 24 h and the principal toxicities were myalgia and phlebitis (52). Ingenol B a semisynthetic compound isolated from *Euphorbia tirucalli* was able to reactivate HIV *ex vivo* with great potency using the PKC/NF κ B pathway. It was also clear that the use of ingenol B in human CD4+ lymphocytes increased cellular levels of CycT1 and CDK9 in *ex vivo* experiments. (15). Similar mechanism of action can be found in PMA in *in vivo* study. In our study we used **JALEx** to explore the capability of 4-deoxyphorbol esters present in its latex to reactivate HIV latency taking the advantage of the use in traditional medicine without serious side effects whenever used orally. First we used **JALEx** in J-Lat 8.4 and 10.6 cells and we could show the potency of this extract reactivates latent HIV transcription present in J-Lat 8.4 and 10.6 cells in low concentrations (0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$). We also demonstrate that **JALEx** act through PKC by inhibiting J-Lat activation with three different PKC inhibitors (G6666, G6983 and Ro-31-8220). In our assays G6983 was more powerful inhibitor totally blocking HIV reactivation in both J-Lat cell lines. G6983 is a fast pan-PKC inhibitor against PKC α , PKC β , PKC γ and PKC δ with IC₅₀ of 7 nM, 7 nM, 6 nM and 10 nM, respectively; less potent to PKC ζ and inactive to PKC μ . Additionally, we showed that **JALEx** activates the PKC pathway by promoting NF- κ B internalization into the nucleus and increasing HIV transcription, which is dependent on NF- κ B binding to LTR promoter. Using image and western blot analysis we showed that **JALEx** was able to activate classical and novel PKC isoforms such as: the conventional isoforms α , β I, β II and γ as well the new ones encompassing the δ , ϵ , η and θ isoforms in *in vitro* experiments using JURKAT cell lines.

We also evaluate the capacity of **JALEx** to induce cytokines production in human PBMC cells *in vitro*. This pattern of alteration in the production of cytokines from treatment with reactivating compounds is quite common in the case of the shock and kills strategy, which aims to activate the cells and promote the exit of HIV latency that is integrated into the cells T. This phenomenon is known as "cytokine storm" and needs

to be further studied in animal models to define a dose that does not induce this toxic reaction. Although **JALEx** induced a conjunction of pro inflammatory cytokines we could observed a noticeable level of induction of IL-21 by different CD4+ and CD8+ T lymphocyte subsets from PBMC cultures from Aids patients, a noble cytokine enrolled in the HIV virus load control in HIV+ individuals (5). For this reason, the search for new, more selective compounds that target only a few PKC isoforms or that have their mechanism of action in other stages of the activation pathways to reduce these risks is necessary. Of note, leaf and latex ethanolic extract of *E. umbellata* latex had low toxicity in adults Rat when dose orally and acute doses of 2000mg/kg given orally was well tolerated (53).

In our experiments **JALEx** was efficient in reactivating HIV production directly in resting T CD4+ cells in HIV+ individuals fully virally suppressed by HAART as well primary non-human primate T CD4+ cells counterpart in SIV251 latency model using a QVOA assay in low concentrations. The anti-HIV action of **JALEx** can occur three synergistic effects: a) reactivation of HIV from latency and its destruction by HAART; b) blocking infection of new cells through the down-modulation of CD4 on the lymphocyte surface; and c) by inducing the secretion of antiviral cytokines such as IL21. All these *in vivo* properties of **JALEx** in non-human primate cell models added to the molecular mechanisms of reactivation presented here as well the traditional use of *E. umbellata* latex, strongly recommends JALEx or other *E. umbellata* latex preparations as a great candidate for future clinical trials for HIV eradication.

REFERENCES

1. Barré-Sinoussi et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983;Vol. 220, Issue 4599, pp. 868-871; DOI: 10.1126/science.6189183
2. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*. 1984 May 4;224(4648):500-3. doi: 10.1126/science.6200936.
3. J.A. Levy. Virus-Host Interactions in HIV Pathogenesis. *Adv Dent Res*. 2011 Apr; 23(1): 13–18.doi: 10.1177/0022034511398874.
4. Fernandes JR, Berthoud TK, Kumar A, Angel JB. IL-23 signaling in Th17 cells is inhibited by HIV infection and is not restored by HAART: Implications for persistent immune activation. *PLoS One*. 2017; 12(11):e0186823.
5. Paiardini M, Müller-Trutwin M. HIV-associated chronic immune activation. *Immunol Rev*. 2013; 254(1): 78–101.
6. Sereti I, Rodger AJ, French MA. Biomarkers in Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome: Signals from Pathogenesis. *Curr Opin HIV AIDS*. 2010 November; 5(6): 504–510.
7. Sallusto F. Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes. *Annu Rev Immunol*. 2016; 34:317-34.
8. John Coffin and Ronald Swanstrom . HIV Pathogenesis: Dynamics and Genetics of Viral Populations and Infected Cells. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013 Jan; 3(1): a012526.doi: 10.1101/cshperspect.a012526.
9. Steven G. Deeks, Sharon R. Lewin, and Diane V. Havlir. The End of AIDS: HIV Infection as a Chronic Disease. *Lancet*. 2013 Nov 2; 382(9903): 1525–1533.. Published online 2013 Oct 23. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61809-7.
10. Robert F. Siliciano and Warner C. Greene. HIV Latency. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011 Sep; 1(1): a007096. doi:10.1101/cshperspect.a007096.
11. Davey RT Jr, Bhat N, Yoder C, Chun TW, Metcalf JA, Dewar R, Natarajan V, Lempicki RA, Adelsberger JW, Miller KD, Joseph A. Kovacs, Michael A. Polis, Robert E. Walker, Judith Falloon, Henry Masur, Dennis Gee, Michael Baseler, Dimiter S. Dimitrov, Anthony S. Fauci and H. Clifford Lane. 1999. HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc Natl Acad Sci* 96: 15109–15114, <https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.15109>.
12. Deeks SG , *Nature*. HIV: Shock and kill. 2012; 487(7408):439-40. doi:10.1038/487439a.

