



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA –
CITA

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS
DE PLANTAS MEDICINAIS OCORRENTES EM RIO
BRANCO

PEDRO JUNIOR PINHEIRO MOURÃO

RIO BRANCO, AC
Junho/2018

PEDRO JUNIOR PINHEIRO MOURÃO

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS
DE PLANTAS MEDICINAIS OCORRENTES EM RIO
BRANCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito para obtenção do título de **Mestre em Ciências e Inovação Tecnológica**.

Orientador: Profº Dr. Emmerson Côrrea Brasil da Costa

Co-orientador: Profº Dr. Adriano Antonio Silva

RIO BRANCO, AC

Junho/2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E
TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA – CITA

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS DE
PLANTAS MEDICINAIS OCORRENTES EM RIO BRANCO

PEDRO JUNIOR PINHEIRO MOURÃO

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: _____

EMMERSON CÔRREA BRASIL DA COSTA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE

CARROMBERTH CARIOCA FERNANDES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE

WAGNER DE JESUS PINTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE

.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Emmerson C. Brasil da Costa, a grande mente por trás deste trabalho, que acreditou no meu potencial desde o começo e me ensinou o que é ser um pesquisador.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Adriano Silva, que foi meu professor de Química na graduação e me ensinou grande parte do que eu sei sobre extratos e separação de partículas no CITA. Seu conhecimento foi de grande ajuda na minha pesquisa.

Ao meu amigo Alexandre Oliveira Cavalcante, que me ajudou nos momentos difíceis. Quando achei que não conseguiria, você estava do meu lado. Pela paciência em me ajudar a coletar a grande maioria das plantas que utilizei no meu trabalho, sem ele não estaria aqui.

À minha família, especialmente à minha mãe que me deu o que somente a melhor mãe do mundo poderia me dar: incentivo a ser alguém melhor do que eu poderia ser. Obrigado por todos os beijos, por todos os abraços, por todos os conselhos, por todas as chatices, por me amar mesmo do jeito que eu sou. O que eu sou hoje, eu devo tudo a senhora.

À Mônica Silva, que eu mal conhecia, mas criei uma grande amizade por ela. Por todas as tardes que passamos no laboratório evaporando extrato, particionando extrato, raspando extrato, obrigado por toda sua ajuda. Ao Andson Lima, que chegou ao laboratório só depois que eu voltei do Rio, mas me acompanhou bastante nessa última parte do projeto. Obrigado pelas tardes coletando plantas para a preparação das exsiccatas. Ao Marcos Souza, que nem é participante do meu projeto, mas sempre foi um grande amigo com quem gosto de dar risadas. À Eliene Botelho, que também me ajudou em parte da extração e adorava conversar sobre GoT. E à Genilda Andrade que também conheci somente depois do meu retorno, mas se tornou uma grande e querida amiga por quem tenho grande consideração. Nossas tardes serão para sempre lembradas.

À minha grande amiga e conselheira Auryane Rodrigues, que veio de tão longe só para morar aqui no meu coração. Obrigado pelas tardes em que passamos ajudando um ao outro nas nossas dissertações, pelos risos, pelos almoços, por tudo. Te considero minha amiga para sempre. *Dracarys* pra você!

Aos meus professores do Programa de Pós Graduação-CITA que contribuíram com seus conhecimentos para a minha pesquisa, especialmente à Clarice Carvalho e Dionatas Meneguetti, que me ajudam desde os primórdios da graduação e foram os avaliadores do meu projeto de mestrado.

Aos meus amigos e colegas do CITA, especialmente ao Efraim que me ajudou na disponibilização de material vegetal para os meus extratos.

Ao Prof. Dr. Amilcar Tanuri, que abriu suas portas para que eu pudesse realizar minha pesquisa em seu laboratório e teve toda a paciência de me aconselhar na organização dos meus resultados.

Ao Dr. Rodrigo Delvecchio, meu parceiro de videokê, que me ensinou tudo o que eu sei hoje sobre cultura de células, por ter deixado suas tarefas de lado para ter a paciência em me ensinar, pela sua amizade e pelos bons momentos que passei no Rio de Janeiro.

Aos meus amigos que fiz quando estive no Laboratório de Virologia Molecular da UFRJ. Agradeço pela recepção calorosa que me deram e pela despedida também. Apesar das piadas sobre o Acre, eu sei que vocês serão meus amigos para sempre. Especialmente aos meus companheiros de RU, Mariane e Fábio, que tiveram grande papel em me ajudar a não me perder no Rio de Janeiro e me proporcionaram ótimos momentos inesquecíveis. À Luiza Higa, que desde o primeiro dia me ajudou nos bons e maus momentos. À Paula Pezzuto, que apesar de ter me dado vários bolos, foi uma grande amiga que fiz. À Luciana Pessoa e Diana pelas ótimas horas de companhia, risos e cantoria. Ao Átila e Taila, pelo ótimo senso de humor. À Alice que conheci tão pouco, mas se mostrou ser uma ótima amiga.

A CAPES que financiou a bolsa de estudos do meu mestrado e tornou possível que eu pudesse realizar minha pesquisa em outro estado.

E ao Programa de Pós-Graduação CITA por ter me disponibilizado a oportunidade de participar do programa.

“Para as coisas importantes,
nunca é tarde demais ou muito cedo,
para sermos quem queremos.
Não há um limite de tempo,
comece quando quiser.
Você pode mudar ou não.
Não há regras.
Podemos fazer o melhor ou o pior.
Espero que você faça o melhor.
Espero que veja as coisas que o assustam.
Espero que sinta coisas que nunca sentiu antes.
Espero que conheça pessoas com diferentes opiniões.
Espero que tenha uma vida da qual se orgulhe.
Se você achar que não tem, espero que tenha forças para começar novamente”

Benjamin Button

RESUMO

As plantas e compostos derivados de plantas continuam a ser importantes para a descoberta e o desenvolvimento de novos medicamentos antivirais. Entretanto, apenas uma pequena porcentagem da diversidade existente no país é estudada para este fim. Assim, a análise de novas atividades biológicas ainda não descritas em plantas medicinais provenientes da Amazônia é de vital importância já que a mesma possui uma grande diversidade de espécies vegetais a serem estudadas. O objetivo deste trabalho, portanto, foi investigar a atividade antiviral *in vitro* de 76 extratos vegetais contra o vírus HIV-1. Para a produção dos extratos foi realizada maceração exaustiva em etanol com folhas, flores, casca ou frutos de plantas, seguido da partição em hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol. Células Vero foram utilizadas para avaliar citotoxicidade. Células MT-4 foram utilizadas para realizar a seleção dos extratos, o ensaio antiviral contra o HIV-1 e também para o teste de *downregulation* de moléculas CD4. Células J-Lat 8.4 e 10.6 também foram utilizadas para realizar o ensaio da reativação do vírus HIV latente. Inibidores de Proteína Quinase C (PKC) também foram utilizados nos testes para verificar possível via de ação. Os resultados demonstram que o extrato de *Jatropha gossypifolia*, dentre todos os testados, tem o maior potencial de inibição contra o HIV com $IC_{50} = 23,1 \mu\text{g/mL}$. Os testes com reativação mostraram que o extrato consegue reativar o provírus latente em 4% e 32% em células J-Lat 8.4 e 10.6, respectivamente, ao passo que no teste da *downregulation* podemos observar uma redução de 75% das moléculas CD4 da superfície das células. Também foi observado que na presença do inibidor GÖ6983 e RO-31-8220 a atividade de reativação e *downregulation* foi inibida comprovando que o composto bioativo presente no extrato age através da via de PKC. Conclui-se, portanto que o extrato vegetal da espécie *J. gossypifolia* apresenta compostos com potencial antiviral e de reativação contra o HIV-1.

Palavras-chave: Plantas medicinais; Amazônia; HIV; PKC.

ABSTRACT

Plant and its derived compounds are still important for the discovery and development of new antiviral drugs. However, only a small percentage of the great diversity on the country is studied for this purpose. Thus, the analysis of new biological activities not yet described in medicinal plants from the Amazon is very important since it has a great diversity of vegetal species to be studied. The aim of this study was to investigate the *in vitro* antiviral activity of 76 plant extracts against HIV-1. Extractive maceration in ethanol with leaves, flowers, bark or fruits of plants was performed for the extracts, followed by the partition in hexane, dichloromethane, ethyl acetate and n-butanol. Vero cells were used to evaluate cytotoxicity. MT-4 cells were used for the selection of extracts assay, the antiviral assay against HIV-1 and also for the *downregulation* test of CD4 molecules. J-Lat cells 8.4 and 10.6 were also used to perform latent HIV virus reactivation assay. Inhibitors of Protein Kinase C (PKC) were also used in the tests to check for possible pathway of action. The results showed that *Jatropha gossypifolia* extract, among all tested, has the highest potential for inhibition against HIV with $IC_{50} = 23.1 \mu\text{g} / \text{mL}$. The reactivation tests showed that the extract can reactivate the latent provirus by 4% and 32% in J-Lat 8.4 and 10.6 cells, respectively, whereas in *downregulation* assay we can observe a reduction of 75% of the surface CD4 molecules cells. It was also observed that in the presence of the inhibitor GÖ6983 and RO-31-8220 the reactivation and *downregulation* activity was inhibited proving that the bioactive compound present in the extract acts through the PKC pathway. It is concluded, therefore, that plant extract of *J. gossypifolia* specie has compounds with antiviral and reactivation potential against HIV-1.

Keywords: Medicinal plants; Amazon; HIV; PKC.

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Estrutura do vírus HIV.	4
Figura 2.	Representação esquemática do ciclo de replicação do HIV em células T CD4+.	5
Figura 3.	Etapas envolvidas no mecanismo da modulação da PKC no processo de regulação positiva do HIV-1 latente.	8
Figura 4.	Estrutura química de quatro compostos da família tigliane.	10
Figura 5.	Imagem ilustrativa da espécie <i>Jatropha gossypifolia</i> conhecida como pinhão roxo em seu hábitat natural.	16
Figura 1.	Viabilidade de células MT-4 na seleção dos extratos vegetais contra a infecção por HIV (NL-4.3).	37
Figura 1.	Viabilidade celular de células MT-4 tratadas com diferentes concentrações do extrato JGDM.	48
Figura 2.	Atividade antiviral do extrato JGDM frente a infecção do vírus HIV-1 em células MT-4.	49
Figura 3.	Ilustração do perfil do potencial de reativação do HIV latente utilizando diferentes moléculas em diferentes modelos celulares visto por citometria de fluxo.	51
Figura 4.	Potencial de reativação do HIV-1 latente em células J-Lat 8.4 e 10.6 tratadas com extrato JGDM em várias concentrações.	52
Figura 5.	Potencial de reativação do HIV-1 latente em células J-Lat 10.6 tratadas com inibidores de PKC e o extrato JGDM.	52
Figura 6.	Potencial de <i>downregulation</i> de moléculas CD4 da superfície de células MT-4 pelo JGDM em diferentes concentrações.	54
Figura 7.	Potencial de <i>downregulation</i> de moléculas CD4 da superfície de células MT-4 pelo JGDM na presença dos inibidores da via de PKC.	55

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Quadro 1. Concentração máxima não tóxica (> 60%) dos extratos particionados frente às células Vero e Huh-7 tratadas nas concentrações de 500, 100 e 20 µg/mL.	34

SUMÁRIO

		Pág.
1.	INTRODUÇÃO GERAL	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)	3
2.1.1	Aspectos gerais do hiv	3
2.1.2	Ciclo de replicação	4
2.1.3.	Latência, mecanismo de reativação e agonistas da PKC	7
2.2	PLANTAS MEDICINAIS E A BUSCA POR FITOTERÁPICOS ANTIVIRAIS.....	11
2.2.1.	Importância do estudo de plantas medicinais	11
2.2.2.	Atividade antiviral de plantas medicinais	12
2.2.3.	Família Euphorbiaceae (Jussieu, 1789)	13
2.2.4.	Gênero <i>Jatropha</i>	14
2.2.5.	A espécie <i>Jatropha gossypifolia</i> L.	15
2.3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
3.	OBJETIVOS	28
3.1	OBJETIVO GERAL	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4.	CAPÍTULO I	29
4.1	INTRODUÇÃO	30
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.4	CONCLUSÃO	38
4.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
5.	CAPÍTULO II - Efeito do extrato de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. (bellyache bush) na atividade antiviral, reativação do vírus latente e inibição da infecção <i>De Novo</i> do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1)	41
5.1	INTRODUÇÃO	42
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	44
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.4	CONCLUSÃO	56
5.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO GERAL

Durante muito tempo as plantas medicinais foram o principal recurso para tratar as doenças, porém, com os avanços no meio técnico-científico, sobretudo no âmbito das ciências da saúde, novas maneiras de tratar e curar as doenças foram surgindo, como o uso de medicamentos sintéticos que gradativamente foram introduzidos no cotidiano das pessoas e substituindo o uso das plantas medicinais. (BADKE et al., 2011).

Mesmo assim, as plantas continuam sendo estudadas no meio científico na pesquisa por novos compostos já que diversos potenciais terapêuticos são apresentados pelos extratos vegetais a cada dia, como, por exemplo, contra vírus, fungos e bactérias (BARBOSA et al., 2008; RATNOGLIK et al., 2014; SETTE-DE-SOUZA et al., 2014).

Segundo estudos, estes microorganismos continuam sendo um problema de saúde pública no Brasil apesar da redução considerável no número de mortes causadas por doenças infecciosas nas últimas seis décadas no mundo (LIMA et al., 2008).

O número de casos com pessoas mortas pela síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), por exemplo, tem diminuído devido ao desenvolvimento e acesso gratuito à terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) (CROXFORD et al., 2017). Entretanto, ainda existe uma forte necessidade do desenvolvimento de novos agentes antivirais para o tratamento desta infecção viral com risco de vida, já que o HIV, apesar da disponibilidade de uma série de medicamentos aprovados, apresenta limitações como o alto risco do surgimento de vírus resistentes e outros efeitos, especialmente no contexto da terapia de longo prazo, e acesso incompleto a terapias com custos acessíveis nas zonas de recursos limitados (REBENSBURG et al., 2016).

Assim, a avaliação do potencial antiviral de plantas medicinais provenientes do nosso bioma, a Amazônia, é de vital importância já que o mesmo possui uma grande número de espécies vegetais com uma variedade ainda maior de metabólitos secundários a serem estudados, porém menos de 1% das espécies vegetais brasileiras já foram analisadas sob o ponto de vista químico e farmacológico (PINTO et al., 2002).

Portanto, a estrutura deste trabalho, realizado em forma de capítulos, será distribuído de forma que no capítulo 1 serão tratados os processos realizados para a coleta das espécies utilizadas no estudo, a extração dos metabólitos secundários de plantas medicinais ocorrentes em Rio Branco (Acre) e os resultados do *screening* realizado com esses extratos frente o vírus HIV-1 em cultura de células.

No capítulo 2, por sua vez, teremos a apresentação do artigo científico produzido com os resultados dos testes realizados com a espécie a qual apresentou melhores resultados frente o vírus HIV-1.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)

2.1.1 Aspectos gerais do HIV

Estima-se que mais de 33 milhões de pessoas vivem com HIV no mundo e cerca de 25 milhões já morreram em consequência da doença (WANG et al., 2016). Sabe-se que esses números aumentam a cada dia devido à falta de informação e o tempo de surgimento dos primeiros sintomas desde o início da infecção viral e assim as estimativas vêm mascarando a natureza dinâmica dessa evolução epidêmica em relação a mudanças temporais, distribuição geográfica, diversidade viral e modo de transmissão (SIMON et al., 2006).

Etiologicamente, os agentes responsáveis pela AIDS são os Vírus da Imunodeficiência Humana tipo-1 e tipo-2 (HIV-1 e HIV-2), ambos retrovírus pertencentes à família dos lentivírus, sendo que o HIV-1 foi o primeiro agente a ser isolado em 1983 se tornando o principal responsável pela pandemia a nível mundial. Acredita-se que HIV-1 tenha tido origem no Vírus da Imunodeficiência Símia de chimpanzés, denominado VIScpz, tendo sido transmitido dos chimpanzés para os humanos (CLAVEL et al., 1986; CLAVEL et al., 1987).

O HIV-2 foi identificado posteriormente em 1986, tendo origem no Vírus da Imunodeficiência Símia de macacos *sooty mangabey* (VISsm) existente na costa ocidental de África, do Senegal à Costa do Marfim, no entanto, difere significativamente em algumas das suas propriedades antigénicas e moleculares do HIV-1, o que o torna o menos virulento e o responsável por epidemias mais localizadas, nomeadamente nos países da África Ocidental e em alguns Europeus (CLAVEL et al., 1987; COCK; BRUN-VÉZINET; SORO, 1995).

O HIV-1 mede cerca de 110 nm, apresenta forma esférica e é constituído por um nucleocapsídeo em forma de cone, composto pela proteína p24, que contém duas cópias de RNA fita simples não segmentado e enzimas virais - integrase, protease e transcriptase reversa (BRIGGS et al., 2003). Circundando o nucleocapsídeo, encontra-se a proteína da matriz, p17, e logo acima, associada à matriz está o envelope lipídico, derivado da membrana plasmática do hospedeiro no momento da maturação da partícula viral (FIORENTINI et al., 2006). Associada à membrana encontram-se os complexos glicoproteicos, formados pela glicoproteína transmembrana gp41 e a gp120, uma glicoproteína de superfície ligada não-covalentemente à gp41 (PANCERA et al., 2010) (Figura 1).

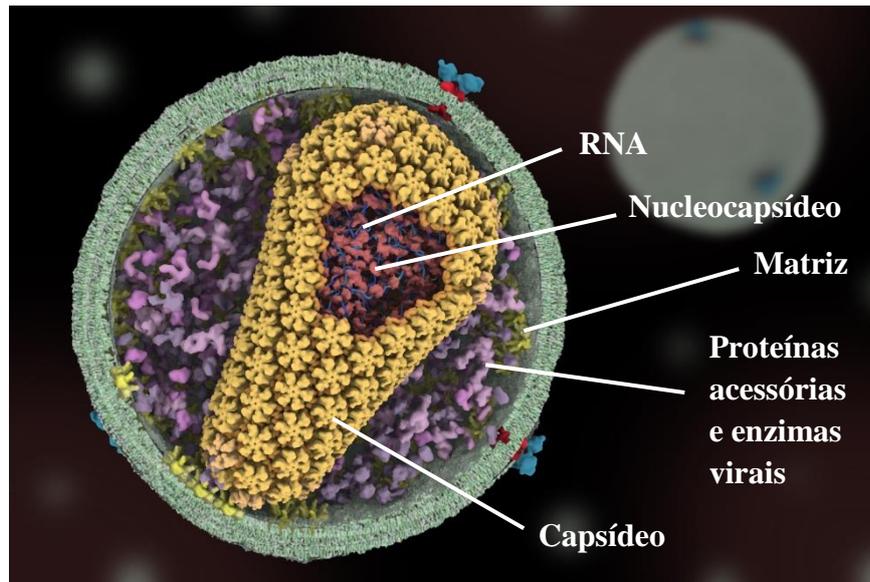


Figura 1. Estrutura do vírus HIV. Representação esquemática correspondente à partícula do vírus HIV identificando a molécula de RNA presente no núcleo do vírus, envolto por um nucleocapsídeo, coberto por um capsídeo. No citoplasma do vírus identificam-se proteínas acessórias e enzimas virais envolvidas por proteínas da matriz.