13. Williams SA, Chen LF, Kwon H, Fenard D, Bisgrove D, Verdin E, and Greene WC. Prostratin antagonizes HIV latency by activating NF-kappaB *J Biol Chem*. 2004 Oct 1; 279(40):42008-17. doi: 10.1074/jbc.M402124200.
14. Mehla R, Bivalkar-Mehla S, Zhang R, Handy I, Albrecht H, Giri S, Nagarkatti P, Nagarkatti M, and Chauhan A. Bryostatins modulates latent HIV-1 infection via PKC and AMPK signaling but inhibits acute infection in a receptor independent manner. *PLoS One*. 2010 Jun 16; 5(6):e11160. doi: 10.1371/journal.pone.0011160.
15. Pandeló José D, Bartholomeeusen K, da Cunha RD, Abreu CM, Glinski J, da Costa TB, Bacchi Rabay AF, Pianowski Filho LF, Dudycz LW, Ranga U, Peterlin BM, Pianowski LF, Tanuri A, Aguiar RS. Reactivation of latent HIV-1 by new semi-synthetic ingenol esters. *Virology*. 2014 Aug;462-463:328-39. doi: 10.1016/j.virol.2014.05.033.
16. Sergey A. Trushin, Gary D. Bren, Susana Asin, Kevin N. Pennington, Carlos V. Paya, and Andrew D. Badley. Human Immunodeficiency Virus Reactivation by Phorbol Esters or T-Cell Receptor Ligation Requires both PKC α and PKC θ . *J. Virol*. August 2005 vol. 79 no. 15 9821-9830. doi: 10.1128/JVI.79.15.9821-9830.2005.
17. Savarino A, Mai A, Norelli S, El Daker S, Valente S, Rotili D, Altucci L, Palamara AT, Garaci E. "Shock and kill" effects of class I-selective histone deacetylase inhibitors in combination with the glutathione synthesis inhibitor buthionine sulfoximine in cell line models for HIV-1 quiescence. *Retrovirology*. 2009 Jun 2;6:52. doi: 10.1186/1742-4690-6-52.
18. Kashiwada, Y., Wang, H.-K., Nagao, T., Kitanaka, S., Yasuda, I., Fujioka, T. Takashi Yamagishi, L. Mark Cosentino, Mutsuo Kozuka, Hikaru Okabe, Yasumasa Ikeshiro, Chang-Qi Hu, Eric Yeh, and Kuo-Hsiung Lee. (1998). Anti-AIDS agents. 30. anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids. *J. Nat. Prod*. 61, 1090–1095. doi: 10.1021/np9800710.
19. Ohtake, N., Nakai, Y., Yamamoto, M., Sakakibara, I., Takeda, S., Amagaya, S., Aburada M.. (2004). Separation and isolation methods for analysis of the active principles of Sho-saiko-to (SST) oriental medicine. *J. Chromatogr. B* 812, 135–148. doi: 10.1016/j.jchromb.2004.06.051.
20. Loya, S., Rudi, A., Kashman, Y., and Hizi, A. (1999). Polycytone A, a novel and potent general inhibitor of retroviral reverse transcriptases and cellular DNA polymerases. *Biochem. J*. 344, 85–92. doi: 10.1042/bj3440085.
21. Dutra RC, Campos MM, Santos AR, Calixto JB. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological research*. 2016.
22. Franco-Salla GB, Prates J, Cardin LT, Dos Santos AR, Silva WA, Jr., da Cunha BR, et al. Euphorbia tirucalli modulates gene expression in larynx squamous cell carcinoma. *BMC complementary and alternative medicine*. 2016;16(1):136.
23. Lin MW, Lin AS, Wu DC, Wang SS, Chang FR, Wu YC, et al. Euphol from Euphorbia tirucalli selectively inhibits human gastric cancer cell growth through the induction of ERK1/2-mediated apoptosis. *Food and chemical toxicology : an*

international journal published for the British Industrial Biological Research Association. 2012;50(12):4333-9.

24. Wang L, Wang G, Yang D, Guo X, Xu Y, Feng B, et al. Euphol arrests breast cancer cells at the G1 phase through the modulation of cyclin D1, p21 and p27 expression. *Molecular medicine reports*. 2013;8(4):1279-85.

25. Fatope MO, Zeng L, Ohayaga JE, Shi G, McLaughlin JL. Selectively cytotoxic diterpenes from *Euphorbia poisonii*. *Journal of medicinal chemistry*. 1996;39(4):1005-8.

26. Prakash E, Gupta DK. Cytotoxic Activities of Extracts of Medicinal Plants of Euphorbiaceae Family Studied on Seven Human Cancer Cell lines. *Universal Journal of Plant Science*. 2013;1(4):113-7.

27. El-Mekkawy, S., Meselhy, M. R., Nakamura, N., Hattori, M., Kawahata, T., and Otake, T. (2000). Anti-HIV-1 phorbol esters from the seeds of *Croton tiglium*. *Phytochemistry* 53, 457–464. doi: 10.1016/S0031-9422(99)00556-7.

28. Ortencio, W.B. *Medicina popular do Centro-Oeste*. 2.ed. Brasília: Thesaurus, 1997. 59p.

29. R. Bagavathi, B. Sorg and E. Hecker (1988). Tiglane-type diterpene esters from *Euphorbia umbellatai*, *Planta Med.* 54, 506–510.

30. G. W. Olivier, M. G. Rowan, S. K. Branch, M. F. Mohan and K. C. Molloy (1992). Two esters of synadenol, a new lathyrane diterpenoid, from the latex of *Synadenium compactum* (Euphorbiaceae): a crystal structure analysis, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1831–1835.

31. B. Uzabakilihoc, C. Largeau and E. Casadwall (1987). Latex constituents of *Euphorbia candelabrum*, *E. grantii*, *E. tirucalli* and *Euphorbia umbellatai*, *Phytochemistry* 26, 3041–3045.

32. Martiny-Baron Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, and Marmé D, Schächtele C. (1993) Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Gö 6976 *J.Biol.Chem.* 268 9194 .

33. Gschwendt Dieterich S, Rennecke J, Kittstein W, Mueller HJ, and Johannes FJ. (1996) Inhibition of protein kinase C μ by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isozymes. *FEBS Lett.*

34. Sullivan JA¹, Merritt JE, Budd JM, Booth RF, and Hallam TJ. Effect of a selective protein kinase C inhibitor, Ro 31-8425, on Mac-1 expression and adhesion of human neutrophils. *Eur J Immunol.* 1994 Mar;24(3):621-6.

35. Laird G. M. et al. . Rapid quantification of the latent reservoir for HIV-1 using a viral outgrowth assay. *PLoS Pathog* 9, e1003398 (2013).

36. Valentine LE, Loffredo JT, Bean AT, León EJ, MacNair CE, Beal DR, Piaskowski SM, Klimentidis YC, Lank SM, Wiseman RW, Weinfurter JT, May GE, Rakasz EG, Wilson NA, Friedrich TC, O'Connor DH, Allison DB, Watkins DI. 2009. Infection with “escaped” virus variants impairs control of simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication in Mamu-B*08-positive macaques. *J Virol.* 83:11514-11527. PMC2772717.
37. Kinghorn AD. Major skin-irritant principle from *Euphorbia umbellata*. *Journal of pharmaceutical sciences.* 1980;69(12):1446-1447. Doi: 10.1002/jps.2600691228
38. Hartmann DB, Marim RA, da Silva YL, Zardeto G, de Azevedo Silva I, de Arruda Mattos D, et al. Letalidade do extrato de *Euphorbia umbellata* Hook. f.(Euphorbiaceae) frente a caramujos *Biomphalaria glabrata* say, 1818 (Gastropoda, Planorbidae). *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR,* 2011;14(1). doi: 10.25110/arqvet.v14i1.2011.3779
39. Costa LL, VC, David R, Pinto BR, Minozzo VA, Kozlowski Jr LA, Campos RZ, et al., Anti-ulcer activity of *Euphorbia umbellata* latex. *Revista Brasileira de Farmacognosia,* 2012;22(5):1070-1078. Doi: 10.1590/S0102-695X2012005000050.
40. Hassan EM, Mohammed MM, Mohamed SM. Two new phorbol-type diterpene esters from *Euphorbia umbellata* Hook f. leaves. *Records of Natural Products,* 2012;6(2):255.
41. Campos A, Vendramini-Costa DB, Longato GB, Zermiani T, Ruiz ALTG, de Carvalho JE, et al. Antiproliferative effect of *Euphorbia umbellata* Hook f. stems (Euphorbiaceae) and a rare phorbol diterpene ester. *International journal of toxicology,* 2016;35(6):666-671. doi: 10.1177/1091581816659660.
42. Mochly-Rosen D, Gordon AS. Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB J.* 1998;12:35–42.
43. Spitaler M, Cantrell D. a. Protein kinase C and beyond. *Nat. Immunol.* 2004;5:785–790. <http://dx.doi.org/10.1038/ni1097> .
44. Steinberg SF. Structural basis of protein Kinase C isoform function. *Physiol. Rev.* 2008;88:1341–1378. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00034.2007>.
45. Williams SA, Chen L-F, Kwon H, Fenard D, Bisgrove D, Verdin E, Greene WC. Prostratin antagonizes HIV latency by activating NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* 2004;279:42008–42017. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M402124200>).
46. Bachu M, Yalla S, Asokan M, Verma A, Neogi U, Sharma S, Murali RV, Mukthey AB, Bhatt R, Chatterjee S, Rajan RE, Cheedarla N, Yadavalli VS, Mahadevan A, Shankar SK, Rajagopalan N, Shet A, Saravanan S, Balakrishnan P, Solomon S, Vajpayee M, Satish KS, Kundu TK, Jeang K-T, Ranga U. Multiple NF-κB sites in HIV-1 subtype C long terminal repeat confer superior magnitude of transcription and thereby the enhanced viral predominance. *J. Biol. Chem.* 2012;287:44714–44735. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.397158>.