FONTE: <http://scienceofhiv.org/wp/?portfolio=hiv-entry>

O HIV-1 diferentemente de outros retrovírus apresenta uma complexidade grande no seu genoma, apresentando além dos 3 genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*) presente em todos os lentivirus, ele contém tipicamente de 3 a 6 genes acessórios/regulatórios conhecidos como *vif*, *vpr* e *vpu* (acessórios) e *nef*, *tat* e *rev* (regulatórios). Esses genes controlam a transcrição, processamento de RNA, montagem do vírion, expressão de gene do hospedeiro e outras funções de replicação (WATTS et al., 2009).

A principal diferença sorológica entre eles está, especificamente, na proteína de superfície gp120, que os separa em dois grupos distintos, mas mantém em 40% o nível de homologia entre os vírus (KANNANGAI et al., 2012), enquanto que a variabilidade genética entre o HIV-1 e o HIV-2 é de aproximadamente 25% de divergência nos genes estruturais *gag*, *pol* e *env* (REEVES; DOMS, 2002). Além disso, nas extremidades do genoma do HIV são encontradas longas repetições terminais (LTR - Long Terminal Repeats), as quais regulam os eventos de transcrição e possibilitam a integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira (BRASS et al., 2008).

2.1.2 Ciclo de replicação

O ciclo de replicação de HIV-1 é caracterizado pela existência de duas fases: a fase inicial e fase tardia, sendo que é na fase inicial que se dá o reconhecimento de linfócitos T CD4+, principalmente, por parte dos virions, o que engloba todo o processo de entrada e

integração do DNA viral no genoma da célula (WILEN; TILTON; DOMS, 2012). Tal entrada na célula ocorre mediante a fusão das membranas viral e celular, processo mediado pelas duas glicoproteínas existentes no envelope viral: gp120 e gp41. A subunidade gp120 liga-se ao receptor celular CD4 induzindo alterações conformacionais no envelope glicoproteico expondo um domínio altamente conservado, anteriormente inacessível, que se liga a um co-receptor (por exemplo, CCR5 ou CXCR4) (YVOON et al., 2010). A ligação ao co-receptor induz, por sua vez, alterações conformacionais ao nível da subunidade gp41 resultando na fusão das membranas viral e celular (CHEN; XIAO; DIERICH, 2000). Após a fusão, o conteúdo da partícula viral, constituído principalmente pelo RNA genômico e por enzimas (transcriptase reversa, integrase e protease), é libertado para o citoplasma da célula (SHERMAN; GREENE, 2002). Em seguida, a enzima transcriptase reversa catalisa o processo de transcrição do RNA numa cópia de DNA, a qual é, posteriormente, transportada para o núcleo (BARRÉ-SINOUSSE; ROSS; DELFRAISSY, 2013) (Figura 2).

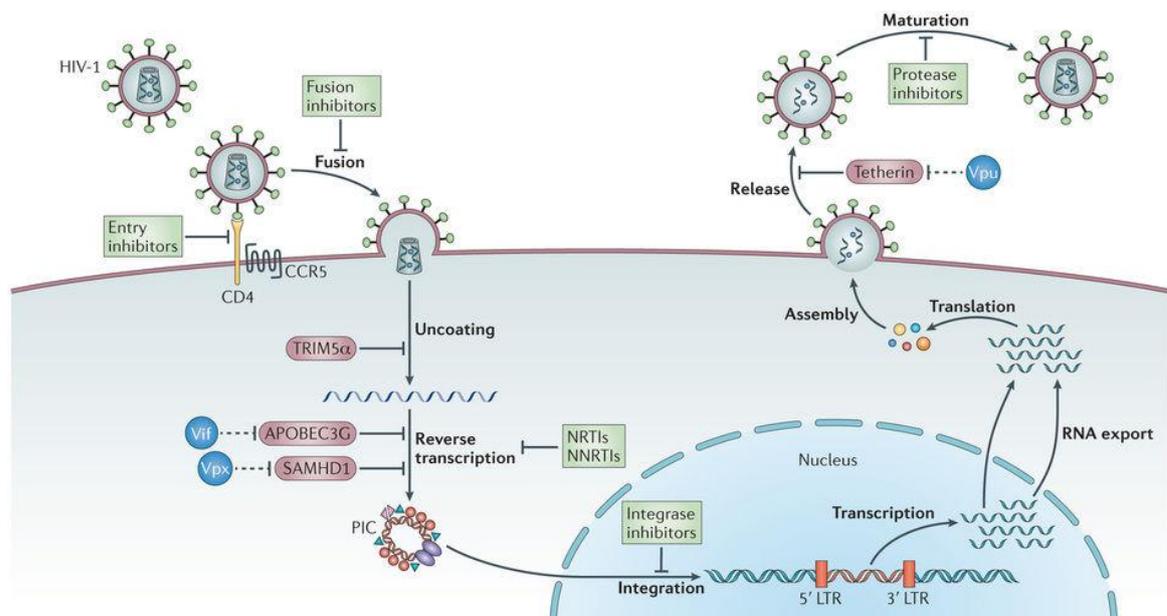


Figura 2. Representação esquemática do ciclo de replicação do HIV em células T CD4+.

A figura ilustra os principais passos no ciclo de replicação de HIV-1: ligação ao receptor CD4 e co-receptores (Entry); fusão com a membrana celular hospedeira (Fusion); desenrolamento do cápsideo viral (Uncoating); liberação do RNA do HIV e proteínas no citoplasma; transcrição reversa do RNA viral para DNA (Reverse Transcription); formação do complexo de pré-integração (PIC); e translocação para o núcleo, onde o DNA viral é integrado ao DNA do hospedeiro (Integration) e subsequentemente transcrito e transplantado para formar novos RNAs virais e proteínas virais (Transcription) que se translocam para a superfície celular para montarem novas formas de vírus imaturos (RNA export e Translation). Os novos vírus então são lançados (Assembly e Release) e durante a maturação, a enzima protease cliva a poliproteína estrutural para formar proteínas *Gag* maduras, resultando na produção de novos viriões infecciosos (Maturation).

Fonte: BARRÉ-SINOUSSE et al., 2013

Uma vez no núcleo, o DNA é integrado no genoma da célula por intermédio da enzima viral integrase, originando um provírus capaz de sintetizar os mRNAs que codificam para proteínas estruturais, reguladoras e acessórias, necessárias à replicação viral (CRAIGIE; BUSHMAN, 2012). Depois de integrado, o DNA viral permanece continuamente associado ao material genético da célula hospedeira, ou seja, a informação genética viral passa a fazer parte integrante do genoma da célula, podendo permanecer neste estado durante algum tempo sem que haja a produção de novas partículas virais (CARY; FUJINAGA; PETERLIN, 2016).

A fase tardia tem início como resultado do metabolismo natural das células hospedeiras, onde o DNA contendo o genoma viral é transcrito, processo este catalisado pela enzima celular RNA polimerase II resultando na síntese de mRNA viral posteriormente transportado para o citoplasma (BARRÉ-SINOUSSE et al., 2013). O HIV-1 usa um esquema sofisticado onde recruta o fator positivo B de alongamento da transcrição (P-TEFb) humano e outros cofactores para a LTR para produzir transcritos de HIV-1 de comprimento total (BIENIASZ et al., 1999). Neste processo, o P-TEFb é regulado pela associação reversível com vários fatores/cofatores de transcrição para formar vários complexos de subunidades múltiplas que coletivamente constituem uma rede P-TEFb para controlar a transcrição celular e do HIV-1 (LIU et al., 2014).

Uma vez sintetizadas as proteínas necessárias à replicação viral, inicia-se o processo de formação de novos virions, onde o precursor poliprotéico *Gag* desempenha um papel determinante uma vez que contém regiões que permitem a migração para a membrana plasmática e ligação à mesma, a encapsulação do RNA viral, a associação com a glicoproteína viral *Env* e a promoção da saída dos virions formados *de novo* (TEDBURY et al., 2015; DILLEY et al., 2017).

Após o período da infecção primária, inicia-se uma fase conhecida como latência clínica, quando todos os parâmetros virológicos se mantêm em níveis baixos ou indetectáveis pelas técnicas disponíveis, como consequência da resposta imune específica (PANTALEO et al., 1993). Consequentemente, ocorre uma recuperação do número de linfócitos T CD4+ que se mantêm estável ou sofre um declínio gradual (TENNER-RACZ et al., 1998).

Uma característica dessa fase é que os indivíduos infectados se mantêm assintomáticos por um longo período que pode durar anos ou até décadas, de forma que após o período de latência clínica, é iniciada a fase tardia da infecção, onde as células começam a diminuir consideravelmente em quantidade devido ao efeito citopático causado pela replicação viral e mecanismos imunológicos desencadeados pela célula, como apoptose (ZENG; HAASE; SCHACKER, 2012). Com isso, o vírus destrói os órgãos linfóides e o

indivíduo infectado se torna susceptível a infecções oportunistas, neoplasias secundárias e manifestações neurológicas (BOSWELL et al., 2014).

2.1.3 Latência, mecanismo de reativação e agonistas da PKC

O obstáculo mais redutível à erradicação do HIV é a persistência do vírus latente em pacientes infectados sob terapia antiretroviral (CHUN; FAUCI, 2012).

Uma vez que a transcrição dos genes do HIV depende integralmente do estado de ativação das células, células de memória T CD4 + de longa vida se tornaram uma importante fonte de recuperação viral funcionando como um reservatório de provírus de HIV latentes integrados no DNA da célula (SILICIANO et al., 2003).

Assim, a erradicação do HIV em pacientes com esse quadro clínico exigiria a eliminação ou inativação desses reservatórios virais, porém estima-se que décadas de HAART sejam necessárias para o esgotamento da fonte do reservatório, uma vez que os provírus encontram-se transcricionalmente silenciados e imunologicamente inertes na célula hospedeira, de forma que dificilmente são afetados pelas terapias antirretrovirais (TYAGI; PEARSON; KARN, 2010; CHUN; FAUCI, 2012).

Pesquisadores propuseram então reverter o estado viral latente, empregando compostos que interferem com os mecanismos celulares conhecidos por estarem associados à persistência do HIV, fazendo com que as células infectadas com vírus reativados possam ser eliminadas através de efeitos citopáticos, depuração imune e morte celular, eliminando assim os reservatórios (ARCHIN; MARGOLIS, 2014). Essa estratégia de “*shock and kill*” atualmente é considerada uma das estratégias mais promissoras para realizar uma cura para HIV-1 de forma que os principais esforços de pesquisa são direcionados para o desenvolvimento de agentes de reversão de latência (ARL) clinicamente efetivos (DARCIS; DRIESSCHE; LINT, 2016).

Essa reativação pode ser feita de algumas formas como, por exemplo, com a acetilação de histonas, que pode causar o aumento da transcrição, enquanto a desacetilação induz a repressão genética (LUSIC et al., 2003). Isto ocorre porque as modificações em histonas contribuem para a regulação da expressão de genes ativos e reativação de latência (BERGER, 2002). Assim, os inibidores da histona desacetilase (HDACi), incluindo o ácido hidroxâmico de suberoilânilda (SAHA), romidepsina e panobinostat, têm sido utilizados para ativar latência viral ou células cancerosas através da supressão de histona desacetilases que eliminam enzimaticamente o grupo acetil das histonas (CONTRERAS et al., 2009; RASMUSSEN et al., 2014; SØGAARD et al., 2015).

Em contraste com os HDACi, naturais ou 8rbovírus8s8cos ativadores da proteína quinase C (PKC), podem reativar fortemente o HIV em modelos de linhagens celulares e células T CD4 + primárias (BROGDON et al., 2016).

A ativação da via PKC envolve a proteína quinase C (Figura 3), a qual é composta e regulada por várias isoformas, podendo ser classificada basicamente em três tipos: as clássicas, as novas e as atípicas. Cada isoforma exibe características selecionadas, bem como padrões variáveis de expressão em tipos de células específicas (STEINBERG, 2008). Assim, a cascata da PKC pode afetar a regulação positiva do receptor ou *downregulation*, a remodelação da membrana e do citoesqueleto e a regulação positiva ou negativa da transcrição para mediar processos específicos dentro da célula (MCKERNAN; MOMJIAN; KULLKOSKY, 2012).

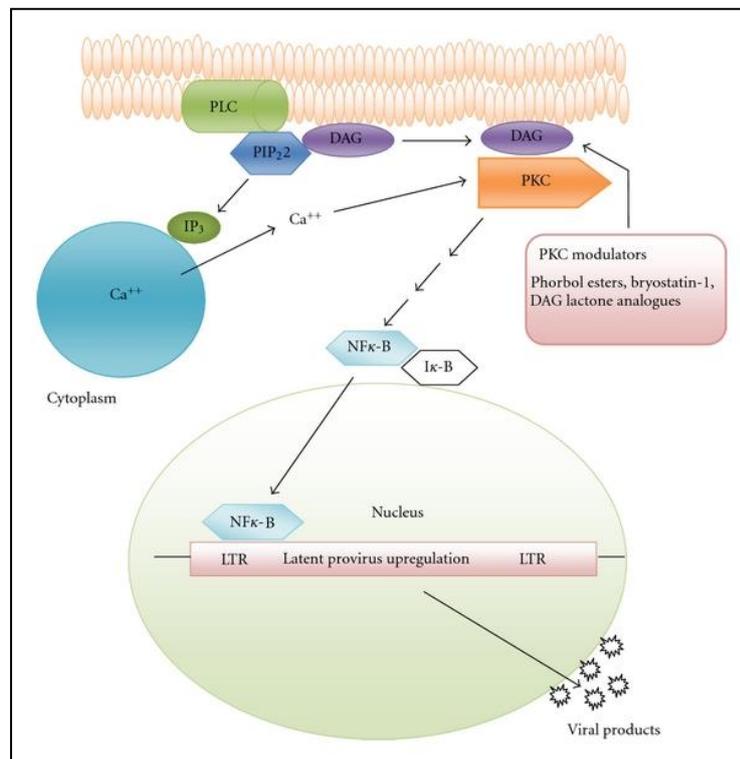


Figura 3. Etapas envolvidas no mecanismo da modulação da PKC no processo de regulação positiva do HIV-1 latente. A figura ilustra as etapas que levam a ativação da via de PKC na reativação do HIV latente. O processo começa com a estimulação da fosfolipase C (PLC) que metaboliza a fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) em dois mensageiros: inositol-1,4,5-trisfosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). IP₃ se liga ao retículo plasmático abrindo os canais de cálcio liberando Ca²⁺ no citoplasma que se liga a PKC juntamente com o DAG fosforilando-a e transduzindo os sinais que levam a ativação do fator nuclear Kappa B (NF-κB) através da fosforilação e degradação de IκBα (um inibidor de NF-κB). Após a ativação da NF-κB, ocorre a ligação da mesma a região LTR do DNA integrado do HIV que leva a regulação positiva do vírus e a expressão do seu genoma na formação de novos vírus.

Fonte: MCKERNAN, MOMJIAN E KULLKOSKY, 2012

A ativação desta via envolve a participação da superfamília de proteínas da fosfolipase C (PLC) que participam do metabolismo de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) e da sinalização lipídica dependentemente do cálcio (NISHIZUKA, 1995; MCKERNAN; MOMJIAN; KULLKOSKY, 2012).

Semelhante à via PKC, a superfamília PLC consiste em muitas isoformas que diferem em seu modo de ativação, níveis de expressão, regulação catalítica, localização celular e afinidade de ligação à membrana, porém todas são capazes de catalisar a hidrólise de PIP₂ em dois mensageiros secundários muito importantes: o diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trisfosfato (IP₃) (NISHIZUKA, 1986; BERRIDGE; IRVINE, 1989). Esses dois mensageiros secundários têm efeitos celulares diferenciais, no qual as moléculas IP₃ se difundem através do citoplasma e se ligam ao retículo endoplasmático, resultando na abertura de canais de cálcio (JONES; CARPENTER, 1992). O cálcio então liberado do retículo no citoplasma é livre para se ligar a importantes proteínas reguladoras, incluindo, mas não restrito, a calmodulina e calcineurina (CHIN; MEANS, 2000). A ligação do cálcio à calmodulina media os processos multicelulares críticos, como inflamação, metabolismo, apoptose, contração muscular lisa, movimento intracelular, memória de curto prazo e longo prazo, crescimento nervoso e resposta imune (AINSCOUGH et al., 2015).

DAG, o outro subproduto da clivagem do PLC, pode ativar a PKC em cooperação com o cálcio, de forma que esta PKC fosforilada, em seguida, fosforila vários alvos de proteínas através da sua atividade quinase e estes alvos, por sua vez, transduzem sinais principalmente através de vias de sinalização selecionadas (ASAOKA et al., 1992; SZENDROEDI et al., 2014) (Figura 3).

Esta via estimula a fosforilação e a degradação do inibidor do fator nuclear Kappa B (I κ B α), levando à ativação do NF- κ B (FERNANDEZ et al., 2013). O NF- κ B livre é então competente para translocação e ligação a sítios na região estimuladora do HIV-LTR. A ligação de NF- κ B à LTR é necessária para a transcrição de alto nível de RNA viral e regulação positiva na expressão do vírus do reservatório latente (DÍAZ et al., 2015).

Um domínio altamente conservado rico em cisteína na região reguladora da maioria das isoformas de PKC atua como o receptor de encaixe específico para DAG, bem como para ésteres de forbol como o forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (STEINBERG, 2008). Este domínio de ligação DAG/PMA conservado, referido como C1, liga dois íons de zinco em uma estrutura de zinco semelhante a uma microvilosidade, que é composta por seis cisteínas e duas histidinas (ONO et al., 1989; DAS; RAHMAN, 2014). Vários derivados de forbol, com afinidades diferentes para o domínio C1 das isoformas de PKC, provocam diferentes

respostas celulares, bem como o grau em que essas respostas são sustentadas, incluindo a regulação positiva na expressão de provírus latentes de HIV-1 (MÁRQUEZ et al., 2008).

Por exemplo, a prostratina reduz a expressão de CD4 e CXCR4 em várias linhagens celulares e células primárias, evitando a disseminação viral nestas culturas (HEZAREH et al., 2004). Da mesma forma como a briostatina-1, que diminui os níveis de CD4 e CXCR4 da superfície em linfócitos T de sangue periférico, bloqueando a infecção pelo HIV (PÉREZ et al., 2010), enquanto que outros diterpenos, como o ingenol PEP005, um ativador da PKC, induz a translocação nuclear de PKC δ , exibindo um grande potencial de reativação (SEROVA et al., 2008).