47. Naghavi MH, Schwartz S, Sönnnerborg a., Vahlne a. Long terminal repeat promoter/enhancer activity of different subtypes of HIV type 1. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 1999;15:1293–1303. <http://dx.doi.org/10.1089/088922299310197>
48. Porichis F, Kaufmann DE. HIV-specific CD4 T cells and immune control of viral replication. *Curr Opin HIV AIDS.* 2011; 6(3):174-80.
49. Kared H, Fabre T, Bedard N, Brunneau J, Shoukry NH. Galectin-9 and IL-21 mediate cross-regulation between Th17 and Treg cells during acute hepatitis C. *PLoS Pathog.* 9 (2013) e1003422.
50. Sergey A. Trushin¹, Gary D. Bren, Susana Asin, Kevin N. Pennington, Carlos V. Paya, and Andrew D. Badley, Human Immunodeficiency Virus Reactivation by Phorbol Esters or T-Cell Receptor Ligation Requires both PKC α and PKC θ . *Virology*. 2005 vol. 79 no. 15 9821-9830. doi: 10.1128/JVI.79.15.9821-9830.2005.
51. Tanaka M , Irie K , Nakagawa Y , Nakamura Y , Ohigashi H , Wender PA . The C4 hydroxyl group of phorbol esters is not necessary for protein kinase C binding. *Bioorg Med Chem Lett.* 2001 Mar 12;11(5):719-22doi.org/10.1016/S0960-894X(01)00045-2.
52. Blackhall FH, Ranson M, Radford JA, Hancock BW, Soukop M, McGown AT, Robbins A, Halbert G, Jayson GC; Cancer Research Campaign Phase I/II Committee. A phase II trial of bryostatins in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer.* 2001;84(4):465-9. doi: 10.1054/bjoc.2000.1624.
53. Luiz C. Cunha, Flaubertt S. Azeredo, Ana C. V. Mendonça, Marcelo S. Vieira, Liuba L. Pucci, Marize C. Valadares, Helemi O. G. Freitas, Ângela A. S. Sena, and Ruy de Souza Lino Junior. Evaluation of acute and subacute toxicity in rats of leaf and latex ethanolic extract of *Synadenium umbellatum* Pax. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 2009; 19(2A): 403-411.

Acknowledgments

We are in debit to Dr. Thomas Friedrich from Virology Services Unit at the Wisconsin National Primate Research Center, Wisconsin, USA for QVOA assay using SIVmac239 in NHP CD4+ Lymphocytes . We are grateful to Mr. Wilson Camargo Barros Filho and Mr. Luis Antônio Nogueira for providing *E. umbellata*'s latex utilized in this work. This work was sponsored by CNPq, FAPERJ, CAPES, and FINEP.

FIGURES AND LEGENDS

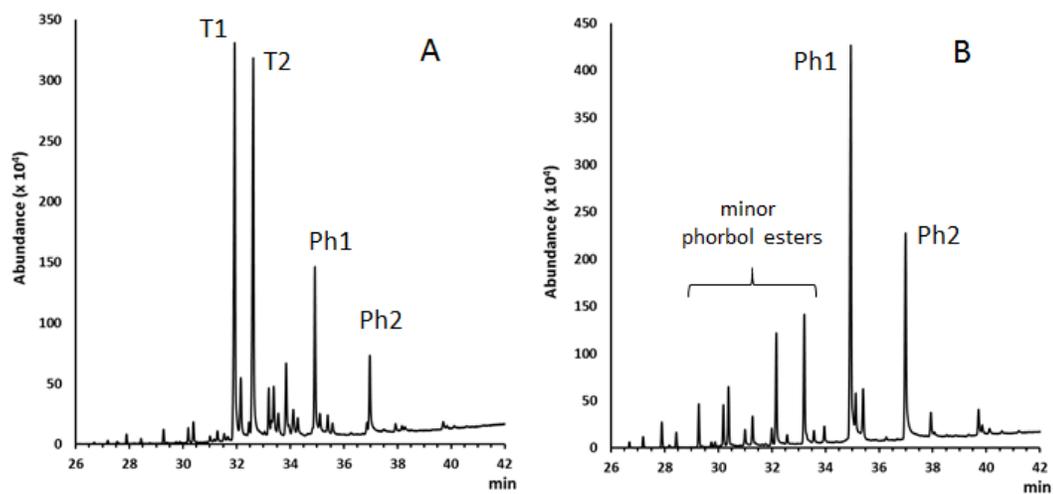


Figure 1. Gas chromatograms of (A) whole extract **JALEx** and (B) Phorbol esters-enriched **JALEx** fraction. T1 and T2 = major triterpenes constituents; Ph1 and Ph2 = major phorbol esters constituents. The chemical classes were indicated by the characteristic mass fragmentation in the GC-MS analysis and data from literature.

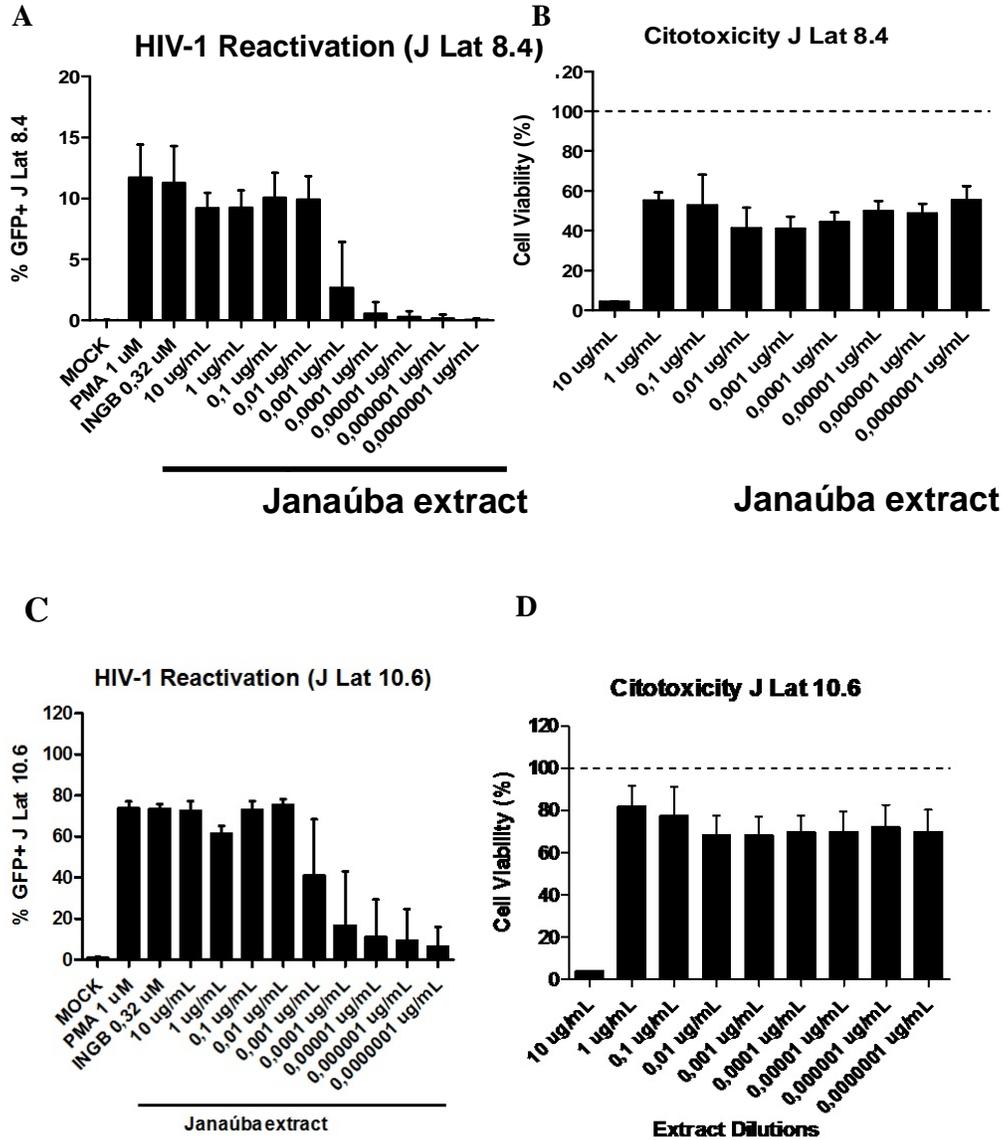


Figure 2: JALEx promotes HIV transcription. JALEx reacts latent HIV-1 transcription in J-Lat 8.4 (A) and J-Lat 10.6 (C) cells. Cells were submitted to increasing concentrations of JALEx and activation was assessed by GFP expression by flow cytometry 24 hours after treatment of the cells. MOCK cells were not treated with the compound, whereas the positive controls were performed with two potent reactors already known: PMA (1 μ M) and INGB (0,32 μ M). The cytotoxicity of this compound was evaluated by CellTiter Blue vital stain 5 days after treatment with the compound. In (C) we observed the percentage of viable J-Lat 8.4 cells after treatment and in (D), the percentage of J-lat 10.6 cells.

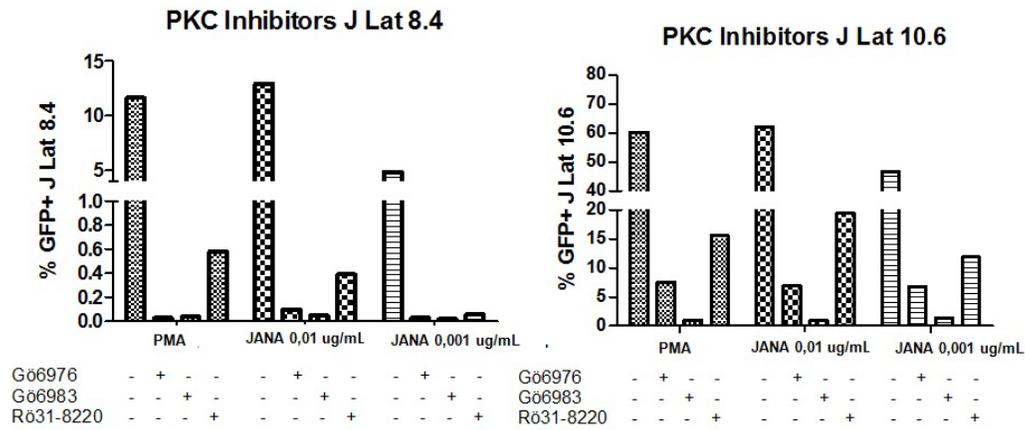


Figure 3: JALEx-mediated HIV-1 reactivation occurs via PKC activation. J-Lat cells 8.4 (left panel) and J-Lat 10.6 (right panel) were pretreated for 24 h with three different PKC inhibitors (G6666, G6363 and Ro-31-8220) at the concentration of 1 μ M each. The cells were then incubated with different concentrations of JALEx for an additional 24 hours and GFP expression was assessed by flow cytometry. PMA (1 μ M) was used as a positive control for activation of PKC-dependent HIV-1.

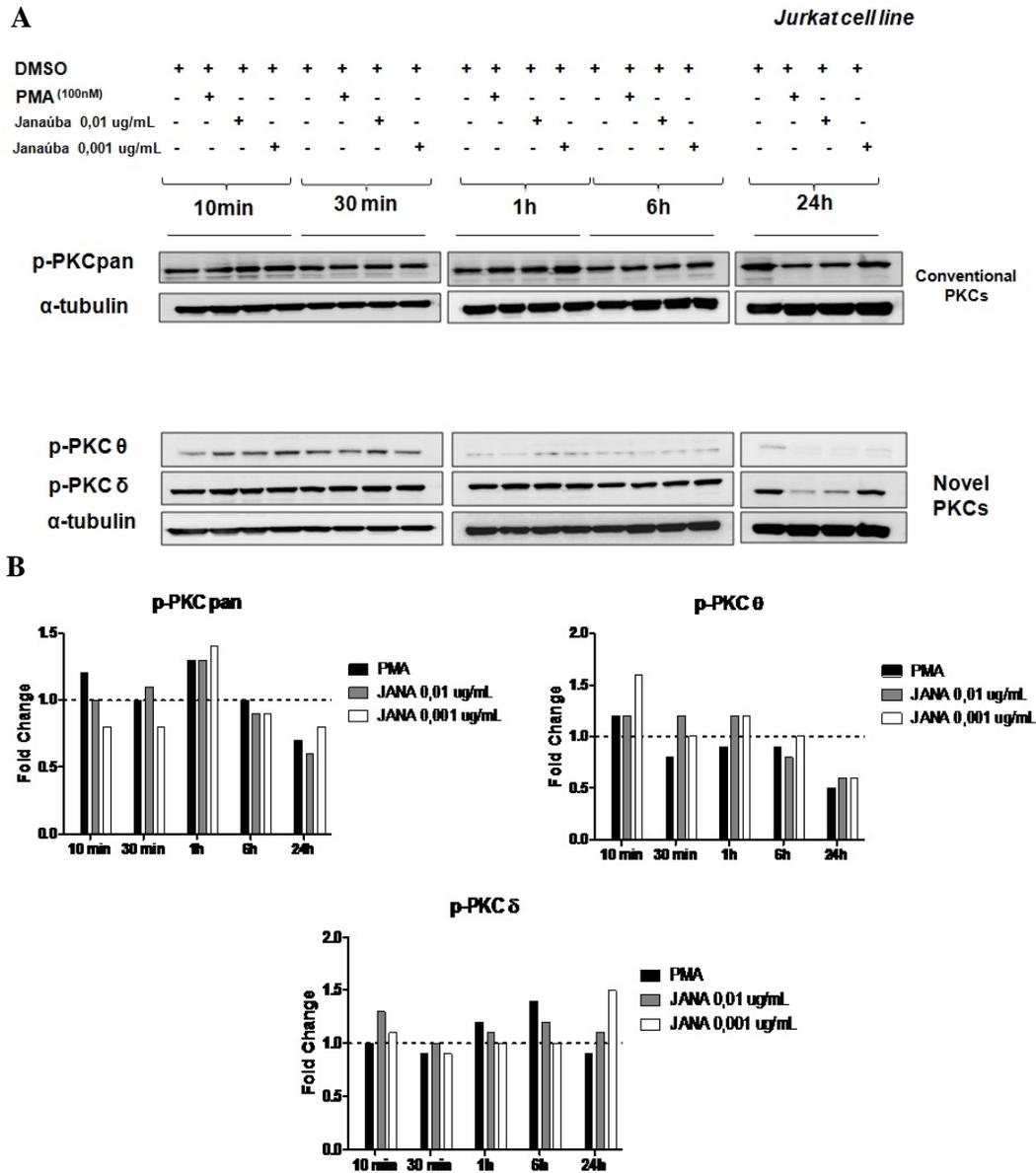


Figure 4. Panel of phosphorylation of different PKC isoforms after treatment with JALEx.