Assim como estes, outros compostos estruturalmente semelhantes a outros ésteres de forbol já foram isolados de plantas da família Euphorbiaceae e são propensos a erradicação de reservatórios latentes de HIV (ABREU et al., 2014).

Todos compartilham um anel central comum, embora apresentem modificações nos grupos hidroxila e tal como acontece com outros diterpenos, eles ativam diferentes isoformas de PKC, conduzindo a translocação nuclear NF-kB que leva à ativação do HIV-LTR (GOEL et al., 2007; JIANG; DANDEKAR, 2015) (Figura 4).

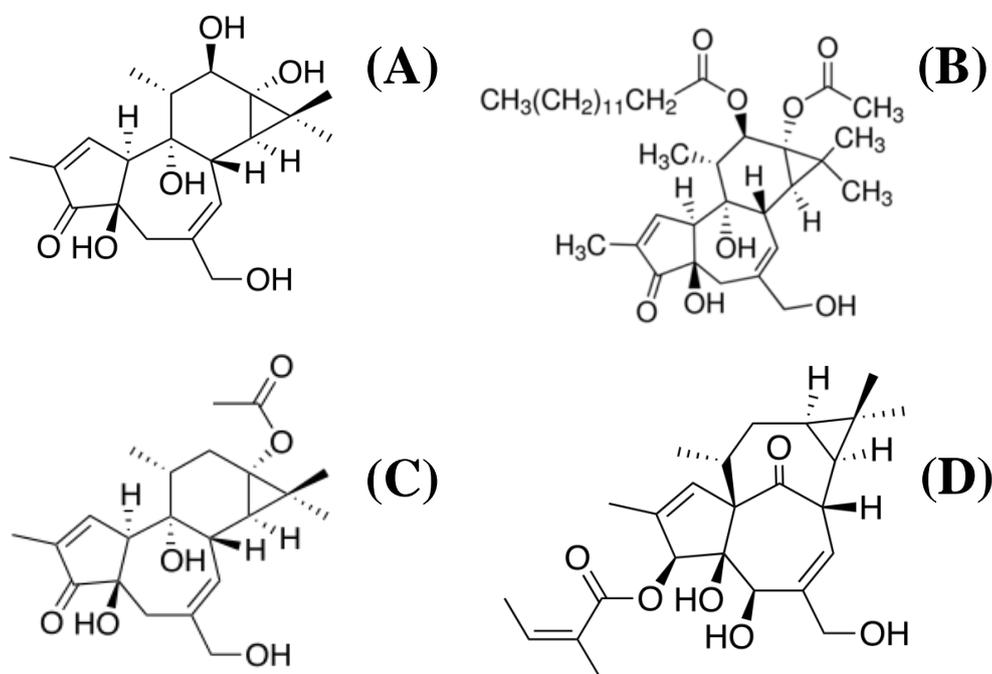


Figura 4. Estrutura química de quatro compostos da família tigliane. A figura ilustra a estrutura de quatro compostos da família tigliane e os três anéis centrais em comum entre eles e modificações nos grupos hidroxila. (A) representa o forbol isolado do óleo de *Croton tiglium*; (B) representa o forbol-12-miristato-13-acetato (PMA); (C) representa a prostratina e (D) representa o ingenol-3-angelate.

Fonte: GOEL et al. (2007) (Adaptado)

2.2. PLANTAS MEDICINAIS E A BUSCA POR FITOTERÁPICOS ANTIVIRIAIS

2.2.1 Importância do estudo de plantas medicinais

A data precisa do conhecimento adquirido sobre plantas medicinais e outros produtos naturais é incerta, mas contos antigos, mitos, escrituras e literatura histórica refletem o uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades sendo tão antigo quanto a espécie humana (DHAMI, 2013). A utilização para tratamento de doenças no Brasil foi influenciada pela cultura indígena, através da utilização de vegetais em rituais de cura, além da colaboração da cultura africana, associada a rituais religiosos, bem como da europeia, desde o período de colonização (MARTINS et al., 2000).

Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (SIVIERO et al., 2012).

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos (MARTINS et al., 2005; LIMA; FERREIRA; OLIVEIRA, 2011). De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002)

Do ponto de vista científico, pesquisas mostraram que muitas plantas medicinais possuem substâncias potencialmente agressivas e, por esta razão, devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos, já que diversas substâncias isoladas de vegetais considerados medicinais possuem atividade citotóxica ou genotóxica e mostram relação com a incidência de tumores (SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008).

As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais, ressaltando, portanto, a importância do estudo de plantas medicinais para elucidação de tais possíveis advertências (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005).

2.2.2 Atividade antiviral de plantas medicinais

A maioria das doenças infecciosas que afetam o homem e os animais são causadas por vírus e por este motivo ainda constituem um sério problema principalmente em relação aos indivíduos infectados. As diversas medidas sanitárias adotadas envolvem o controle das doenças através do uso de vacinas. Entretanto, quando o organismo já está infectado dificilmente adota-se medidas para seu tratamento (SIMONI, 2003).

Por essa razão, há mais de 60 anos, os virologistas travam uma luta incessante com o principal objetivo de desenvolver fármacos que possam parar a replicação viral sem danificar as células do hospedeiro já que a toxicidade de muitos compostos antivirais é uma das principais barreiras para a realização de um tratamento efetivo, pois implica em sua utilização por períodos relativamente curtos (LITTLER; OBERG, 2005; SIMÕES et al., 2010). Então, como já se sabe, há milhares de anos produtos derivados de plantas medicinais são utilizados na medicina popular no tratamento de várias doenças, inclusive as infecciosas, tornando-os uma das alternativas para o desenvolvimento de novos fármacos antivirais (SIMÕES; SCHENKEL, 2002). Sua ampla diversidade estrutural e atividade biológica, além de serem reconhecidas pela indústria farmacêutica, caracterizam as plantas medicinais como ótimas fontes de moléculas ou modelos para o desenvolvimento de fármacos (ASADI-SAMANI et al., 2016).

Entretanto, as pesquisas com plantas medicinais envolvem investigações da medicina tradicional e popular (etnobotânica); isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (química orgânica: fitoquímica); investigação farmacológica de extratos e dos constituintes químicos isolados (farmacologia); transformações químicas de princípios ativos (química orgânica sintética); estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação dos princípios ativos (química medicinal e farmacologia) e finalmente a operação de formulações para a produção de fitoterápicos. Por isso, a descobertas de novos fitoterápicos com a integração destas áreas na pesquisa de plantas medicinais se estende por um longo caminho até chegar ao produto final (MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002).

Dessa forma, podemos citar que alguns produtos do metabolismo secundário das plantas medicinais como alcalóides, proteínas, saponinas, flavonóides, cumarinas já têm sido descritos na literatura como compostos com potencial atividade antiviral (AHN et al., 2001; FASSINA et al., 2002; ZANDI et al., 2011; BEHBAHANI et al., 2014; XU et al., 2014; CARNEIRO et al., 2016; LANI et al., 2016; SAPTAWATI et al., 2017). Entretanto a

pesquisa por novos compostos com maior eficácia e baixa toxicidade ainda é necessária para o desenvolvimento de drogas efetivas no tratamento ou cura de doenças causadas por vírus.

2.2.3 Família Euphorbiaceae (Jussieu, 1789)

A família Euphorbiaceae, considerada uma das maiores famílias dentre as Angiospermas (plantas com flores), é uma fonte de plantas medicinais sendo constituída por mais de 300 gêneros e mais de 8000 espécies, de forma que seus membros encontram-se distribuídos por todo o mundo, mas desenvolvem-se melhor e maioritariamente em regiões de climas tropicais e subtropicais (WEBSTER, 1994; ALVES, 1998; MWINE; DAMME, 2011). As espécies pertencentes a esta família apresentam estrutura vegetal e floral bastante variada e heterogênea, com plantas que podem ser grandes árvores lenhosas, lianas trepadeiras, arbustos e ervas daninhas ou perenes (MWINE; DAMME, 2011). A maioria das euforbiáceas pode ser reconhecida pelo seu látex (seiva) lacrimejante e leitoso, que pode exibir cores apelativas e apresenta alta toxicidade que esta seiva pode causar irritações e erupções cutâneas em contato com a pele, cegueira quando em contato com os olhos e provoca fortes diarreias quando ingerido (BIGONIYA; SHUKLA; SINGH, 2010).

No Brasil, estima-se a ocorrência de 1000 espécies e 72 gêneros, em diferentes tipos de vegetação (GIULIETTI et al., 2005). Alguns autores destacam a importância da família Euphorbiaceae na região semiárida nordestina, no bioma Caatinga, o qual apresenta muitas espécies endêmicas, sendo o terceiro grupo com maior número de espécies, seguida da Fabaceae e Convolvulaceae (GIULIETTI et al., 2004; SÁTIRO; ROQUE, 2008; LUCENA; ALVES, 2010). Conforme esclarece Oliveira (2013) as euforbiáceas possuem uma grande capacidade adaptativa e eficiência à escassez hídrica, associada às regiões secas.

As plantas desta família apresentam uma variedade de compostos com atividades biológicas na sua composição, tais como, terpenos, alcaloides, flavonoides, ácidos orgânicos fenóis, lignanas e taninos os quais são frequentemente identificados em diferentes partes anatômicas, como folhas, caules, flores, casca, fruto ou semente (BITTNER et al., 2001; MWINE; DAMME, 2011; BARRETO, 2013). Segundo Mwine e Damme (2011), alguns extratos de membros da família Euphorbiaceae foram isolados e patenteados como precursores para síntese de alguns fármacos, fazendo com que estas plantas sejam atualmente alvo de estudo para o desenvolvimento de novos fitoterápicos com aplicações para o uso humano, animal ou pesticida.

2.2.4 Gênero *Jatropha*

O gênero *Jatropha* é constituído por cerca de 175 espécies e pertence à família das Euphorbiaceae, subfamília Crotonoideae e tribo Jatropeae (SUJATHA et al., 2013; BAHADUR et al., 2013). O nome "Jatropha" é derivado das palavras gregas "jatos", que significa "médico" e "trophe", que significa "alimento", que está associado aos seus usos medicinais (PRATEEK et al., 2009).

Este gênero apresenta uma distribuição disjunta, encontrando-se majoritariamente em países tropicais, subtropicais e clima tropical seco como nas Américas, de onde a maior parte é nativa, porém existem entre 50 a 70 espécies em regiões semiáridas tropicais da África, sendo uma endêmica em Madagascar; uma dúzia na Índia; e cerca de 50 espécies na Arábia (MURTHY et al., 2013; DEHGAN, 1982). No Brasil, é predominante na Amazônia, Caatinga e Mata Atlântica e está distribuído por todo o país nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sul e Sudeste (FÉLIX-SILVA et al., 2014).

Devido a esta distribuição, este gênero tornou-se morfológicamente diverso, composto por plantas herbáceas perenes, suculentas, facultativas anuais, geófitas, arbustos, subarbustos rizomatosos e árvores lenhosas, cada uma com uma região geográfica específica para o seu desenvolvimento (SUJATHA et al., 2013; SABANDAR et al., 2013; DEHGAN, 1982). Esta diversidade morfológica permitiu que várias espécies fossem cultivadas como plantas ornamentais, sendo duas das principais características as suas folhas e flores (SUJATHA et al., 2013).

As espécies de *Jatropha* também são utilizadas na medicina tradicional para curar várias doenças na África, Ásia e América Latina e também têm sido relatadas por seus usos medicinais, constituintes químicos e atividades biológicas, principalmente as espécies *Jatropha curcas*, *Jatropha elliptica*, *Jatropha gossypifolia* e *Jatropha mollissima*, entre outras (SABANDAR et al., 2013).

Assim, devido à utilização de plantas do gênero *Jatropha* na etnomedicina, foram desencadeadas pesquisas por moléculas bioativas, sendo possível o isolamento de alguns dos seus constituintes químicos, entre os quais estão os alcaloides, peptídeos cíclicos, terpenos (mono-, di- e tri-), flavonoides, lignanas e cumarinas. (DEVAPPA et al., 2010a; DEVAPPA et al., 2010) Destes compostos, os que mais se destacaram foram os diterpenos, que são muito abundantes neste gênero e apresentam uma elevada bioatividade e toxicidade, sendo por isso potenciais matérias-primas para a síntese de novos compostos (SABANDAR et al., 2013; DEVAPPA et al., 2010a).

A presença de diversos compostos com diferentes atividades biológicas, neste gênero, permite a utilização dos resíduos resultantes da extração do óleo das sementes como fertilizantes, apesar destes serem tóxicos devido à presença de ésteres de forbol, sendo necessária a remoção dos mesmos (KUMAR; SHARMA, 2008; DEVAPPA et al., 2010a).

Nas últimas décadas, estudos foram realizados com óleos, extratos e constituintes químicos isolados de espécies deste gênero revelando atividades tais como anti-inflamatória, antitumoral, antimalárica, antioxidante, antimicrobiana, anticoagulante, inibição de acetilcolinesterase, moluscicida e inseticida (SABANDAR et al., 2013).

2.2.5. A espécie *Jatropha gossypifolia* L.

A espécie *J. gossypifolia* L., pertencente à família Euphorbiaceae, é uma espécie de planta medicinal multiuso, amplamente conhecida como pinhão roxo, utilizada na medicina popular para o tratamento de algumas doenças (FÉLIX-SILVA et al., 2014).

Trata-se de um pequeno arbusto com várias ramificações, podendo atingir 4 metros de altura quando em condições favoráveis. Seu caule possui elevado teor de látex e suas folhas escuras verde-escuras ou com mais frequência vermelho-arroxeadas, apresentam entre 16 a 19 cm de comprimento, são alternadas, palmadas, e pubescentes, com um ápice pontiagudo, base cordiforme, e margem serrilhada. As flores são unissexuais, roxas e cimosas, cálice contendo cinco pétalas, pistiladas e estaminadas do tipo prato e produtoras de néctar. O fruto é capsular, do tipo esquizocárpico, secos, com três sulcos de deiscência explosiva, contendo uma semente escura com manchas pretas rica em óleos (KUMAR; SINGH, 2012) (Figura 5).

O seu nome “*gossypifolia*” é uma combinação do Latim “*gossypium*”, que significando algodão, com “*folium*”, que sugere que as folhas são semelhantes às do algodoeiro (PARSONS; CUTHBERTSON, 2001).



Figura 5. Imagem ilustrativa da espécie *Jatropha gossypifolia* conhecida como pinhão roxo em seu habitat natural. FONTE: https://keyserver.lucidcentral.org/weeds/data/media/Html/jatropha_gossypifolia.htm

Atualmente encontra-se naturalizada na maior parte dos países tropicais, em toda África, tropical exceto nas regiões secas do sul, América do Norte (maioritariamente na Flórida e México) e Sul, Ásia, e a Austrália, onde foi introduzida como planta medicinal e ornamental. A sua rápida propagação através de sementes e partes vegetativas foram algumas das características que permitiram que a sua distribuição fosse muito além da original (BEBAWI et al., 2007).

Estudos têm demonstrado o potencial da espécie *J. gossypifolia* para o uso humano e veterinário na medicina tradicional, de forma que algumas das propriedades medicinais apresentadas por esta são comuns a outras espécies do gênero *Jatropha*, e são atribuídas a toda planta ou a partes específicas da mesma, como folhas, caules, raízes, frutos, sementes e látex (FÉLIX-SILVA et al., 2014). Estas são preparadas de diversas formas, entre as quais, infusão, decocção e extratos podem ser utilizados de formas distintas como oral, tópica, ou banhos (ALBUQUERQUE et al., 2007; FÉLIX-SILVA et al., 2014). O uso popular da planta de *J. gossypifolia* pode ser como analgésico e anti-inflamatório (PANDA et al., 2009), imunomodulatória (DEO et al., 2012), inseticida (VALENCIA et al., 2006), anticancerígena (FALODUN et al., 2012), antiplasmódica (JANSEN et al., 2010), antibacteriana e antioxidante (OKOH et al., 2016), anticoagulante (ODUOLA et al., 2005; FÉLIX-SILVA et al., 2014a), hepatoprotetora (PANDA et al., 2009a), moluscicida (PEREIRA FILHO et al., 2014), antiulcerogênica (VIJAYAKUMAR et al., 2016), hipotensiva (SILVA et al., 2015), antidiarreico, antiofídico (picada de escorpiões e mordidas de cobras), antitérmico,

antimicrobiano, anti-hemorrágica, antipirético, diurético, anticonvulsivante, antisséptico, antihipertensivo, antihepatotóxico, diabetes, anemia, doenças de pele, cancro (FÉLIX-SILVA et al., 2014; MISRA; MISRA, 2010). Esta planta também é utilizada no tratamento disfonia, eczemas, abscessos, cicatrização de feridas, disenteria, lepra, artrite, úlceras, otite, alopecia, regulador de menstruação, doenças venéreas, dores de estomago, obstruções do trato abdominal, reumatismo, mordida de animais venenosos (FÉLIX-SILVA et al., 2014).

Alguns estudos de toxicidade mostraram que, apesar da toxicidade conhecida das espécies de *Jatropha*, o *J. gossypifolia* apresentou baixa toxicidade em alguns experimentos *in vitro* e *in vivo*. No entanto, alguns estudos indicaram que o extrato etanólico das folhas, em uso oral agudo, é seguro para ratos, mas com uso crônico, pode ser tóxico (MARIZ et al., 2006; MARIZ et al., 2008; MARIZ et al., 2012).

Tal toxicidade está relacionada principalmente ao látex e sementes, pois o látex, liberado das partes aéreas da planta por lesão mecânica, é extremamente cáustico e irritante para a pele e membranas mucosas enquanto que as sementes são ricas em toxinas que causam aglutinação e hemólise nos eritrócitos, além de causar danos a outros tipos de células e conter um complexo de resina lipóide que pode causar dermatites (SABANDAR et al., 2013; ALBUQUERQUE et al., 2007; DEVAPPA et al., 2010a).

Diversos compostos químicos, tais como, açúcares, alcalóides, aminoácidos, esteróides, cumarinas, lignanas, flavonóides, proteínas, saponinas, taninos e terpenos, foram detectados na espécie *J. gossypifolia* (FÉLIX-SILVA et al., 2014). Contudo, Félix-Silva et al. (2014) mencionam que os principais compostos bioativos desta espécie não estão totalmente explícitos, uma vez que são poucos os estudos que efetuem o isolamento e determinem a atividade biológica dos mesmos. Pouco se sabe sobre a constituição deste tipo de extrato, o que se traduz em poucos compostos polares identificados, como flavonóides, taninos e glúcidos (PANDA et al., 2009; SETH; SARIN, 2010). Normalmente, nestes estudos utilizam solventes ou misturas de solventes com características não polares, que contribui para a caracterização de compostos não polares, como os terpenos e lignóides (FÉLIX-SILVA et al., 2014).

Sendo assim, a utilização de *J. gossypifolia* como planta medicinal demonstra que esta apresenta um grande potencial como fonte de moléculas bioativas com relevância farmacológica ou biotecnológica, de forma que se torna necessário conhecer seus compostos e eliminar os efeitos tóxicos destes, pois só desta forma é possível a utilização dos mesmos na produção de medicamentos a base de plantas ou de produtos bioativos naturais para a sua aplicação em medicina alternativa e complementar (FÉLIX-SILVA et al., 2014).

2.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, C. M.; PRICE, S. L.; SHIRK, E. N. et al. Dual role of novel ingenol derivatives from *Euphorbia tirucalli* in HIV replication: inhibition of de novo infection and activation of viral LTR. **PlosOne**, v. 9, n. 5, p. 1-14, 2014.
- AHN, H. C.; LEE, S. Y.; KIM, J. W. et al. Binding aspects of baicalein to HIV-1 integrase. **Molecules and Cells**, v. 12, n. 1, p. 127-130, 2001.
- AINSCOUGH, J. S.; GERBERICK, G. F.; KIMBER, I. et al. Interleukin-1 β Processing Is Dependent on a Calcium-mediated Interaction with Calmodulin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, p. 31151-31161, 2015.
- ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325-354, 2007.
- ALVES, M. V. Checklist das especies de Euphorbiaceae Juss. ocorrentes no semi-árido pernambucano, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 12, n. 3, p. 485-495, 1998.
- ARCHIN, N. M.; MARGOLIS, D. M. Emerging strategies to deplete the HIV reservoir. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 27, n. 1, p. 29-35, 2014.
- ASADI-SAMANI, M.; MORADI, M. T.; BAHMANI, M. et al. Antiviral medicinal plants of Iran: A Review of Ethnobotanical evidence. **International Journal of PharmTech Research**, v. 9, n. 5, p. 427-434, 2016.
- ASAOKA, Y.; NAKAMURA, S.; YOSHIDA, K. et al. Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 17, n. 10, p. 414-417, 1992.
- BADKE, M. R.; BUDÓ, M. L. D.; SILVA, F. M. et al. Plantas Medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, v. 15, n. 1, p. 132-139, 2011.
- BAHADUR, B.; PULLAIAH, T.; MURTHY, G. V. S. Systematics of Indian Jatrophas. Em: **Jatropha, challenges for a new energy crop: genetic improvement and biotechnology**. New York: Springer, p. 153-186, 2013.
- BARBOSA, W. L. R.; PINTO, L. N.; QUIGNARD, E. et al. *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 544-548, 2008.
- BARRÉ-SINOUSSE, F.; ROSS, A. L.; DELFRAISSY, J. F. Past, presente and future: 30 years of HIV research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 877-883, 2013.
- BARRETO, M. B. Flavonoides e terpenoides de *Croton muscicarpa* (Euphorbiaceae). **Química Nova**, v. 36, n. 5, 2013.
- BEBAWI, F. F.; VITELLI, J. S.; CAMPBELL, S. D. et al. The biology of Australian weeds 47. *Jatropha gossypifolia* L.. **Plant Protection Quarterly**, v. 22, n. 2, p. 42-58, 2007.

BEHBAHANI, M.; SAYEDIPOUR, S.; POURAZAR, A. et al. *In vitro* anti-HIV-1 activities of kaempferol and kaempferol-7-O-glucoside isolated from *Securigera securidaca*. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 6, p. 463-469, 2014.

BERGER, S. L. Histone modifications in transcriptional regulation. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 12, p. 142-148, 2002.

BERRIDGE, M. J.; IRVINE, R. F. Inositol phosphates and cell signalling. **Nature**, v. 341, p. 197-205, 1989.

BIENIASZ, P. D.; GRDINA, T. A.; BOGERD, H. P. et al. Recruitment of cyclin T1/P-TEFb to an HIV type 1 long terminal repeat promoter proximal RNA target is both necessary and sufficient for full activation of transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 14, p. 7791-7796, 1999.

BIGONIYA, P.; SHUKLA, A.; SINGH, C. S. Dermal irritation and sensitization study of *Euphorbia nerifolia* latex and its anti-inflammatory efficacy. **International Journal of Phytomedicine**, v. 2, n. 3, p. 240-254, 2010.

BITTNER, M.; ALARCÓN, J.; AQUEVEQUE, P. et al. Estudio químico de especies de la familia Euphorbiaceae en Chile. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, v. 46, n.4, p: 419-431, 2001.

BOSWELL, K. L.; PARIS, R.; BORITZ, E. et al. Loss of circulating CD4 T cells with B cell helper function during chronic HIV infection. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 1, p. e1003853, 2014.

BRASS, A. L.; DYKXHOORN, D. M.; BENITA, Y. et al. Identification of Host Proteins Required for HIV Infection Through a Functional Genomic Screen. **Science**, v. 319, n. 5865, p. 921-926, 2008.

BRIGGS, J. A.; WILK, T.; WELKER, R. et al. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 7, p. 1707-1715, 2003.

BROGDON, J.; ZIANI, W.; WANG, X. et al. *In vitro* effects of the small-molecule protein kinase C agonists on HIV latency reactivation. **Scientific Reports**, v. 6, p. 39032, 2016.

CARY, D. C.; FUJINAGA, K.; PETERLIN, B. M. Molecular mechanisms of HIV latency. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 2, p. 448-454, 2016.

CHEN, Y. H.; XIAO, Y.; DIERICH, M. P. HIV-1 gp41: Role in HIV Entry and Prevention. **Immunobiology**, v. 201, n. 3-4, p. 308-316, 2000.

CHIN, D.; MEANS, A. R. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. **Trends in Cell Biology**, v. 10, n. 8, p. 322-328, 2000

CHUN, T. W.; FAUCI, A. S. HIV reservoirs: pathogenesis and obstacles to viral eradication and cure. **AIDS**, v. 26, n. 10, p. 1261-1268, 2012.

CLAVEL, F.; GUÉTARD, D.; BRUN-VÉZINET, F. et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. **Science**, v. 233, p. 343-346, 1986.

CLAVEL, F.; MANSINHO, K.; CHAMARET, S. et al. Human immunodeficiency virus type 2 infection associated with AIDS in West Africa. **The New England Journal of Medicine**, v. 316, p. 1180-1185, 1987.

COCK, K. M.; BRUN-VÉZINET, F.; SORO, B. HIV-1 and HIV-2 infections and AIDS in West Africa. **ADIS**, v. 5, n. 1, p. S21-S28, 1991.

CONTRERAS, X.; SCHWENEKER, M.; CHEN, C. S. et al. Suberoylanilide hydroxamic acid reactivates HIV from latently infected cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 6782–6789, 2009.

CRAIGIE, R.; BUSHMAN, F. D. HIV DNA Integration. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 7, p. a006890, 2012.

CROXFORD, S.; KITCHING, A.; DESAI, S. et al. Mortality and cause of death in people diagnosed with HIV in the era of highly active antiretroviral therapy compared with the general population: an analysis of a national observation cohort. **The Lancet Public Health**, v. 2, n. 1, p. 35-46, 2017.

DARCIS, G.; DRIESSCHE, B. V.; LINT, C. V. Preclinical shock strategies to reactivate latent HIV-1. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 11, n. 4, p. 388-393, 2016.

DAS, J.; RAHMAN, G. M. C1 Domains: Structure and Ligand-Binding Properties. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 24, p. 12108-12131, 2014.

DEHGAN, B. Novel *Jatropha* for Florida Landscapes. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v. 95, n.1, p. 277-280, 1982.

DEO, S.; CHAUDHARI, T.; INAM, F. Study of immunomodulatory activity of naturally occurring and related synthetic 1-phenyl-naphthalene lignans. **International Journal of Knowledge Engineering**, v. 3, n. 1, p. 143-145, 2012.

DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. *Jatropha* Diterpenes: a Review. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 88, n.3, p. 301-322, 2010.

_____. *Jatropha* toxicity — a review. **Journal of Toxicology and Environmental Health B: Critical Reviews**, v. 13, n. 6, p. 476–507, 2010a.

DHAMI, N. Trends in Pharmacognosy: A modern Science of natural medicines. **Journal of Herbal Medicine**, v. 3, n. 5, p. 123-131, 2013.

DÍAZ, L.; MARTÍNEZ-BONET, M.; SÁNCHEZ, J. et al. Bryostatin activates HIV-1 latent expression in human astrocytes through a PKC and NF- κ B-dependent mechanism. **Scientific Reports**, v. 5, p. 12442, 2015.

FALODUN, A.; SHENG-XIANG, Q.; PARKINSON, G. et al. Isolation and characterization of a new anticancer diterpenoid from *Jatropha gossypifolia*. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 45, n. 10, p. 636-639, 2012.

FASSINA, G.; BUFFA, A.; BENELLI, R. et al. Polyphenolic antioxidant (–)-epigallocatechin-3-gallate from green tea as a candidate anti-HIV agent. **AIDS**, v. 16, p. 939-941, 2002.

- FÉLIX-SILVA, J.; GIORDANI, R. B.; SILVA-JÚNIOR, A. A. et al. *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae): A Review of Traditional Uses, Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology of This Medicinal Plant. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, n. 369204, p. 1-32, 2014.
- FÉLIX-SILVA, J.; SOUZA, T.; CAMARA, R. B. B. G. et al. *In vitro* anticoagulant and antioxidant activities of *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae) leaves aiming therapeutical applications. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 405, p. 1-13, 2014a.
- FERNANDEZ, G.; ZAIKOS, T. D.; KHAN, S. Z. et al. Targeting IκB Proteins for HIV Latency Activation: the Role of Individual IκB and NF-κB Proteins. **Journal of Virology**, v. 87, n. 7, p. 3966-3978, 2013.
- FIORENTINI, S.; MARINI, E.; CARACCILO, S. et al. Functions of the HIV-1 matrix protein p17. **New Microbiologica**, v. 29, n. 1, p. 1-10, 2006.
- GIULIETTI, A. M.; NETA, A. L. D.; CASTRO, A. A. et al. **Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga**. In: Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. p. 48-90. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2004.
- GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. D. G. L. et al. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 52-61, 2005.
- GOEL, G.; MAKKAR, H. P.; FRANCIS, G. et al. Phorbol Esters: Structure, Biological Activity, and Toxicity in Animals. **International Journal of Toxicology**, v. 26, p. 279-288, 2007.
- HEZAREH, M.; MOUKIL, M. A.; SZANTO, I. et al. Mechanisms of HIV receptor and co-receptor down-regulation by prostratin: role of conventional and novel PKC isoforms. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 15, n. 4, p. 207-222, 2004.
- JANSEN, O.; ANGENOT, L.; TITS, M. et al. Evaluation of 13 selected medicinal plants from Burkina Faso for their antiplasmodial properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 143-150, 2010.
- JIANG, G.; DANDEKAR, S. Targeting NF-κB Signaling with Protein Kinase C Agonists As an Emerging Strategy for Combating HIV Latency. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 31, n. 1, p. 4-12, 2015.
- JONES, G.; CARPENTER, G. Regulation of phospholipase C isozymes. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 4, n. 2, p. 97-106, 1992.
- KANNANGAI, R.; DAVID, S.; SRIDHARAN, G. Human immunodeficiency virus type-2-A milder, kinder virus: An update. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 30, p. 6-15, 2012.
- KUMAR, A.; SHARMA, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. **Industrial Crops and Products**, v. 28, n. 1, p. 1-10, 2008.
- KUMAR, A.; SINGH, N. *Jatropha gossypifolia* L.: a potential genetic resource for herbal dye. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 59, n. 5, p. 949-954, 2012.

LANI, R.; HASSANDARVISH, P.; SHU, M. H. et al. Antiviral activity of selected flavonoids against Chikungunya virus. **Antiviral Research**, v. 133, p. 50-61, 2016.

LIMA, P. G. C.; FERREIRA, M. C.; OLIVEIRA, R. Plantas medicinais em feiras e mercados públicos do Distrito Florestal Sustentável da BR-163, estado do Pará, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 2, p. 422-434, 2011.

LIMA, V. D.; JOHNSTON, K.; HOGG, R. S. et al. Expanded Access to Highly Active Antiretroviral Therapy: A potentially Powerful Strategy to Curb the Growth of the HIV Epidemic. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 1, p. 59-67, 2008.

LITTLER, E.; OBERG, B. Achievements and challenges in antiviral drug discovery. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 16, n. 3, p. 155-168, 2005.

LIU, R. D.; WU, J.; SHAO, R. et al. Mechanism and factors that control HIV-1 transcription and latency activation. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 15, n. 5, p. 455-465, 2014.

LUCENA, M. F. A.; ALVES, M. Notas taxonômicas para Euphorbiaceae s.l. do Nordeste do Brasil. **Hoehnea**, v. 37, n. 1, p. 71-85, 2010.

LUSIC, M.; MARCELLO, A.; CERESETO, A. et al. Regulation of HIV-1 gene expression by histone acetylation and factor recruitment at the LTR promoter. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 24, p. 6550-6561, 2003.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARIZ, S. R.; CERQUEIRA, G. S.; ARAUJO, W. C. et al. Chronic toxicologic study of the ethanolic extract of the aerial parts of *Jatropha gossypifolia* in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 3, p. 663-668, 2012.

_____. et al. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 372-378, 2006.

_____. et al. Histopathological evaluation in rats after acute treatment with the ethanol extract from aerial parts of *Jatropha gossypifolia* L.. **Revista Brasileira De Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 213-216, 2008.

MÁRQUEZ, N.; CALZADO, M. A.; SÁNCHEZ-DUFFHUES, G. et al. Differential effects of phorbol-13-monoesters on human immunodeficiency virus reactivation. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, n. 6, p. 1370-1380, 2008.

MARTINS, A. G.; ROSÁRIO, D. L.; BARROS, M. N. et al. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais, alimentares e tóxicas da Ilha do Combu, Município de Belém, Estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 86, n. 1, p. 21-30, 2005.

MARTINS, E. R. et al. **Plantas Medicinais**. Viçosa: Editora UFV, 2000.

- MCKERNAN, L. N.; MOMJIAN, D.; KULLKOSKY, J. Protein Kinase C: One Pathway towards the Eradication of Latent HIV-1 Reservoirs. **Advances in Virology**, v. 2012, p. 805347, 2012.
- MISRA, M.; MISRA, A. N. *Jatropha*: the biodiesel plant biology, tissue culture and genetic transformation – A Review. **International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology**, v. 1, n.1, p. 11-24, 2010.
- MURTHY, G. V. S.; CHAMUNDESWARI, E.; GOVERDHEN, S. et al. Fruit, Seed and Seedling Characters in *Jatropha* L.. Em: ***Jatropha, challenges for a new energy crop: genetic improvement and biotechnology***. New York: Springer New York, p. 95-118, 2013.
- MWINE, J. T.; DAMME, P. V. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants?: a review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 5, p. 652-662, 2011.
- NISHIZUKA, Y. Studies and perspectives of protein kinase C. **Science**, v. 233, p. 305-312, 1986.
- NISHIZUKA. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 7, p. 484-496, 1995.
- ODUOLA, T.; AVWIORO, O. G.; AYANNIYI, T. B. Suitability of the leaf extract of *Jatropha gossypifolia* as an anticoagulant for biochemical and haematological analyses. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 7, p. 679-681, 2005.
- OKOH, S. O.; IWERIEBOR, B. C.; OKOH, O. O. et al. Antibacterial and Antioxidant Properties of the Leaves and Stem Essential Oils of *Jatropha gossypifolia* L.. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1-9, 2016.
- OLIVEIRA, D. G. A família Euphorbiaceae Juss. em um fragmento de Caatinga em Sergipe. **Scientia Plena**, v. 9, n. 4, p. 1-7, 2013.
- ONO, Y.; FUJII, T.; IGARASHI, K. et al. Phorbol ester binding to protein kinase C requires a cysteine-rich zinc-finger-like sequence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 13, p. 4868-4871, 1989.
- PANCERA, M.; MAJEED, S.; BAN, Y. E. et al. Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 3, p. 1166-1171, 2010.
- PANDA, B. B.; GAUR, K.; KORI, M. L. et al. Anti-Inflammatory and Analgesic Activity of *Jatropha gossypifolia* in Experimental Animal Models. **Global Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 1, p. 01-05, 2009.
- _____. et al. Hepatoprotective Activity of *Jatropha gossypifolia* Against Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Injury in Rats. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 2, n. 1, p. 50-54, 2009a.

PANTALEO, G.; GRAZIOSI, C.; DEMAREST, J. F. et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. **Nature**, v. 362, n. 6418, p. 355-358, 1993.

PARSONS, W. T.; CUTHBERTSON, E. G. **Noxious weeds of Australia**. 2º ed. Melbourne: Csiro Publishing, p. 429, 2001.

PEREIRA FILHO, A. A.; FRANÇA, C. R. C.; OLIVEIRA, D. S. et al. Evaluation of the molluscicidal potential of hydroalcoholic extracts of *Jatropha gossypifolia* Linnaeus, 1753 ON *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 6, p. 505-510, 2014.

PÉREZ, M.; VINUESA, A. G.; SANCHEZ-DUFFHUES, G. et al. Bryostatin-1 synergizes with histone deacetylase inhibitors to reactivate HIV-1 from latency. **Current HIV Research**, v. 8, n. 6, p. 418-429, 2010.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S. et al. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

PRATEEK, S.; GOPAL, R.; MAYUR, S. et al. Biomethanation potential of *Jatropha* (*Jatropha curcas*) cake along with buffalo dung. **African Journal of Agricultural Research**, v.4, n. 10, p. 991-995, 2009.

RASMUSSEN, T. A.; TOLSTRUP, M.; BRINKMANN, C. R. et al. Panobinostat, a histone deacetylase inhibitor, for latent-virus reactivation in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy: a phase 1/2, single group, clinical trial. **The Lancet HIV**, v. 1, n. 1, p. e13-e21, 2014.

RATNOGLIK, S. L.; AOKI, C.; SUDARMONO, P. et al. Antiviral activity of extracts from *Morinda citrifolia* leaves and chlorophyll catabolites, pheophorbide a and pyropheophorbide a, against hepatitis C virus. **Microbiology and Immunology**, v. 58, p. 188-194, 2014.

REBENSBURG, S.; HELFER, M.; SCHNEIDER, M. et al. Potent *in vitro* antiviral activity of *Cistus incanus* extract against HIV and Filoviruses targets viral envelope proteins. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-15, 2016.

REEVES, J. D.; DOMS, R. W. Human Immunodeficiency virus type 2. **Journal of General Virology**, v. 83, n. Pt6, p. 1253-1265, 2002.

SABANDAR, C. W.; AHMAT, N.; JAAFAR, F. M. et al. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): a review. **Phytochemistry**, v. 85, p. 7-29, 2013.

SAPTAWATI, L.; FEBRINASARI, R. P.; YUDHANI, R. D. et al. *In vitro* study of eight Indonesian plants extracts as anti Dengue virus. **Health Science Journal of Indonesia**, v. 8, n. 1, p. 12-18, 2017.

SÁTIRO, L. N.; ROQUE, N. A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, p. 99-119, 2008.