(A) Jurkat cells were treated with two different concentrations of **JALEx** (0.01 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and 0.001 $\mu\text{g} / \text{mL}$), PMA (1 μM) as positive control, at different time intervals (10, 30 minutes, 1, 6 and 24 hours). Then the cells were lysed for western blotting with phosphorylated anti-PKC antibodies (pan, δ , θ) and anti-tubulin as the loading control. (B) The intensity of the western blotting bands corresponding to the Jurkat cells in (A) that were quantified by densitometry with the aid of the Image J program.

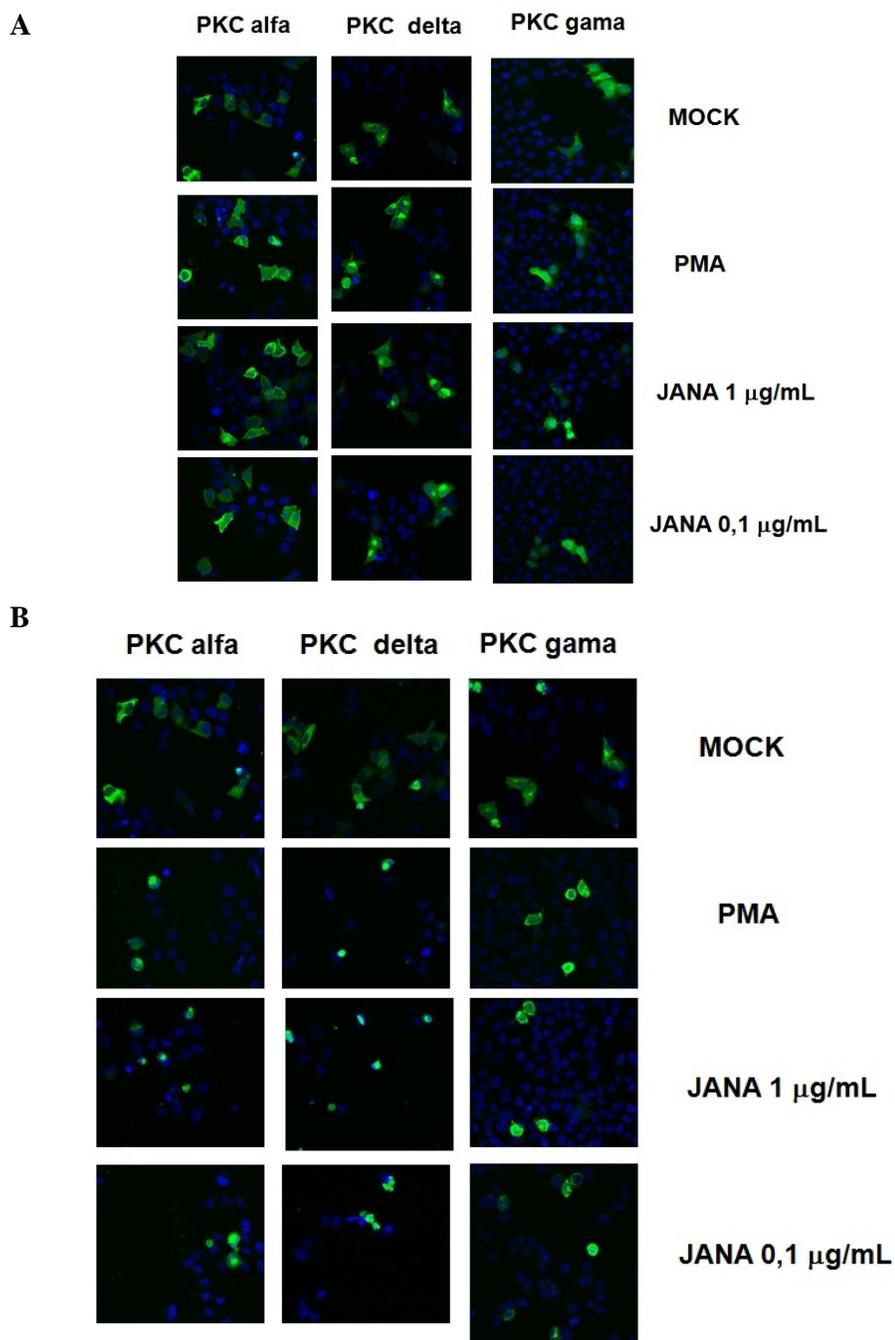
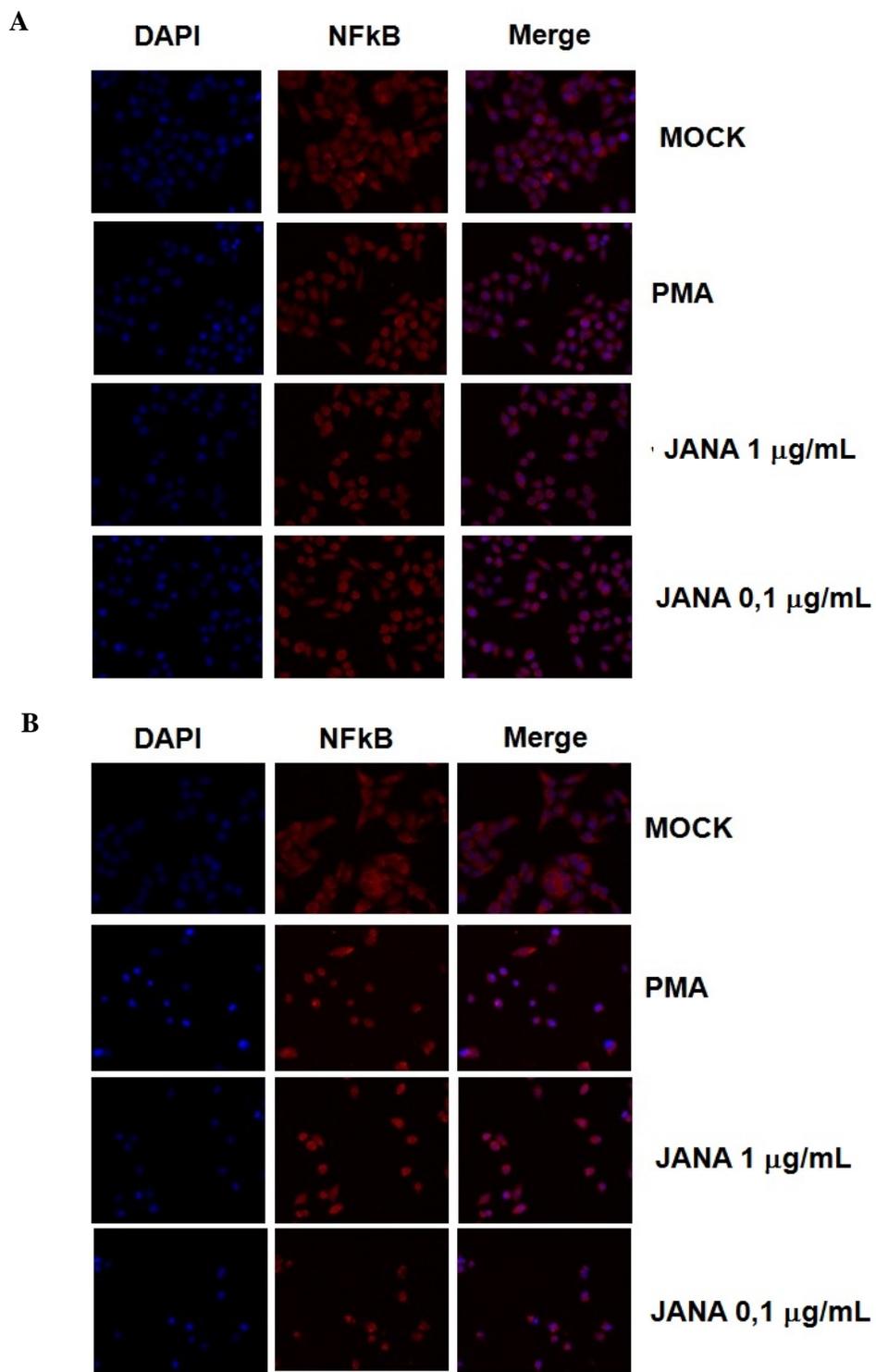