SEROVA, M.; GHOUL, A.; BENHADJI, K. A. et al. Effects of protein kinase C modulation by PEP005, a novel ingenol angelate, on mitogen-activated protein kinase and

phosphatidylinositol 3-kinase signaling in cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 7, n. 4, p. 915-922, 2008.

SETH, R.; SARIN, R. Analysis of the phytochemical content and anti-microbial activity of *Jatropha gossypifolia* L.. **Archives of Applied Science Research**, v. 2, n. 5, p. 285-291, 2010.

SETTE-DE-SOUZA, P. H.; CARNEIRO, S. E. R.; MACEDO-COSTA, M. R. et al. Antibacterial activity and phytochemical screening of extract of *Lippia alba* (Mill). NE Brown. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 29, p. 2783-2787, 2014.

SHERMAN, M. P.; GREENE, W. C. Slipping through the door: HIV entry into the nucleus. **Microbes and Infection**, v. 4, n.1, p. 67-73, 2002.

SILICIANO, J. D.; KAJDAS, J.; FINZI, D. et al. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, p. 727-728, 2003.

SILVA, S. N.; ABREU, I. C.; CARTAGENES, M. S. S. et al. Effects of *Jatropha gossypifolia* L. on the blood pressure and vascular reactivity of rats. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 9, n. 11, p. 375-382, 2015.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 6. Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRS, 2010, 1102 p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SIMON, V.; HO, D. D.; KARIM, Q. A. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. **The Lancet**, v. 368, n. 9534, p. 489-504, 2006.

SIMONI, I. C. Tratamentos antivirais. **Biológico**, v. 65, n. 1/2, p. 41-44, 2003.

SIVIERO, A.; DELUNARDO, T. A.; HAVERROTH, M. et al. Plantas medicinais em quintais urbanos de Rio Branco, Acre. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 598-610, 2012.

SØGAARD, O. S.; GRAVERSEN, M. E.; LETH, S. et al. The Depsipeptide Romidepsin Reverses HIV-1 Latency *In Vivo*. **PloS Pathogens**, v. 11, n. 9, p. e1005142, 2015.

STEINBERG, S. F. Structural basis of protein kinase C isoform function. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 4, p. 1341-1378, 2008.

SUJATHA, M.; BAHADUR, B.; REDDY, T. P. Interspecific Hybridization in the Genus *Jatropha*. Em: **Jatropha, Challenges for a New Energy Crop: genetic improvement and biotechnology**. New York: Springer, p. 423-443, 2013.

SZENDROEDI, J.; YOSHIMURA, T.; PHIELIX, E. et al. Role of diacylglycerol activation of PKC θ in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 26, p. 9597-9602, 2014.

TEDBURY, P. R.; NOVIKOVA, M.; ABLAN, S. D. et al. Biochemical evidence of a role for matrix trimerization in HIV-1 envelope glycoprotein incorporation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 2, p. E182-E190, 2015.

TENNER-RACZ, K.; SETLLBRINK, H. J.; LUNZEN, J. et al. The unenlarged lymph nodes of HIV-1-infected, asymptomatic patients with high CD4 T cell counts are sites for virus replication and CD4 T cell proliferation. The impact of highly active antiretroviral therapy. **Journal of Experimental Medicine**, v. 187, n. 6, p. 949-959, 1998.

TYAGI, M.; PEARSON, R. J.; KARN, J. Establishment of HIV Latency in Primary CD4⁺ Cells Is due to Epigenetic Transcriptional Silencing and P-TEFb Restriction. **Journal of Virology**, v. 84, n. 13, p. 6425-6437, 2010.

VALENCIA, J. A.; FRÉROT, B.; GUÉNEGO, H. et al. Effect of *Jatropha gossypifolia* leaf extracts on three Lepidoptera species. **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 32, n. 1, p. 45-48, 2006.

VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VIJAYAKUMAR, A. R.; DANIEL, E. P.; ILAVARASAN, R. et al. Ulcer Protective Activity of *Jatropha gossypifolia* Linn. in Wistar Rats. **Pharmacognosy Research**, v. 8, n. 1, S61-S66, 2016.

WANG, H.; WOLOCK, T. M.; CARTER, A. et al. Estimates of global, regional, and national incidence, prevalence, and mortality of HIV, 1980-2015: the Global Burden of Disease Study 2015. **The lancet HIV**, v. 3, n. 8, p. 361-387, 2016.

WATTS, J. M.; DANG, K. K.; GORELICK, R. J. et al. Architecture and Secondary Structure of an Entire HIV-1 RNA Genome. **Nature**, v. 460, n. 7256, p. 711-716, 2009.

WEBSTER, G. L. Classification of the Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 81, n. 1, p. 3-143, 1994.

WILEN, C. B.; TILTON, J. C.; DOMS, R. W. HIV: Cell Binding and Entry. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 8, p. a006866, 2012.

XU, J. B.; ZHANG, H.; GAN, L. S. et al. Logeracemin A, an Anti-HIV *Daphniphyllum* Alkaloid Dimer with a New Carbon Skeleton from *Daphniphyllum longercemosum*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 21, p. 7631-7633, 2014.

YVOON, V.; FRIDKIS-HARELI, M.; MUNISAMY, S. et al. The Gp120 molecule of HIV-1 and its interaction with T cells. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 741-749, 2010.

ZANDI, K.; TEOH, B. T.; SAM, S. S. et al. Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type- 2. **Virology Journal**, v. 8, n. 560, p. 1-11, 2011

ZENG, M.; HAASE, A. T.; SCHACKER, T. W. Lymphoid tissue structure and HIV-1 infection: life or death for T cells. **Trends in Immunology**, v. 33, n. 6, p. 306-314, 2012.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Analisar a atividade antiviral de extratos de plantas medicinais ocorrentes em Rio Branco contra o vírus HIV-1

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a atividade antiviral de extratos vegetais particionados em solventes com polaridade crescente contra o vírus HIV-1;
- Avaliar o potencial do extrato vegetal de *Jatropha gossypifolia* em reativar o HIV-1 latente em células J-Lat 8.4 e 10.6;
- Analisar o potencial do extrato vegetal de *J. gossypifolia* em regular a expressão de moléculas CD4 de células MT-4;
- Investigar a relação da atividade de reativação e *downregulation* do extrato vegetal de *J. gossypifolia* com a via de PKC.

4. CAPÍTULO I

4.1 INTRODUÇÃO

Há milhares de anos, as civilizações utilizam plantas para o tratamento de diversas enfermidades e essa vasta experiência de conhecimento empírico torna-se essencial nesse campo de pesquisa, já que uma das principais bases para a procura de compostos biologicamente ativos em plantas, descobrimento e síntese de novos medicamentos é a medicina popular (DI STASI, 1996; MACIEL et al., 2002).

Ainda hoje em várias regiões e grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (SIVIERO et al., 2012). Na região Amazônica, por exemplo, já foram realizados vários trabalhos etnobotânicos identificando plantas utilizadas pela população, como antiulcerogênica, anticicatrizante e antiviral (MATA et al., 2011; SANTOS; LIMA; OLIVEIRA, 2014; PEDROLLO et al., 2016). Tais observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais assim contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos (MARTINS et al., 2005; LIMA; FERREIRA; OLIVEIRA, 2011).

O HIV, proveniente da sigla em inglês de "Vírus da Imunodeficiência Humana", é um retrovírus, classificado na subfamília dos Lentiviridae, e possui dois agentes etiológicos HIV-1 e HIV-2, os quais fazem parte dos retrovírus citopáticos e não oncogênicos (SHARP; HAHN, 2011).

A epidemia da infecção pelo HIV representa um fenômeno global, dinâmico e instável, cuja forma de ocorrência nas diferentes regiões do mundo depende, entre outros determinantes, do comportamento humano individual e coletivo, destacando-se entre as enfermidades infecciosas emergentes pela grande magnitude e extensão dos danos causados às populações (BRITO et al., 2001).

O Brasil é o país mais populoso da América Latina e também o que mais concentra casos de novas infecções por HIV na região, de tal forma que, de 2007 até junho de 2016, foram notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) 136.945 casos de infecção pelo HIV no Brasil, sendo 71.396 no Sudeste (52,1%), 28.879 no Sul (21,1%), 18.840 no Nordeste (13,8%), 9.152 no Centro-Oeste (6,7%) e 6.868 na Região Norte (6,3%) (BRITO et al., 2001; MS, 2017). Segundo dados da UNAIDS (2016), do total de pessoas vivendo com HIV, 70% já foram diagnosticados e deste número, 77% estão em

tratamento para o HIV. Das pessoas em tratamento, cerca de 82% apresentam carga viral indetectável.

Entretanto, estudos já realizados com extratos de plantas medicinais revelaram que estas podem apresentar metabólitos com atividade antiviral contra o vírus HIV *in vitro* (AKRAM et al., 2018).

Portanto, visando a importância do estudo das plantas medicinais e fitoterápicos provenientes do município de Rio Branco, esse trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antiviral de extratos produzidos com espécies ocorrentes nesta região contra o vírus HIV-1.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de material vegetal e produção dos extratos

Previamente à realização da coleta, foi obtido um Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico (Número 56691-2) pelo SISBIO contendo os 25 táxons selecionados para este estudo: *Acmella oleracea*, *Alpinia purpurata*, *Bidens pilosa*, *Bryophyllum pinnatum*, *Calycophyllum spruceanum*, *Coutarea hexandra*, *Euphorbia tirucalli*, *Fridericia chica*, *Gossypium barbadense*, *Handroanthus serratifolia*, *Handroanthus impetiginosa*, *Himathanthus sucuuba*, *Jatropha curcas*, *Jatropha gossypifolia*, *Lippia alba*, *Momordica charantia*, *Morinda citrifolia*, *Piper peltatum*, *Plectranthus barbatus*, *Protium hebetatum*, *Psidium guajava*, *Ruta graveolens*, *Senna occidentalis*, *Tagetes patula*, *Uncaria guianensis*. A coleta do material vegetal (folhas, flores, fruto ou casca) foi realizada entre junho e dezembro de 2016, nos quintais de residências do município de Rio Branco - Acre, Brasil, localizados próximo a Universidade Federal do Acre (UFAC), no bairro João Eduardo II e no bairro São Francisco, no período matutino. Exsiccatas de cada um dos táxons estão depositadas no Herbário do Parque Zoobotânico, Universidade Federal do Acre (UFAC).

O material vegetal foi incubado em estufa a 40 °C até total desidratação e, posteriormente, foram trituradas até alcançar 100 g de massa utilizados para a extração em maceração exaustiva com 500 mL de etanol (99 %) à temperatura ambiente. O macerado obtido foi filtrado a vácuo e submetido ao evaporador rotativo à temperatura de 55 °C em cinco repetições (SINGH, 2008).

Partição líquido-líquido e liofilização

Os extratos brutos obtidos foram submetidos ao processo de partição líquido-líquido em funil de separação, com volume de 100 mL de água-metanol (1:10) e 100 mL de solventes

com polaridades crescentes - hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol - em três repetições cada. Os solventes foram retirados posteriormente em evaporador rotativo a 55 °C. Os extratos obtidos foram liofilizados, aliqüotados e solubilizados em DMSO para uma concentração estoque de 100 mg/mL estocada a temperatura de -20 °C, os quais compõe a Extratoteca do Laboratório de Citogenética e Genética Molecular, da Universidade Federal do Acre.

Cultura de células

Células Vero (ATCC, Waltham, MA, USA), derivadas de células de rim de macaco verde africano e células MT-4 (células de hepatocarcinoma humano) foram gentilmente doadas pelo Dr. Amilcar Tanuri da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Brasil.

As células Vero foram cultivadas em DMEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium) High Glicose (GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), suplementadas com 5% soro fetal bovino (SFB) (GIBCO), enquanto que as células MT-4 foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) a 37 °C e atmosfera 5% de CO₂.

Ensaio do efeito citotóxico in vitro

O efeito citotóxico dos extratos vegetais foi avaliado através do método de viabilidade celular. Para este procedimento, células Vero foram distribuídas em microplacas de 96 poços e após 12 horas de incubação a 37 °C e atmosfera 5% de CO₂ o meio foi removido e as células foram novamente incubadas com três diferentes concentrações de cada extrato vegetal (500 µg/mL, 100 µg/mL e 20 µg/mL) a 37 °C e atmosfera 5% de CO₂ por 5 dias.

Células tratadas com mock – células tratadas da mesma forma que as células infectadas para a obtenção do sobrenadante dos vírus, porém sem a infecção com as amostras virais – em triplicatas também foram incubadas e utilizadas como controle positivo.

Depois de decorrido este tempo, foram adicionados 20 µL de CellTiter-blue fluorescence Cell Viability Assay (Promega) em cada poço e as placas foram incubadas novamente a 37 °C e atmosfera 5% de CO₂ por 1 a 2 horas. Posteriormente as placas foram lidas em um leitor de fluorescência Spectramax M2 (Molecular Devices) em 560_{ex}/590_{em} nm. A porcentagem de células tratadas viáveis foi calculada em relação à fluorescência emitida pelo controle não tratado.

Seleção dos extratos com atividade anti-HIV-1 in vitro

Para realizar a seleção dos extratos com possível atividade contra o HIV-1, foram testados 76 extratos. Para isso os extratos foram diluídos seriadamente em três concentrações, partindo da concentração máxima não tóxica observado no ensaio do efeito citotóxico, em placas de 96 poços e posteriormente, as células em suspensão MT-4 (10^4) infectadas com HIV-1 clone NL-4.3 (MOI = 0,002) por *spinoculation* durante 2 horas a 1200 x g foram adicionadas aos poços, seguida da incubação a 37 °C e atmosfera 5% CO₂. Células não infectadas tratadas com mock também foram submetidas ao processo de *spinoculation* e usadas como controle. Como controle positivo foi utilizado o composto 3TC (6 µM), já descrito na literatura com atividade antiviral contra HIV-1 (PERRY; FAULDS, 1997).

Depois de decorrido cinco dias após a infecção com o vírus e tratamento com os extratos vegetais, foram adicionados 20 µL de CellTiter-blue fluorescence Cell Viability Assay (Promega) em cada poço e as placas foram incubadas novamente a 37 °C e atmosfera 5% de CO₂ over night. Decorrido 24 horas as placas foram lidas em um leitor de fluorescência Spectramax M2 (Molecular Devices) em 560_{ex}/590_{em} nm. A porcentagem de células tratadas viáveis foi calculada em relação à fluorescência emitida pelo controle não tratado.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio do efeito citotóxico in vitro

Todos os 76 extratos vegetais obtidos da Extratoteca de Plantas Vegetais do Laboratório de Citogenética e Genética Molecular, foram testados frente as células Vero para verificar a sua citotoxicidade *in vitro* através do teste de viabilidade celular (Quadro 1).

Quadro 1. Concentração máxima não tóxica (> 60%) dos extratos particionados frente células Vero tratadas nas concentrações de 500, 100 e 20 µg/mL. O quadro representa a concentração máxima em que as células obtiveram mais de 60% de viabilidade na presença dos extratos. (fo) se refere a extratos produzidos utilizando-se de folhas, (fl) com flores e (fr) com frutos. (D) refere-se a partição diclorometano, (A) acetato de etila, (B) butanólica, (Aq) aquosa, (H) hexano e (Br) bruto.

Espécie	#	Partição	VERO (CMNT)
<i>U. guianensis</i>	1.1	D	20
	2.1	A	100
	3.1	B	100
<i>P. hebetatum</i>	4.1	D	< 20
	5.1	A	100
	6.1	B	20
<i>T. patula</i>	10.1	D	< 20
	11.1	A	100
	12.1	B	100
<i>L. alba</i>	13.1	D	< 20
	14.1	A	100
	15.1	B	20
<i>C. spruceannum</i>	16.1	D	100
	17.1	A	100
	18.1	B	100
	19.1	Aq	100
<i>F. chica</i>	20.1	D	< 20
	21.1	A	100
	22.1	B	100
<i>S. occidentalis</i>	23.1	D	20
	24.1	A	100
	25.1	B	100
<i>B. pilosa</i>	26.1	D	20
	27.1	A	500
	28.1	B	500
<i>H. sucuuba</i>	29.1	D	20
	30.1	A	500
	31.1	B	500
	32.1	Aq	100
<i>P. guajava</i>	33.1	D	20
	34.1	A	100
	35.1	B	100
<i>E. tirucalli</i>	36.1	D	20
	37.1	A	500
<i>C. hexandra</i>	38.1	H	20
	39.1	D	20
	40.1	A	20
	41.1	B	20
<i>J. curcas</i>	42.1	D	20
	43.1	A	500
	44.1	B	100

Quadro 1. (Continuação)

<i>R. graveolens</i>	45.1	D	< 20
	46.1	A	100
	47.1	B	100
<i>J. gossypifolia</i>	49.1	A	100
	50.1	D	20
<i>H. impetiginosa</i>	51.1	Br	100
<i>A. purpurata</i> (fo)	52.1	D	20
	53.1	A	500
	54.1	B	100
<i>B. pinnatum</i>	55.1	D	20
	56.1	A	< 20
	57.1	B	< 20
<i>M. charantia</i>	58.1	D	< 20
	59.1	A	500
	60.1	B	500
<i>A. olleracea</i>	61.1	D	500
	62.1	A	500
<i>H. serratifolia</i> (fo)	65.1	D	20
	66.1	A	500
	67.1	B	500
<i>M. citrofolia</i> (fo)	68.1	D	20
	69.1	A	500
	70.1	B	500
<i>G. barbadense</i>	71.1	D	< 20
	72.1	A	100
	73.1	B	500
<i>P. barbatus</i>	74.1	D	< 20
	75.1	A	100
	76.1	B	100
<i>P. peltatum</i>	77.1	D	20
	78.1	A	500
	79.1	B	500
<i>A. purpurata</i> (fl)	80.1	Br	20
<i>H. serratifolia</i> (fl)	81.1	Br	100
<i>M. citrofolia</i> (fr)	82.1	Br	100

Com base nos dados apresentados no quadro 1 podemos observar que uma considerável parcela dos extratos testados (13,2%) apresentaram concentração máxima não tóxica (viabilidade celular superior a 60 %) abaixo de 20 µg/mL em células Vero. Esses dados também revelam que os extratos particionados com diclorometano, em sua quase totalidade (exceto pelos extratos 16.1 e 61.1), foram os que apresentaram a concentração máxima não tóxica menor do que a dos outros extratos particionados com acetato de etila e butanol testados em células Vero, variando entre 20 µg/mL (65%) e abaixo desta concentração (34%).

Para evitar interferências fluorescentes da clorofila presente no extrato com o reagente utilizado para revelação do teste, medidas foram tomadas no momento da preparação dos extratos, de forma que os extratos particionados com hexano, o qual é rico em substâncias de características apolares e clorofilas que tem afinidade pelo hexano, foram descartados. Entretanto, a partição diclorometano, ainda pode apresentar poucas interferências, como foi notado, já que ainda contêm substâncias com baixa polaridade.