Figure 5: JALEx is responsible for the cellular relocation of PKC isoforms. Cellular location analysis of different PKC (alpha, delta and gama) isoforms after treatment of HeLa cells with two concentrations of **JALEx**: 1 µg / mL and 0.1 µg / mL. (A) HeLa cells were transfected with 3 different PKC isoforms for 24 h. After this time the cells were treated for 10 minutes with the two concentrations of Janauba. (B) HeLa cells were transfected with 3 different PKC isoforms for 24 h. After this time the cells were treated for additional 24 hours with the two concentrations of Janauba. As a positive control, PMA (1 µM) was used.



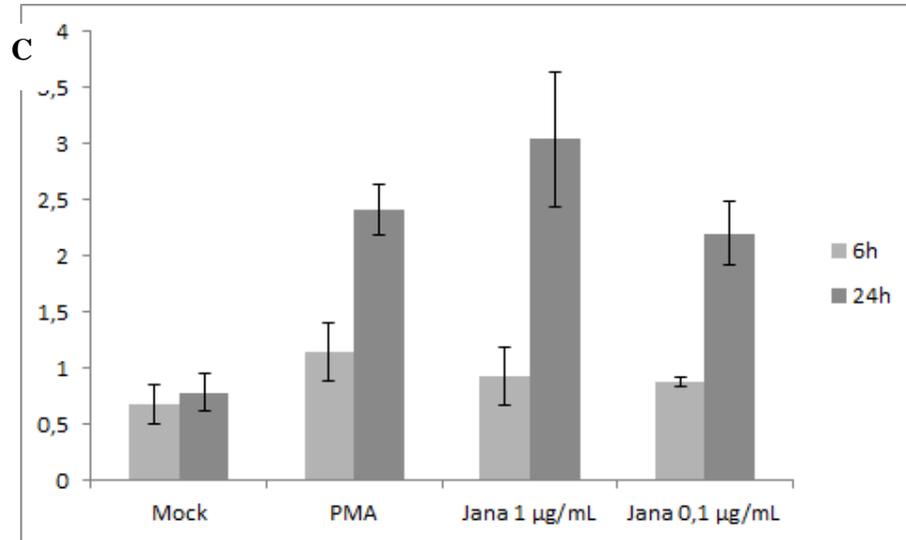


Figure 6: . JALEx -mediated transcriptional activation is dependent on NFκB activation. HeLa cells were treated with two concentrations of the **JALEx** (1 and 0.1 µg / mL) for 6 hours (A) and 24 hours (B). After these time intervals, the cells were subjected to immunofluorescence for labeling of NFκB, in red and cell nucleus, in blue. As a positive control, PMA (1 µM) was used. (C) Graph of the quantification of cells showing NF-κB translocation. An average value of the fluorescence intensity between the nucleus and the cytoplasm of 100 HeLa cells was calculated under all conditions, at the time intervals of 6 and 24 h after the treatments.

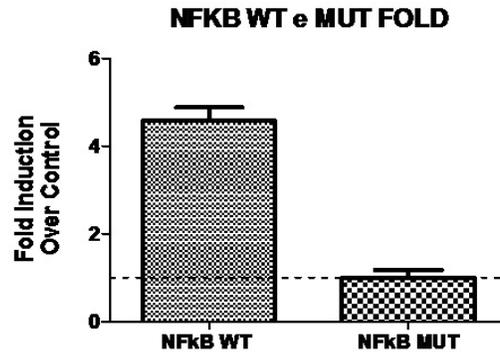


Figure 7.: The transcriptional activation of NFκB by JALEx is dependent on the NFκB binding site. Jurkat cells were transfected with pBlue30LTR-Luc (NF-κBWT) and the mutant construct, pBlue30LTRNF-κB MUT-Luc (NF-κB MUT), absent from the NFκB binding site, preventing its interaction with NFκB. After transfections, the cells were treated with 1 µg / mL of the **JALEx** for 24 hours and luciferase expression was measured after lysis of the cells. The fold-change of the luciferase expression between the wild-type plasmid and the mutant is shown in the graph.

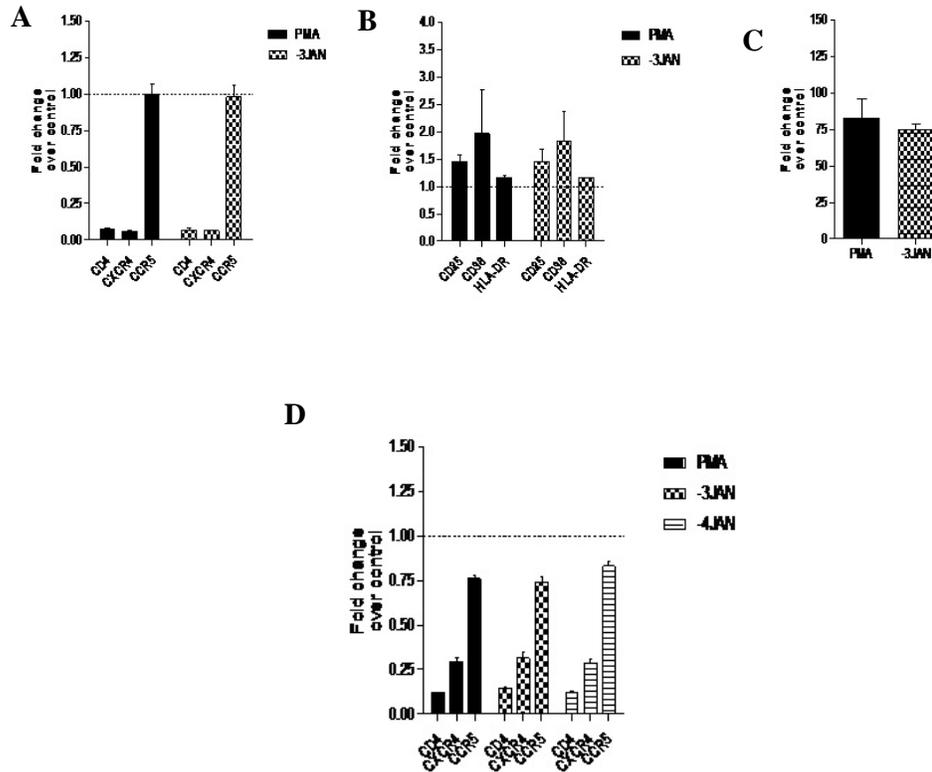


Figure 8: JALEx modulates the expression of cell surface receptors and activation markers in CD4 + T cells and lymphocytic lineage. TCD4 + cells were isolated from PBMCs from 4 healthy donors and treated for 24 hours with **JALEx**. After this period, the expression of some surface molecules was evaluated. (A) Expression of the CD4 receptor and CCR5 and CXCR4 co-receptors in CD4 + T cells isolated after treatment with **JALEx**. (B) Expression of CD25, CD38 and HLA-DR activation markers in CD4 + T cells isolated after treatment with **JALEx**. (C) Expression of the CD69 activation marker on CD4 + T cells isolated after treatment with janauba extract. The black bar represents the positive control (PMA 1 µM) and the hatched bar represents the treatment with 10 µg / mL of **JALEx**. (D) Expression of receptor and co-receptor molecules - CD4, CCR5, CXCR4 in lymphocyte MT4 cells. The black bar represents the positive control (PMA 1 µM) and the hatched bar represents the treatment with 10 µg / mL of **JALEx** and the striped bar represents the treatment with 1 µg / mL of **JALEx** (n=4).