Interessantemente, os extratos 38-41.1 e 55-57.1 originados, respectivamente, das plantas *C. hexandra* (quina-quina) e *B. pinnatum* (corama) apresentaram baixa viabilidade celular em todos os seus extratos particionados em ambos os tipos celulares, ou seja, provavelmente apresentam uma concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) baixa ($\leq 20\mu\text{g/mL}$), o que é preocupante, pois estas espécies são largamente utilizadas pela população para tratar gripe, tosse, sinusite, gastrite, inflamação no útero, como anti-inflamatório e outros fins terapêuticos (SILVA et al., 2015; SILVA; MARINI; MELO, 2015).

Sendo assim, a partir dos resultados obtidos com este ensaio, podemos montar em placas de 96 poços as concentrações máximas não tóxicas de cada partição, concentrados 100 vezes para realização da triagem em ensaio com atividade antiviral dos extratos *in vitro*.

Seleção dos extratos com atividade antiviral contra HIV

A análise da atividade anti-HIV-1 desempenhada pelos extratos foi realizada utilizando células MT-4 infectadas com HIV-1 NL-4.3 (MOI=0,002) tratadas com os 76 extratos.

Com os resultados obtidos podemos verificar que dentre os 76 extratos vegetais testados, oito apresentaram atividade antiviral contra o HIV-1 (Figura 1). Todavia, dois desses extratos já possuem atividade antiviral contra o HIV-1 relatada: os extratos 36.1 e 42.1, pertencentes às espécies *Euphorbia tirucalli* (avelós) e *Jatropha curcas* (pinhão manso), respectivamente (ABREU et al., 2014; DAHAKE et al., 2012). Dessa forma, o resultado positivo para estes dois extratos confirma que as extrações foram realizadas dentro das normas para que os extratos não sofressem perda de compostos bioativos pela temperatura ou outros fatores.

Entretanto, o extrato 50.1, oriundo da partição diclorometano de pinhão-roxo (*J. gossypifolia*), apresentou atividade antiviral satisfatória frente à infecção do HIV-1 neste teste alcançando 30 % da viabilidade celular na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 1).

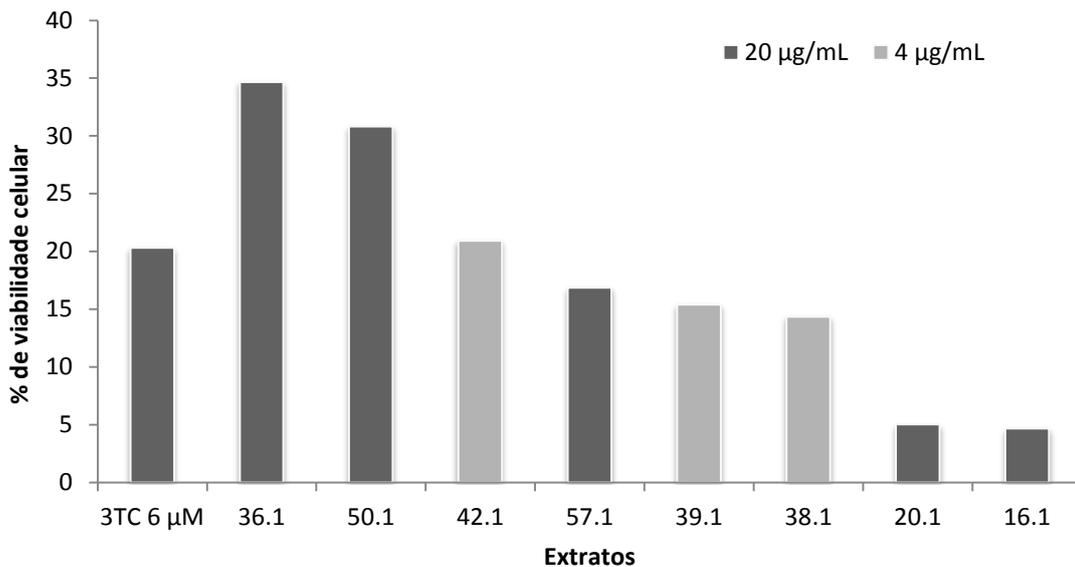


Figura 1. Viabilidade de células MT-4 na seleção dos extratos vegetais contra a infecção por HIV (NL-4.3). A figura representa a porcentagem de células MT-4 viáveis previamente infectadas com HIV-1 NL-4.3 (MOI=0,002) e tratadas com três diferentes concentrações de 76 extratos vegetais.

Os extratos 16.1 e 20.1, oriundos das espécies *Calycophyllum spruceanum* (mulateiro) e *Fridericia chica* (crajiuru), não apresentaram potencial satisfatório em inibir a infecção do HIV-1 em células MT-4 no ensaio antiviral, de forma que sugerimos que novos estudos possam ser realizados para purificar os extratos diclorometânicos destas espécies afim de eliminar substâncias tóxicas presentes nos mesmos, visto que no teste de citotoxicidade ambas as partições tiveram CMNT abaixo de 100 µg/mL.

Outros extratos como o 57.1 (*B. pinnatum*) e 38.1-39.1 (*C. hexandra*) também apresentaram capacidade de proteger as células tratadas da infecção pelo vírus, porém em uma porcentagem menor do que a apresentada pelo 50.1, chegando a proteger em torno de 16% das células por ambos na concentração de 20 µg/mL e 4 µg/mL, respectivamente, tornando este o primeiro relato de atividade antiviral contra o HIV-1 para ambas espécies.

Interessante notar que dentre os oito extratos com atividade confirmada, somente um deles não teve origem da partição diclorometano (57.1). E, além disso, cinco desses extratos também apresentaram atividade anti-CHIKV e anti-DENV-2 em outros testes realizados pelo pesquisador (dados não mostrados).

Sendo assim, com os dados obtidos com este teste inicial, foram realizados ensaios mais aprofundados com o extrato da espécie *J. gossypifolia* que deu origem ao artigo apresentado no capítulo 2.

4.4 CONCLUSÃO

Podemos verificar assim, que plantas oriundas do município de Rio Branco, Acre, apresentam potencial para produção de metabólitos capazes de inibir a infecção do vírus HIV-1 e proteger células MT-4 do mesmo.

Dessa forma, dentre os 76 extratos vegetais testados, foram encontrados oito extratos com atividade suficiente contra o vírus, e dentre estes, a espécie *J. gossypifolia* foi tomada como a de maior potencial para novos testes e identificação de metabólitos com ação antiviral.

Além disso, foi possível verificar que extratos particionados em diclorometano têm uma tendência a serem mais tóxicos em células Vero do que outros extratos particionados com solventes de polaridade maior.

Desta forma, este trabalho é o começo para uma nova fonte de pesquisa por novos compostos bioativos naturais, que possam vir a substituir substâncias sintéticas na indústria farmacêutica e assim poder enriquecer o conhecimento sobre o potencial medicinal da flora da região amazônica como um todo e mais especificamente do estado do Acre que ainda tem muito a crescer na área da pesquisa e inovação tecnológica.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, C. M.; PRICE, S. L.; SHIRK, E. N. et al. Dual role of novel ingenol derivatives from *Euphorbia tirucalli* in HIV replication: inhibition of de novo infection and activation of viral LTR. **PlosOne**, v. 9, n. 5, p. 1-14, 2014.

AKRAM, M.; TAHIR, I. M.; SHAH, S. M. A. Antiviral potential of medicinal plants against HIV, HSV, influenza, hepatitis, and coxsackievirus: A systematic review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 5, p. 811-822, 2018.

BRITO, A. M.; CASTILHO, E. A.; SZWARCOWALD, C. L. AIDS and HIV infection in Brazil: a multifaceted epidemic. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 2, p. 207-217, 2001.

DAHAKA, R.; ROY, S.; PATIL, D. et al. Evaluation of anti-viral activity of *Jatropha curcas* leaf extracts against potentially drug-resistant HIV isolates. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 14, 2012.

DI STASI, L. C. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência, um Guia de Estudo Interdisciplinar**. São Paulo: UNESCO, 1996. 230 p.

LIMA, P. G. C.; FERREIRA, M. C.; OLIVEIRA, R. Plantas medicinais em feiras e mercados públicos do Distrito Florestal Sustentável da BR-163, estado do Pará, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 2, p. 422-434, 2011.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F. et al. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MARTINS, A. G.; ROSÁRIO, D. L.; BARROS, M. N. et al. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais, alimentares e tóxicas da Ilha do Combu, Município de Belém, Estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 86, n. 1, p. 21-30, 2005.

MATA, E. C. G.; GONÇALVES, M. C. A.; SEGOVIA, J. F. O. et al. Antiretroviral activity of Amazonian plants. **Retrovirology**, v. 8, Suppl. 2, P87, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico HIV/Aids 2016. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. v. 48, n.1, 2017. Disponível em: http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/janeiro/05/2016_034-Aids_publicacao.pdf. Acessado em: 22/05/2018.

PEDROLLO, C. T.; KINUPP, V. F.; SHEPARD JR, G. et al. Medicinal plants at Rio Jauaperi, Brazilian Amazon: Ethnobotanical survey and environmental conservation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 186, n. 1, p. 111-124, 2016.

PERRY, C. M.; FAULDS, D. Lamivudine: a review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of HIV infection. **Drugs**, v. 53, p. 657-680, 1997.

SANTOS, M. R. A.; LIMA, M. R.; OLIVEIRA, C. L. L. G. Medicinal plants used in Rondônia, Western, Amazon, Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 707-720, 2014.

SHARP, P. M.; HAHN, B. H. Origins of HIV and the AIDS Pandemic. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. v. 1, n. 1, p. a006841–a006841, 2011.

SILVA, C. G.; MARINHO, M. G. V.; LUCENA, M. F. A. et al. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de Caatinga na comunidade do Sítio Nazaré, município de Milagres, Ceará, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 133-142, 2015.

SILVA, M. D. P.; MARINI, F. S.; MELO, R. S. Levantamento de plantas medicinais cultivadas no município de Solânea, agreste paraibano: reconhecimento e valorização do saber tradicional. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 881-890, 2015.

SINGH, J. Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants. In: Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. **United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology**, Padriciano, Italy, p. 67-82, 2008.

SIVIERO, A.; DELUNARDO, T. A.; HAVERROTH, M. et al. Plantas medicinais em quintais urbanos de Rio Branco, Acre. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 14, n. 4, p. 598-610, 2012.

UNAIDS, 2016. **Boletim epidemiológico sobre a AIDS, 2016**. Disponível em: <https://unaid.org.br/estatisticas/>. Acessado em: 22/05/2018.

5. CAPÍTULO II

Efeito do extrato de *Jatropha gossypifolia* L. (bellyache bush) na atividade antiviral , reativação do vírus latente e inibição da infecção *De Novo* do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1)

Pedro Junior Pinheiro Mourão¹, Rodrigo Delvecchio da Cunha², Mônica Oliveira Silva³, Margarida Lima Carvalho^{3,4}, Adriano Antônio Silva³, Amilcar Tanuri², Emmerson Corrêa Brasil da Costa^{1,4}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Laboratório de Citogenética e Genética Molecular, Universidade Federal do Acre, Rio Branco – AC, Brasil.

² Laboratório de Virologia Molecular, Instituto de Biologia, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, Brasil.

³ Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Universidade Federal do Acre, Rio Branco – AC, Brasil.

⁴ Laboratório de Citogenética e Genética Molecular, Centro de Ciências da Saúde e do Desporto, Universidade Federal do Acre, Rio Branco – AC, Brasil.

RESUMO

Apesar da supressão prolongada de vírus plasmáticos por tratamento antirretroviral, a latência do HIV ainda é um obstáculo fundamental para a cura permanente da infecção. Vários compostos naturais e sintéticos, entretanto, já foram capazes de ativar eficientemente o HIV-LTR, responsável por reativar o vírus latente, a qual é uma das estratégias para a cura do HIV. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiviral e o potencial de reativação do HIV-1 latente e inibição da infecção *De Novo* utilizando o extrato diclorometânico de *Jatropha gossypifolia* (JGDM). Nossos resultados mostraram que o extrato JGDM apresentou atividade antiviral contra HIV-1, com IC₅₀ = 23,1 µg/mL e reativação do próvirus latente em células J-LAT 8.4 e 10.6 de 4% e 32%, respectivamente. Além disso, enquanto que no teste da *downregulation* de moléculas CD4 podemos observar uma redução de 75% das moléculas CD4 da superfície das células. Também foi observado que na presença do inibidor GÖ6983 e ROa atividade de reativação e *downregulation* foi inibida comprovando que o composto bioativo presente no extrato age através da via de PKC. Conclui-se, portanto, que o extrato diclorometânico de *J. gossypifolia* apresenta atividade antiviral e de reativação do vírus latente do -HIV-1 e promove a regulação negativa de moléculas CD4 em linhagens de células T humanas (MT-4).

Keywords: Natural Products; HIV; *Downregulation*; CD4; PKC.

Correspondence to: Universidade Federal do Acre - Campus Universitário – Centro de Ciências da Saúde do Desporto - BR 364, km 4 - Distrito Industrial, Rio Branco, AC, 69920-900, Brazil. Tel. +55 21 98188-2588. costaemm.biomed@yahoo.com (E. C. B. Costa).

5.1 INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas três décadas, grandes progressos foram alcançados na luta contra o HIV, como o uso da terapia antiretroviral altamente ativa (HAART), que reduziu drasticamente a carga viral para níveis indetectáveis e aumentou a contagem de linfócitos T CD4 + em pacientes infectados, o que resultou na redução da mortalidade, prevenção da taxa

de progressão para a AIDS e aumento da taxa de sobrevivência de indivíduos infectados (Autran et al., 1997; Brady et al., 2010).

Apesar da supressão prolongada de vírus plasmáticos por tratamento antirretroviral, a HAART somente ataca vírus com atividade de replicação ativa e tem pouca influência sobre os reservatórios virais latentes, tornando a latência do HIV um obstáculo fundamental para a cura permanente da infecção (Pomerantz, 2002; Murray et al., 2016).

Várias abordagens terapêuticas, que envolvem cura esterilizante ou cura funcional, estão sendo consideradas para controlar ou eliminar os reservatórios de vírus latente (Archin; Margolis, 2014). Uma dessas estratégias, considerada uma das mais promissoras para realizar uma cura para o HIV, é denominada "*shock and kill*", a qual visa tratar pacientes com agentes ativadores de HIV para forçar a replicação viral em células com reservatórios de vírus latente (Deeks, 2012). Posteriormente, a reativação da expressão do HIV induziria efeitos citopáticos virais, depuração imune e morte celular, eliminando assim células infectadas de forma latente, enquanto as células não infectadas são protegidas pela terapia antirretroviral, bloqueando a infecção *de novo* (Laird et al., 2015; Rasmussen; Tolstrup; Sogaard, 2016).

Entre as abordagens estudadas, a via PKC tem desempenhado um papel importante na reativação da latência celular através de uma sinalização NF- κ B, que conduz à translocação nuclear de NF- κ B levando à ativação do HIV-LTR (Folgueira et al., 1996). O fator positivo b de alongamento da transcrição (P-TEFb), da mesma maneira, também está envolvido no processo de reativação do HIV-1, desempenhando um papel de co-ativador da NF- κ B (Barboric et al., 2001).

Vários compostos naturais e sintéticos - principalmente diterpenos - já foram capazes de ativar as isoformas de PKC se ligando ao seu domínio regulador, imitando o ligando fisiológico diacilglicerol (DAG) sem induzir a formação de tumores, como o PEP005 (ingenol-3-angelate) (Jiang et al., 2015) e o Ingenol-B (ingenol-3-hexanoate) (Abreu et al., 2014), a lactona briostatina-1, isolada do briozoário marinho *Bugula neritina* (Mehla et al., 2010) e membros da família dos ésteres de forbol, como o 12-deoxiforbol 13-fenilacetato (DPP) (Bocklandt; Blumberg; Hamer, 2003), o PMA (Li; Mak; Franza, 1994) e o 12-desoxiforbol 13-acetato (prostratina) ativaram eficientemente o HIV-LTR (Korin et al., 2002). Entretanto, apesar da vasta disponibilidade de agentes revertentes de latência (ARLs) identificados, alguns compostos, embora sejam ativos, ainda apresentam algumas barreiras como a toxicidade e baixa potência (Beans et al., 2013).

Pertencente à família Euphorbiaceae, o gênero *Jatropha* possui mais do que 70 espécies arbustivas, dentro do qual se encontra a espécie *Jatropha gossypifolia* Linneus popularmente conhecida no Brasil como “pinhão roxo” (Oliveira et al., 2009). Apesar de se tratar de uma espécie originada da América do Sul, a mesma é comumente encontrada e cultivada na maioria dos países tropicais e subtropicais do mundo (Félix-Silva et al., 2014). Estudos farmacológicos têm demonstrado ação significativa do extrato e/ou compostos isolados a partir desta planta como antimicrobianos, antiinflamatórios, antidiarréicos, agentes anti-hipertensivos e anticancerígenos, entre outros, apoiando alguns dos seus usos populares (Purohit; Purohit, 2011; Nagaharika et al., 2013; Apu et al., 2012; Abreu et al., 2003; Falodun et al., 2012).

Portanto, neste presente trabalho o extrato diclorometânico obtido a partir da espécie *Jatropha gossypifolia* (JGDM) foi testado a fim de verificar potencial na inibição da infecção *De Novo* e reativação do vírus HIV latente, assim como a sua atividade antiviral *in vitro*.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Cultura de células e vírus

As células J-Lat clones 8.4 e 10.6, MT-4 e Vero (ATCC, USA) foram obtidas a partir do NIH AIDS Reagent Program. As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) a 37 °C e atmosfera 5% de CO₂. O vírus HIV-1 (NL 4.3) também foi obtido a partir do NIH AIDS Reagent Program.

Reagentes

Os reagentes utilizados foram: inibidores de PKC (GÖ6983, GÖ6976 e RO-31-8220 – Sigma-Aldrich), Ingenol-B (Ing-B - Kyolab) e lamivudina (3TC - NIH AIDS Reagent Program). Os compostos (Ing-B e 3TC) foram resuspensores em DMSO até a concentração de 200 µM e estocados em freezer -80 °C. Para a realização de testes com células, esses compostos foram diluídos em meio de cultura RPMI 1640 (*Life Technologies*) suplementado com 10% de SFB, mantendo a concentração de 1% de DMSO.

Extratos vegetais

A coleta da espécie *Jatropha gossypifolia* (folha) foi realizada em setembro de 2016, no município de Rio Branco, Acre, Brasil no período matutino. A exsiccata da espécie foi depositada no Herbário do Parque Zoobotânico, Universidade Federal do Acre (UFAC) sob o número de registro UFACPZ20439.