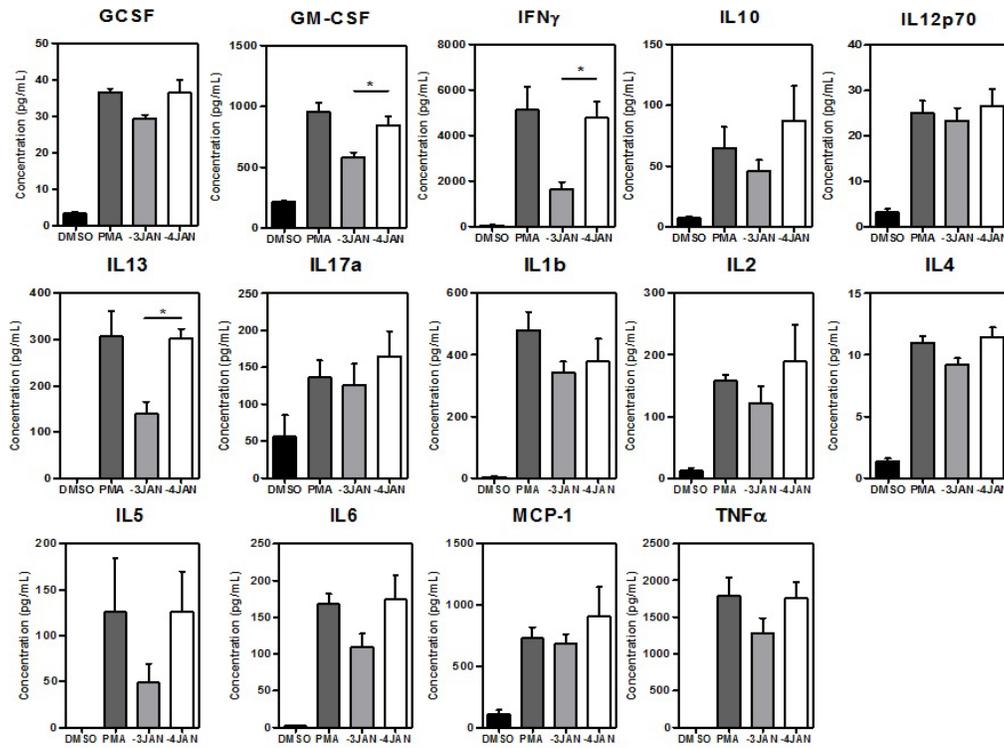


Figure 9: . Cytokine profile produced by peripheral blood primary cells after treatment with JALEx.

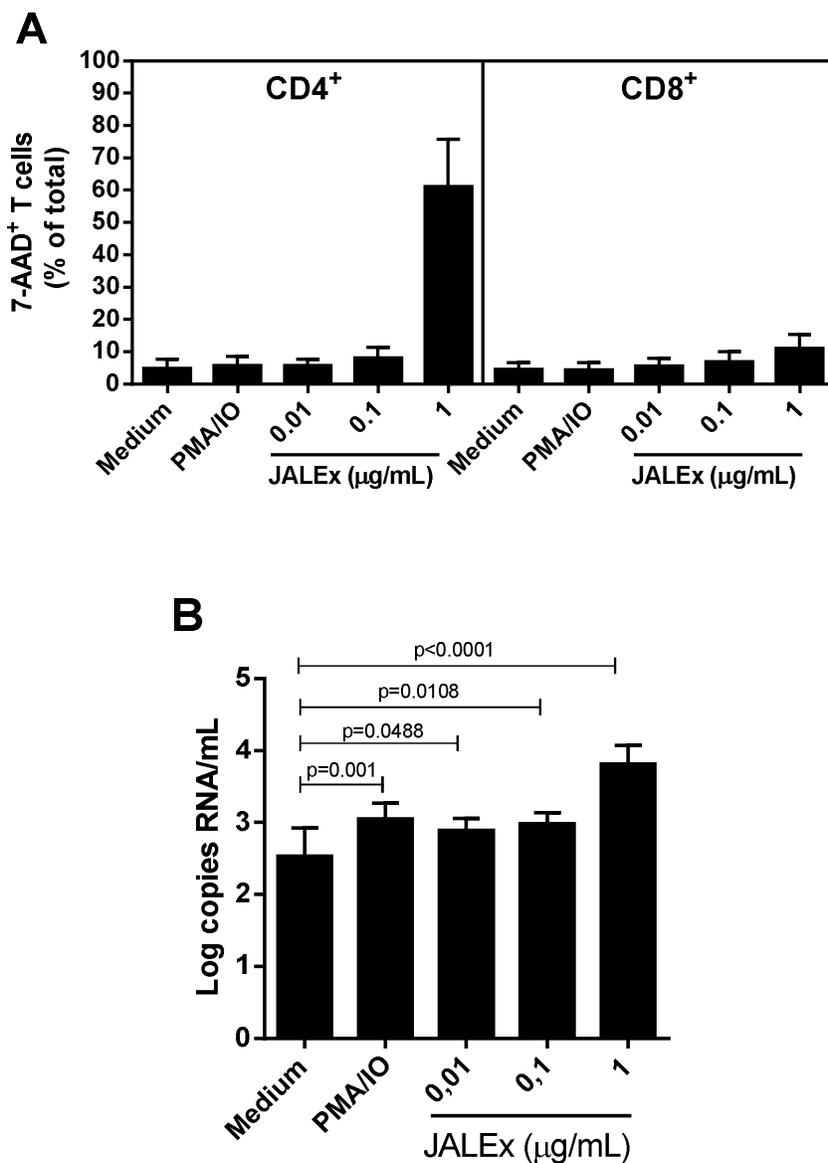


Figure 10. Effect of JALEx on T cell viability and HIV-1 replication in PBMC cultures from AIDS patients. Different concentrations of JALEx (0.01, 0.1 and 1 μg/mL) were added to PBMC cultures (1×10^6 /mL) obtained from 15 AIDS patients, and 24h after, the (A) CD4⁺ and CD8⁺ T cells viability was analyzed by FACS after 7-AAD staining, and (B), the number of HIV-1 into supernatants was determined through RT-PCR.