O material vegetal foi incubado em estufa a 40 °C até total desidratação e, posteriormente, foram trituradas até alcançar 100 g de massa utilizados na extração através de maceração exaustiva com 500 mL de etanol (99 %) à temperatura ambiente. O macerado obtido foi filtrado a vácuo e submetido ao evaporador rotativo à temperatura de 55 °C em cinco repetições (Singh, 2008). O extrato bruto obtido foi particionado em diclorometano e, posteriormente, uma solução estoque foi preparada dissolvendo 0,01 g do extrato em 0,1 mL de DMSO (100 mg/mL) e estocada a – 80 °C até a sua utilização.

Ensaio do efeito citotóxico in vitro

O efeito citotóxico do extrato vegetal foi avaliado através do método de viabilidade celular. Para este procedimento, células MT-4 (10^4 por poço) foram distribuídas em microplacas de 96 poços e incubadas com diferentes concentrações do extrato JGDM (320 µg/mL – 1.25 µg/mL FD=2) a 37 °C e atmosfera 5% de CO₂ por 5 dias. Células tratadas com mock – células tratadas da mesma forma que as células infectadas para a obtenção do sobrenadante dos vírus, porém sem a infecção com as amostras virais – em triplicatas também foram incubadas e utilizadas como controle negativo.

Ensaio da atividade anti-HIV-1 in vitro

Para avaliar a atividade antiviral *in vitro* do extrato JGDM contra HIV-1, células MT-4 (10^4) foram infectadas com HIV-1 clone NL-4.3 (MOI = 0.002) através de *spinoculation* durante 2 horas a 1200 x g e então adicionadas aos poços em placas de 96 poços. Células não infectadas tratadas com mock também foram submetidas ao processo de *spinoculation* e usadas para avaliar a atividade citotóxica e como controle. Após o plaqueamento, foram adicionados 100 µL de cada concentração (320 µg/mL FD=2) do extrato diluído em seis replicatas, seguida da incubação a 37° C e 5% CO₂. Como controle positivo foi utilizado o composto 3TC (200 µM FD=2), já descrito na literatura com atividade antiviral contra HIV-1 (Perry; Faulds, 1997).

Depois de decorrido cinco dias após a infecção com o vírus e tratamento com o extrato vegetal, foram adicionados 20 μL de CellTiter-blue fluorescence Cell Viability Assay (Promega) em cada poço e as placas foram incubadas novamente a 37 °C e atmosfera 5% de CO_2 over night. Decorrido 24 horas as placas foram lidas em um leitor de fluorescência Spectramax M2 (Molecular Devices) em 560_{ex}/590_{em} nm. O índice de seletividade representa o grau de segurança para a utilização de uma amostra teste *in vitro*, então para determinar a seletividade das amostras com atividade anti-HIV, se determinou o índice de seletividade utilizando a fórmula: $\text{IS} = \text{CC}_{50} \text{ em MT-4} / \text{IC}_{50} \text{ contra o HIV}$. CC_{50} e IC_{50} foram calculados utilizando o programa Sigma Plot v.10.0.

Ensaio da reativação do HIV-1 latente in vitro

Foram utilizadas placas de 24 poços e cinco concentrações em duplicata do extrato JGDM (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FD=2), além do controle positivo feito em duplicata pelo Ingenol-B (1 μM) (Abreu et al., 2014). As células utilizadas neste ensaio, J-Lat clones 8.4 e 10.6, foram plaqueadas e então as concentrações do extrato diluído foram adicionadas em duplicatas no mesmo volume das células (250 μL), seguida da incubação da placa a 37 °C e 5% de CO_2 por 24 horas. Células não tratadas (mock) com composto também foram incubadas em duplicata e utilizadas como controle negativo.

Depois da incubação, o conteúdo de cada poço foi pipetado em eppendorfs de 1,5 mL e centrifugado a 400 x g por 4 minutos. Após centrifugação, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com 50 μL de PBS e a expressão de GFP foi avaliada em um citômetro BD Accuri C6 (BD Biosciences).

Ensaio da downregulation de moléculas CD4 in vitro

Foram utilizadas placas de 24 poços e cinco concentrações do extrato JGDM (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FD=2), além do controle positivo feito pela substância Ing-B (1 μM) (Abreu et al., 2014). Células MT-4 foram plaqueadas e então as concentrações do extrato diluído foram adicionadas em duplicatas no mesmo volume das células (250 μL), seguida da incubação da placa a 37 °C e 5% de CO_2 por 24 horas. Células não tratadas (mock) com composto também foram incubadas e utilizadas como controle negativo.

Decorrido este tempo, o conteúdo de cada poço foi pipetado em eppendorfs de 1,5 mL e centrifugado a 400 g por 4 minutos. Após a centrifugação, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com 50 μL de PBS e centrifugadas novamente a 400 x g por

4 minutos. Posteriormente, o PBS foi removido e o anticorpo CD4-Qdot 655 (clone S3.5 – Life Technologies) diluído 10% em PBS 1x foi adicionado em cada um. Após o intervalo de 1 hora em freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, a fluorescência das células marcadas foi avaliada em citômetro BD Accuri C6 (BD Biosciences).

Inibição da via PKC na reativação do HIV-1 latente e downregulation de CD4

Para verificar a possível via de ação do extrato JGDM, foram realizados testes com as células J-Lat clones 10.6 e MT-4 utilizando os mesmos protocolos realizados nos ensaios da reativação do HIV-1 latente e da *downregulation* de moléculas CD4, respectivamente. Porém, neste ensaio, as células foram inicialmente incubadas por 30 minutos com diferentes inibidores de PKC (GÖ6983, GÖ6976 e RO-31-8220) na concentração de $1\text{ }\mu\text{M}$. Então, as células foram tratadas com as cinco concentrações do extrato JGDM e Ing-B ($1\text{ }\mu\text{M}$) em duplicatas para cada inibidor e incubadas por 24 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 5% de CO_2 . Células não tratadas com composto foram incubadas com cada um dos inibidores em duplicata nas mesmas condições das tratadas. A fluorescência das células MT-4 marcadas com o anticorpo anti-CD4 e a expressão de GFP das células J-Lat reativadas foram avaliadas por um citômetro BD Accuri C6 (BD Biosciences).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito citotóxico e atividade antiviral contra HIV-1

Avaliando o potencial antiviral do extrato diclorometânico de *J. gossypifolia* (JGDM) podemos observar que o mesmo apresenta atividade antiviral contra o HIV-1 em células MT-4 com $\text{IC}_{50} = 23,1\text{ }\mu\text{g/mL}$, principalmente na concentração de $40\text{ }\mu\text{g/mL}$ onde obteve a maior média de células vivas. O controle positivo (3TC) também foi capaz de inibir a infecção do HIV-1 em células MT-4, principalmente entre as concentrações de 50 e $6,25\text{ }\mu\text{M}$ (dados não mostrados). Em relação à citotoxicidade, por sua vez, os ensaios demonstraram que o JGDM desempenha baixa atividade citotóxica na sua concentração efetiva ($40\text{ }\mu\text{g/mL}$) apresentando CC_{50} de $50,2\pm 1,9\text{ }\mu\text{g/mL}$ (Figura 1 e 2). Da mesma maneira, o controle positivo não desempenhou atividade citotóxica entre as concentrações efetivas contra o HIV-1 (dados não mostrados).

Para interpretação dos resultados do índice de seletividade, se considerou que um IS superior a 1 indica que o composto em estudo apresenta maior seletividade para o HIV do que

para a célula MT-4, enquanto que um IS inferior a 1 indica que composto apresenta maior toxicidade para MT-4 do que para o HIV. Quanto maior o valor numérico do I.S., mais seletivo é o composto em estudo, ou seja, pouco tóxico para célula MT-4 e ativo para o HIV. Em nosso estudo o IS foi igual a 2,17, ou seja, o composto é mais ativo contra o HIV do que para a célula.

Vale ressaltar que a espécie *J. gossypifolia* não apresentam nenhum relato na literatura de terem alguma atividade antiviral, sendo este o primeiro relato deste tipo para esta espécie.

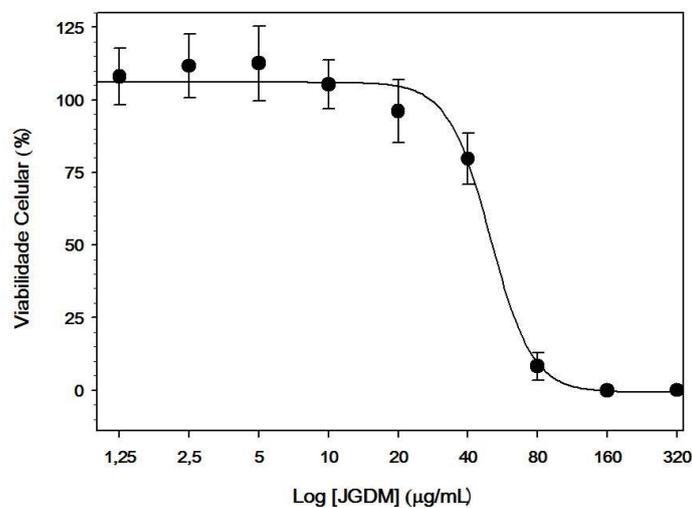


Figura 1. Viabilidade celular de células MT-4 tratadas com diferentes concentrações do extrato JGDM. Células MT-4 foram tratadas com nove diferentes concentrações do extrato JGDM. Após cinco dias de incubação, a viabilidade celular foi avaliada usando Cell-Titer blue kit. A curva é derivada de uma regressão não-linear enquanto que os valores representados correspondem à média \pm E.P.M. O experimento foi realizado em três triplicatas.

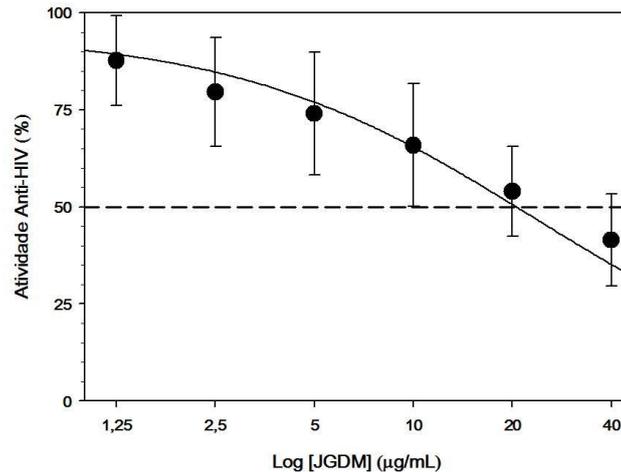


Figura 2. Atividade antiviral do extrato JGDM frente a infecção do vírus HIV-1 em células MT-4. Células MT-4 foram infectadas com HIV-1 NL-4.3 e tratadas com nove diferentes concentrações do extrato JGDM. Após cinco dias de incubação, a viabilidade celular foi avaliada usando Cell-Titer blue kit. A curva é derivada de uma regressão não-linear enquanto que os valores representados correspondem à média \pm E.P.M. O experimento foi realizado em três triplicatas.

Cerca de 400 diterpenóides já foram isolados de plantas do gênero *Euphorbia* (Lu et al., 2008; Avila et al., 2010) com um amplo espectro de atividades biológicas relatadas como irritantes da pele e dos olhos (Bigoniya; Shukla; Singh, 2010), apoptótica (Blanco-Molina et al., 2001), citotóxica (Vigone et al., 2005) e indutora da proliferação celular (Touraine et al., 1977).

Vários constituintes químicos também já foram detectados em extratos de diferentes partes de *J. gossypifolia*, tais como ácidos graxos, açúcares, alcalóides, aminoácidos, cumarinas, esteróides, flavonóides, lignanos, proteínas, saponinas, taninos, e terpenóides (Félix-Silva et al., 2014).

De acordo com revisão realizado por Zhang *et al.* (2009), os principais compostos isolados do gênero *Jatropha* são os terpenóides, onde se encontram os diterpenos. Entre os diterpeno isolados do pinhão roxo encontram-se o citlalitrione, jatrophenone, falodone, jatrophone, jatrophenolone A e jatrophenolone B (Félix-Silva et al., 2014).

Segundo estudos, os diterpenóides estruturalmente relacionados do tipo tiglianes e dafnanes, como por exemplo, a prostratina e 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), são conhecidos por possuírem propriedades anti-HIV, mas também atividades pró-inflamatórias e não promotoras de tumores, através da ampla ativação ou modulação de PKCs (isoenzimas da proteína quinase C) (Saraiva et al., 2004; Goel et al., 2007; Bourjot et al., 2012).

Nothias-Scaglia et al. (2015) relatam que compostos como os diterpenóides que modulam a via de PKC também apresentam um mecanismo de ação comum baseado na via para inativação de vírus como o HIV e Chikungunya virus (CHIKV). Ao realizar uma análise de Pearson com dados da atividade anti-CHIKV e anti-HIV de compostos do tipo tigliane, ingenane e dafnane em uma relação linear, os pesquisadores comprovaram a atividade para ambos os vírus desempenhada pelos compostos.

Sendo assim, a fim de verificar a via de ação dos compostos presentes no extrato diclorometânico de *Jatropha gossypifolia* com atividade positiva contra o HIV-1 no ensaio antiviral foram realizados testes de reativação do HIV latente.

Ensaio da reativação do HIV latente e inibição da PKC

O ensaio da reativação do HIV latente foi realizado utilizando a partição JGDM em cinco concentrações, tendo como concentração inicial 80 µg/mL (FD=2). Para reativar o HIV latente foram utilizadas células J-Lat clones 8.4 e 10.6.

Os resultados mostram que o JGDM apresenta compostos capazes de reativar o HIV latente em células J-Lat 8.4, porém com um potencial menor do que outras plantas da mesma família (Abreu et al., 2014; José et al., 2014), chegando a alcançar em torno de 4% de reativação na concentração de 80 µg/mL, o que em relação ao controle utilizado é considerado um baixo potencial (Figura 3 e 4). Em comparação aos resultados obtidos com o teste da citotoxicidade em MT-4, no qual a concentração de 80 µg/mL apresentou alta atividade citotóxica, podemos então cogitar que a sensibilidade das células J-Lat 8.4 e 10.6 aos compostos tóxicos presentes nesta concentração é menor.

Do mesmo modo, os resultados obtidos com a utilização das células J-Lat 10.6, a qual tem uma sensibilidade maior para reativação do vírus latente, podemos demonstrar que a fração JGDM utilizada tem um potencial de reativação baixa, quando comparado com 1µM de Ing-B, podendo chegar a reativar de 32% do vírus latente na concentração de 40 µg/mL (Figura 3 e 4), representando uma diferença de 51% com Ing-B.

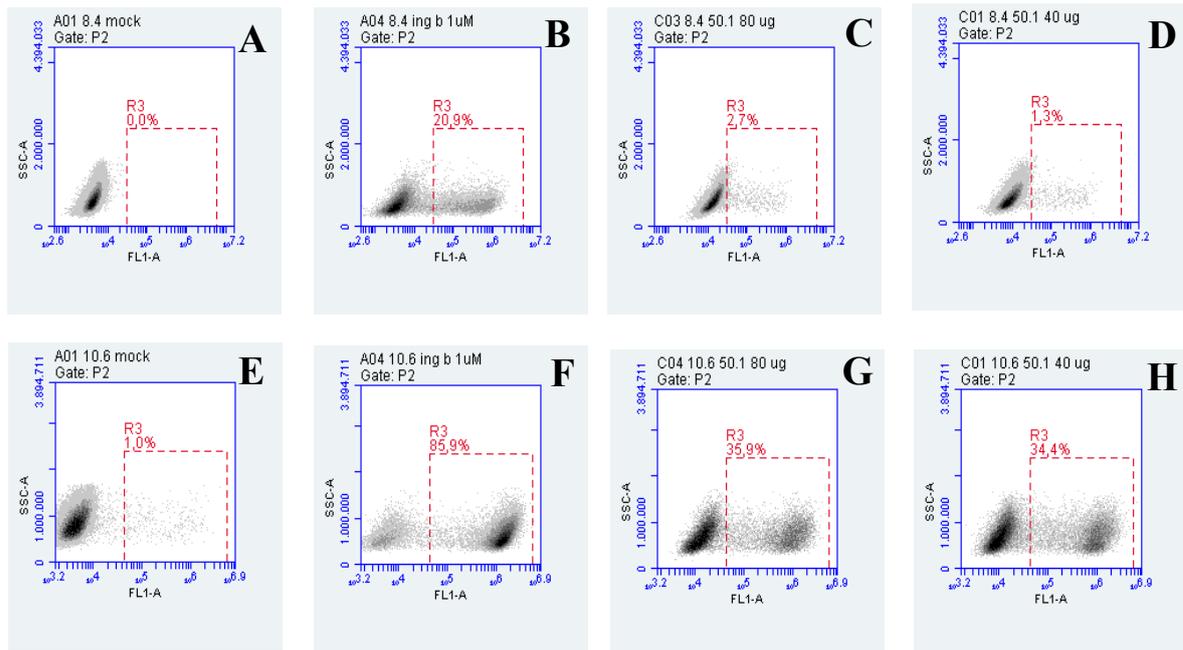


Figura 3. Ilustração do perfil do potencial de reativação do HIV latente utilizando diferentes moléculas em diferentes modelos celulares visto por citometria de fluxo. A expressão de GFP em células J-Lat clones 8.4 foi medida através da citometria de fluxo em células sem tratamento (mock) (A), em células tratadas com o controle positivo (Ing-B) na concentração de $0,45 \mu\text{g/mL}$ (B) e com o extrato JGDM (50.1) nas concentrações de $80 \mu\text{g/mL}$ (C) e $40 \mu\text{g/mL}$ (D) por 24 horas. Experimento similar foi feito em células J-Lat clone 10.6 (E, F, G, H). A imagem mostra o aumento na fluorescência basal das células devido à expressão de GFP presente no genoma do HIV-1 latente das células J-Lat.

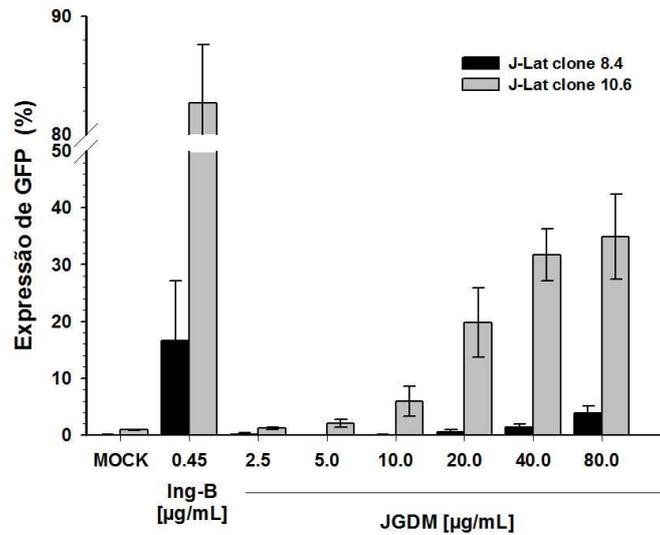


Figura 4. Potencial de reativação do HIV-1 latente em células J-Lat 8.4 e 10.6 tratadas com extrato JGDM em várias concentrações. O extrato JGDM apresenta potencial de reativação em comparação com outro composto conhecido pelo seu potencial reativador (Ing-B). Células J-Lat 8.4 e 10.6 foram incubadas com Ing-B (0,45 µg/mL) e extrato JGDM (80, 40, 20, 10, 5 e 2,5 µg/mL) por 24 horas e posteriormente foi feita a leitura da fluorescência por citometria de fluxo. Os valores representados correspondem à média ± E.P.M de quatro experimentos.

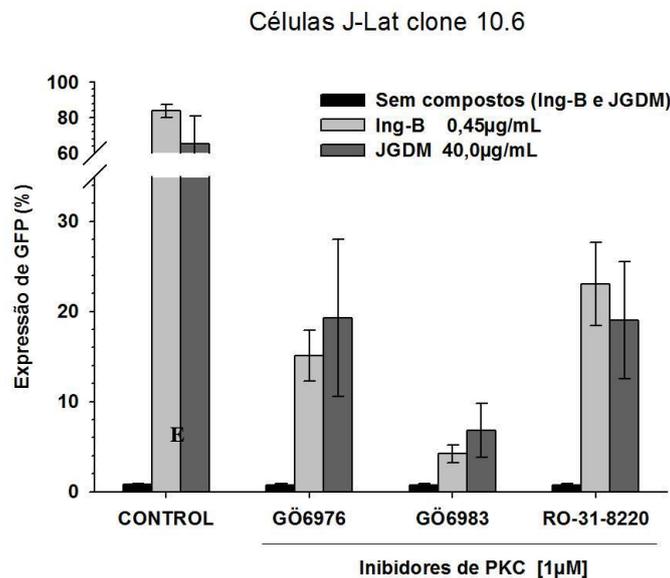


Figura 5. Potencial de reativação do HIV-1 latente em células J-Lat 10.6 tratadas com inibidores de PKC e o extrato JGDM. Células J-Lat foram pré-tratadas com diferentes inibidores de PKC na concentração de 1 µM por 30 minutos (GÖ6976, GÖ6983 e RO-31-8220) antes da adição do extrato JGDM (40 µg/mL). A expressão de GFP foi avaliada 24 h após o tratamento com JGDM por citometria de fluxo. Ing-B (0,45 µg/mL) foi utilizado como controle positivo da reativação do HIV dependente de PKC. Os valores representados correspondem à média ± E.P.M de cinco experimentos.

Adicionalmente aos testes de reativação em células J-Lat 10.6 onde a inibição pelo extrato teve maior relevância, inibidores de diferentes isoformas da PKC foram inseridos aos ensaios na concentração de 1 μM para verificar a ação do JGDM frente à inibição desta via (Figura 5).

Os resultados mostram que o extrato JGDM, provavelmente age através da ativação das isoformas da PKC reguladas pelo inibidor GÖ6983, devido à diminuição na porcentagem de reativação apresentada pelo extrato nas células J-Lat 10.6 utilizando-se a concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$, chegando a reativar uma média de 7% (Figura 5). Resultados semelhantes foram apresentados pelo controle positivo utilizado (0,45 $\mu\text{g/mL}$ de Ing-B), podendo assim inferir que o composto presente no JGDM age através da mesma via que o Ing-B, levando a ativação do NF- κB , que posteriormente é translocado e ligado a locais na região estimulante da LTR do HIV, resultando na regulação positiva da expressão do provírus latente (Abreu et al., 2014). Podemos inferir que o composto bioativo no extrato JGDM possa ser da família de compostos dos diterpenos, como o composto ingenol.

Segundo estudo realizado, um composto chamado jatrophone, isolado das raízes de pinhão-roxo, já foi relatado apresentando atividade antitumoral (Kupchan et al., 1970), a qual pode ser modulada através da via de PKC (Hofmann, 2001). Isto indica que este ou outro composto com estrutura química semelhante pode ser o composto bioativo presente na partição diclorometano responsável pela atividade desempenhada pelo extrato.

Ensaio da downregulation de moléculas CD4

Com base nos resultados apresentados no ensaio antiviral, foi realizado o ensaio da *downregulation* de moléculas CD4, que avalia a capacidade do JGDM em diminuir a expressão de moléculas CD4 da superfície de células MT-4, a qual é a molécula responsável pela entrada do vírus nas células CD4, e assim identificar o possível mecanismo de ação envolvido na atividade antiviral. Os resultados obtidos com esse ensaio confirmaram que o extrato JGDM tem a capacidade de diminuir a expressão das moléculas CD4 em linhagem de células T humanas. Em comparação com o controle positivo Ing-B, podemos observar que o extrato conseguiu reduzir a expressão da molécula CD4 em 66,9% na concentração de 40.0 $\mu\text{g/mL}$ de JGDM (Figura 6).

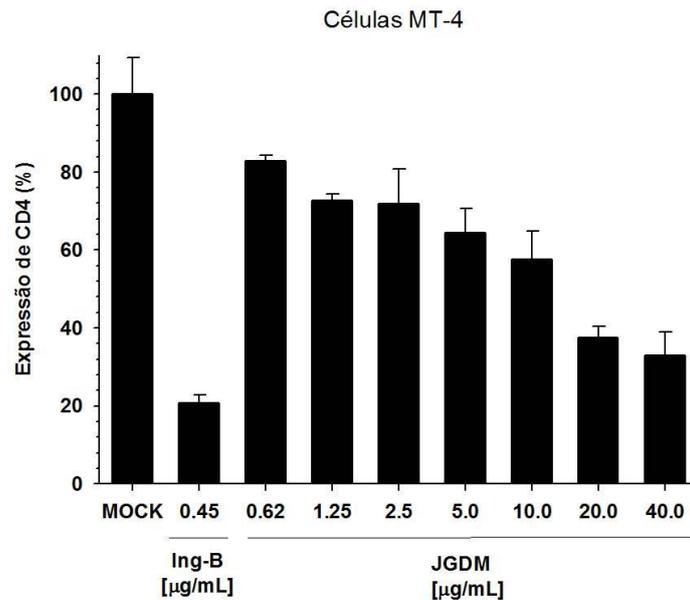


Figura 6. Potencial de *downregulation* de moléculas CD4 da superfície de células MT-4 pelo JGDM em diferentes concentrações. Células MT-4 foram estimuladas com diferentes concentrações de JGDM (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62 µg/mL) e Ing-B (0,45 µg/mL) por 24 horas. Posteriormente, foi adicionado um anticorpo anti-CD4 e a expressão do anticorpo ligado às moléculas CD4 da superfície celular foi avaliada por citometria de fluxo. Os valores representados correspondem à média \pm E.P.M de três experimentos.

Para verificar a possibilidade do extrato JGDM agir através nas isoformas de PKC, foram utilizados três inibidores diferentes das isoformas de PKC. Nossos resultados demonstram que a atividade de *downregulation* está atrelada a ativação e modulação das isoformas de PKC inibida pelos inibidores GÖ6983 e RO-31-8220 (Figura 7).

Em comparação ao ensaio da reativação podemos observar que a mesma via de ação utilizada pelo extrato para reativar o HIV latente também é utilizado pelo mesmo para regular a expressão de moléculas CD4 da superfície das células T, ressaltando que o composto JGDM pode ser utilizado para a estratégia utilizada para tratar pacientes com reservatórios de HIV latente, a estratégia “shock and kill”, que proporciona a reativação do vírus latente ao mesmo passo que inibi a infecção *de novo* do vírus ao regular a expressão de moléculas CD4 das células T, que são de fundamental importância para a ligação e entrada do vírus na célula (Mcdougal; Klatzmann; Maddon, 1991).

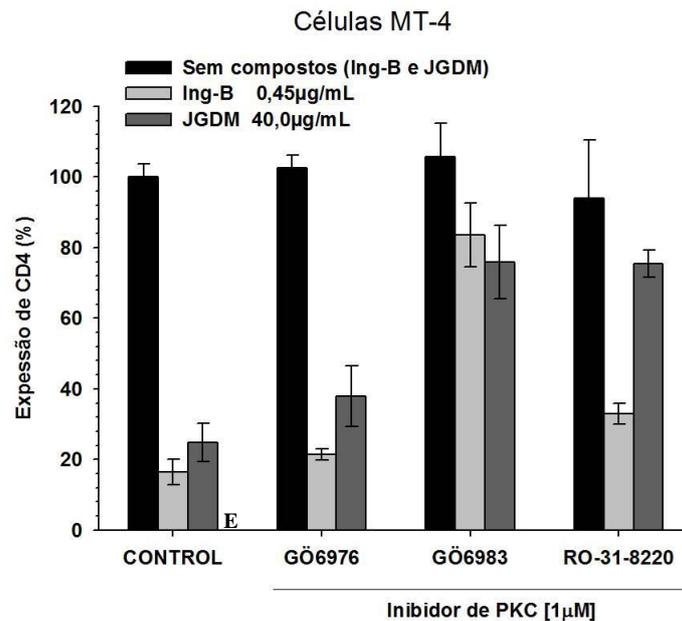


Figura 7. Potencial de *downregulation* de moléculas CD4 da superfície de células MT-4 pelo JGDM na presença dos inibidores da via de PKC. Células MT-4 foram pré-tratadas com diferentes inibidores de PKC na concentração de 1 µM por 30 minutos (GÖ6976, GÖ6983 e RO-31-8220) antes da adição do extrato JGDM (40 µg/mL) e Ing-B (0,45 µg/mL) por 24 horas. Posteriormente, foi adicionado um anticorpo anti-CD4 e a expressão do anticorpo ligado às moléculas CD4 da superfície celular foi avaliada por citometria de fluxo. Os valores representados correspondem à média ± E.P.M de três experimentos.

Estudos prévios têm demonstrado que a prostratina – um diterpenóide de origem natural – estimula uma diminuição dose-dependente, porém reversível, na expressão de CD4 em linhas celulares CEM-SS e MT-2 não infectadas. Essa *downregulation* também foi inibida pela estaurosporina, um inibidor de PKC, revelando a isoforma através do qual este composto age (Gulakowski et al., 1997).

Em outro estudo, realizado por Hezareh et al. (2004), a atividade da prostratina foi avaliada mais a fundo, concluindo que o composto exerce seu efeito através da ativação das isoformas clássicas e novas da PKC levando a *downregulation* de moléculas CD4 e CXCR4 em várias linhagens celulares, alcançada pela internalização através de endocitose mediada pelo receptor e/ou macropinocitose, que é seguida pela degradação dessas moléculas.

Como se sabe, as PKCs são uma família de 12 isoenzimas que podem ser subdivididas em três grupos com base na sua estrutura e requisitos de substrato. As PKCs convencionais (α , β I, β II, γ) as quais dependem do cálcio e são ativados por diacilglicerol (DAG) ou PMA; as novas PKCs (δ , ϵ , η , θ) as quais são independentes de cálcio, mas também são ativados por DAG e PMA; e as PKC atípicas (ζ , λ) as quais são independentes de cálcio e não respondem a DAG ou PMA (Dempsey et al., 2000).

Estudos mostram que o inibidor GÖ6976 é específico para PKCs convencionais dependentes de Ca^{2+} (PKC α e β) e não inibe as isoformas novas e atípicas, enquanto que o inibidor GÖ6983 inibe a isoforma atípica PKC ζ além das isoformas convencionais e novas (somente δ e θ) (Hezareh et al., 2004). RO-31-8220, por sua vez, tem a capacidade de inibir as isoformas PKC α , PKC β I, PKC β II, PKC γ e PKC ε (Harris; Persaud; Jones, 1996).

Em outro estudo realizado por Anastassiadis et al. (2011) para analisar a eficiência destes inibidores, verificou que o GÖ6983 tem entre 80%-100% de eficiência em inibir as isoformas clássicas e novas, sendo mais efetivo contra a PKC δ , a qual não é inibida pelo RO-31-8220, e menos efetivo (< 50%) contra a isoforma atípica PKC ζ .

Considerando que a isoforma atípica zeta não é dependente de ions de cálcio e DAG para sua ativação, Hezareh et al. (2004) verificou que forbóis esteris, como a prostratina não agem através dessa isoforma.

Com estes resultados podemos então inferir que o extrato JGDM age através do mesmo mecanismo realizado pela prostratina podendo, provavelmente, agir através das isoformas novas PKC δ , PKC θ e PKC ε , assim como o Ing-B, que apresentou resultados semelhantes ao extrato neste teste e em trabalho realizado por Abreu et al. (2014).

5.4 CONCLUSÃO

Com a realização deste trabalho foi possível analisar a atividade antiviral do extrato vegetal da espécie *J. gossypifolia* contra o HIV-1, concluindo-se portanto que o extrato testado tem potencial ao desenvolvimento de um novo fitoterápico contra o HIV-1, além deste ser o primeiro relato da atividade antiviral anti-HIV para esta espécie.

Também fica implícito que o extrato de pinhão-roxo pode realizar a reativação de HIV latente em diferentes células, porém com um potencial menor do que outros compostos capazes de reativar o provírus latente.

Estudos para separar e identificar o(s) composto(s) que possam estar desempenhando a atividade antiviral e de reativação do HIV devem ser realizados a fim de verificar a eficácia do composto bioativo purificado.

Além disso, podemos concluir que o extrato JGDM também apresenta atividade de modulação da proteína quinase C, provavelmente, através das isoformas novas da proteína, podendo assim desempenhar atividade de *downregulation* de moléculas CD4 e inibição da infecção *De Novo*.

Por fim, fica claro que as plantas medicinais ocorrentes na Amazônia podem conter novos compostos com atividades antivirais ainda não testadas, sendo necessário o investimento para que tal área seja um novo propulsor de pesquisa e inovação na Amazônia.

AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos o suporte dado pela agência brasileira que financiou esta pesquisa, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e também ao suporte técnico dado pelo Laboratório de Virologia Humana da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu, C. M. et al. Dual Role of Novel Ingenol Derivatives from *Euphorbia tirucalli* in HIV Replication: Inhibition of *De Novo* Infection and Activation of Viral LTR. *Plos One* 9, 1-14, 2014.

Abreu, I. C.; Marinho, A. S. S.; Paes, A. M. A. et al. Hypotensive and vasorelaxante effects of ethanolic extract from *Jatropha gossypifolia* L. in rats. *Fitoterapia*, 74, 650-657, 2003.

Anastassiadis, T. et al. Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity. *Nature Biotechnology*, 29, 1039-1045, 2011.

Aoki, C. et al. Isolation and identification of substances with anti-hepatitis C virus activities from *Kalanchoe pinnata*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6, 211-215, 2014.

Apu, A. S.; Ireen, K.; Bhuyan, S. H. et al. Evaluation of analgesic, neuropharmacological and anti-diarrheal potential of *Jatropha gossypifolia* (Linn.) leaves in mice. *Journal of Medicinal Sciences*, v.12, n.8, p. 274-279, 2012.

Archin, N. M.; Margolis, D. M. Emerging strategies to deplete the HIV reservoir. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 27, p. 29–35, 2014.

Autran, B. et al. Positive Effects of Combined Antiretroviral Therapy on CD4⁺ T Cell Homeostasis and Function in Advanced HIV Disease. *Science*, v. 277, n. 5322, p. 112-116, 1997.

Avila, L. et al. Effects of diterpenes from látex of *Euphorbia lactea* and *Euphorbia laurifolia* on human immunodeficiency virus type 1 reactivation. *Phytochemistry*, v. 71, n. 2-3, p. 243-248, 2010.

Barboric, M. et al. NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Molecular Cell*, v. 8, n. 2, p. 327–337, 2001.

Beans, E. J. et al. Highly potent, synthetically accessible prostratin analogs induce latent HIV expression *in vitro* and *ex vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, n. 29, p. 11698–11703, 2013.

- Bigoniya, P.; Shukla, A.; Singh, C. S. Dermal irritation and sensitization study of *Euphorbia neriifolia* latex and its anti-inflammatory efficacy. *International Journal of Phytomedicine*, v. 2, p. 240-254, 2010.
- Blanco-Molina, M. et al. Ingenol esters induce apoptosis in Jurkat cells through an AP-1 and NF- κ B independent pathway. *Chemistry and Biology*, v. 8, p. 767-778, 2001.
- Bocklandt, S.; Blumberg, P. M.; Hamer, D. H. Activation of latent HIV-1 expression by the potent anti-tumor promoter 12-deoxyphorbol 13-phenylacetate. *Antiviral Research*, v. 59, n. 2, p. 89-98, 2003.
- Bouchat, S. et al. Histone methyltransferase inhibitors induce HIV-1 recovery in resting CD4(+) T cells from HIV-1-infected HAART-treated patients. *AIDS*, v. 26, p. 1473-1482, 2012.
- Bourjot, M. et al. Prostratin and 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-Acetate Are Potent and Selective Inhibitors of Chikungunya Virus Replication. *Journal of Natural Products*, v. 75, n. 12, p. 2183-2187, 2012.
- Brady, M. T. et al. Declines in Mortality Rates and Changes in Causes of Death in HIV-1 Infected Children during the HAART Era. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, v. 53, n. 1, p. 86-94, 2010.
- Brogdon, J. et al. *In vitro* effects of the small-molecule protein kinase C agonists on HIV latency reactivation. *Scientific Reports*, v. 6, n. 39032, 2016.
- Chun, T. W. et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 94, n. 24, p. 13193-13197, 1997.
- Cilio, A. R. et al. Quantification of HIV-1 latency reversal in resting CD4⁺ T cells from patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 111, n. 19, p. 7078-7083, 2013.
- Deeks, S. G. HIV: shock and kill. *Nature*, v. 487, n. 7408, p. 439-440, 2012.
- Deleage, C. et al. Defining HIV and SIV Reservoirs in Lymphoid Tissues. *Pathogens and Immunity*, v. 1, n. 1, p. 68-106, 2016.
- Dempsey, E. C. et al. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 279, p. L429-L438, 2000.
- Falodun, A., Kragl, U., Touem, S.-M. T. et al. A novel anticancer diterpenoid from *Jatropha gossypifolia*. *Natural Product Communications*, v. 7, n. 2, p. 151-152, 2012.
- Félix-Silva, J. et al. *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae): A Review of Traditional Uses, Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology of This Medicinal Plant. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2014, n. 369204, 2014.

Fernandez, G.; Zeichner, S. L. Cell line-dependent variability in HIV activation employing DNMT inhibitors. *Virology Journal*, v. 7, p. 266, 2010.

Folgueira, L. et al. Protein Kinase C- ζ Mediates NF- κ B Activation in Human Immunodeficiency Virus-Infected Monocytes. *Journal of Virology*, v. 70, n. 1, p. 223-231, 1996.

Goel, G. et al. Phorbol Esters: Structure, Biological Activity, and Toxicity in Animals. *International Journal of Toxicology*, v. 26, n. 4, p. 279-288, 2007.

Gulakowski, R. J. et al. Antireplicative and anticytopathic activities of prostratin, a non-tumor-promoting phorbol ester, against human immunodeficiency virus (HIV). *Antiviral Research*, v. 33, p. 87-97, 