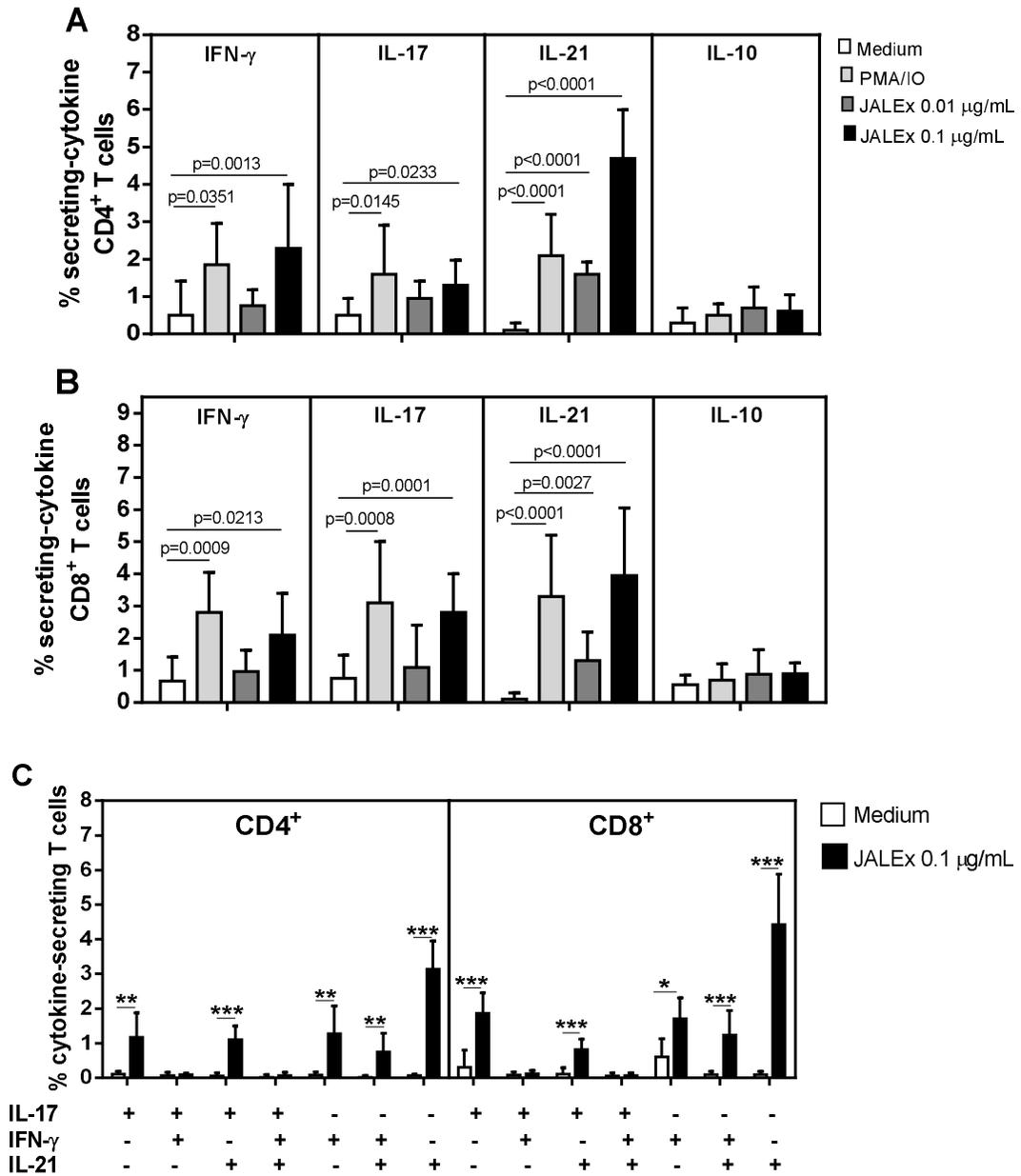
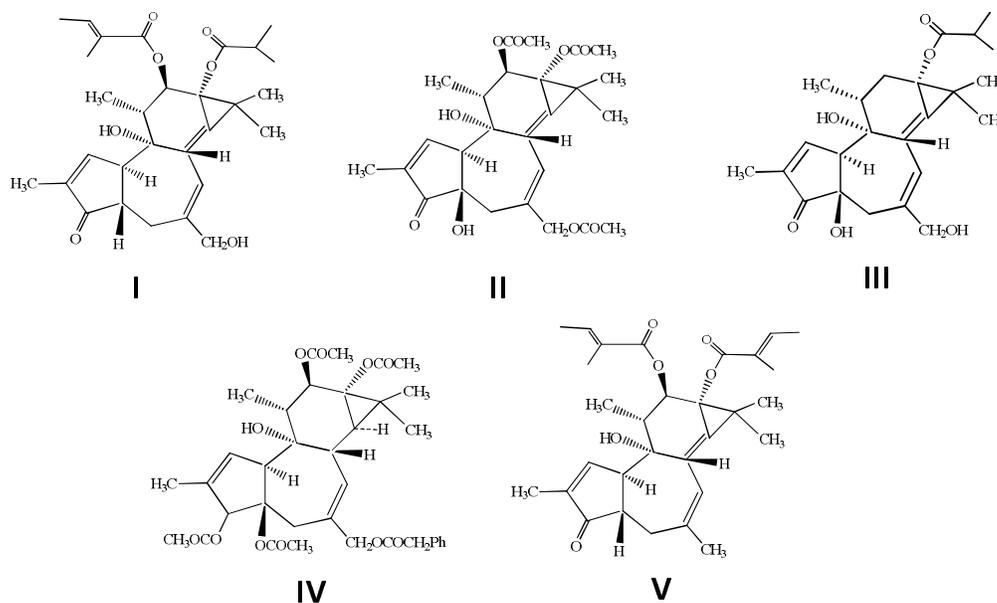


Figure 11. Ability of JALEx in modulating the frequency of cytokine-secreting T cells from AIDS patients. AIDS-derived PBMC cultures (1×10^6 /mL, $n=15$) were maintained for 24h in the presence of medium alone or with different JALEx (0.01 and 0.1 $\mu\text{g/mL}$). As positive control, some well receiving PMA plus ionomycin (PMA/IO). The percentage of CD4⁺ (A) and CD8⁺ (B) T cells producers of IFN- γ , IL-17, IL-21 and IL-10 was determined by cytometry. In (A) and (B), the mean values were compared and the p values are shown in the figures. In (C), the proportion of different (CD4⁺ and CD8⁺) T cell subsets of secreting different combinations of IL-17, IFN- γ and IL-21 in response to JALEx (0.1 $\mu\text{g/mL}$) was also evaluated by cytometry. In the figure, (*), (**), and (***) indicate $p<0.05$, $p<0.001$ and $p<0.0001$, respectively.

Supplemental data

Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 1-Phorbol esters isolated from *Euphorbia umbellata*. I = 12-O-Tigloyl-4-deoxyphorbol-13-isobutyrate; II = Phorbol-12,13,20-triacetate; III = 12-Deoxyphorbol-13-(12-methylpropionate); IV = 3,4,12,13-Tetraacetylphorbol-20-phenylacetate (synagrantonol A); V = Deoxyphorbol-12,13-ditiglate (synagrantonol B).

Supplemental Table 1

Table 1- QVOA results using macaques CD4+ T Lymphocytes extracted from SIV 251 infected Macaques treated with HAART therapy.

| Cells/well ^a | No mitogen | Con A | Ingenol B | JALEx |
|---------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| 1.25e5 | + / - / - ^b | - / - / - | + / - / + | + / + / + |
| 6.25e4 | - / - / + | - / + / + | + / + / - | + / + / + |
| 3.1e4 | + / - / + | - / - / + | - / + / + | + / + / + |
| Maximum likelihood (IUPM) | 7.735675 | 5.229369 | 15.525127 | 34.986678 |
| 95% CI | {2.866090, 20.878852} | {1.680200, 16.275622} | {6.619641, 36.411279} | {12.619641, 66.411279} |

^a- Number of CD4+ T Lymphocytes extracted from SIV 251 infected Macaques treated with HAART therapy inoculated in each well. ^b- Number of well with p27 antigen positive. Con A: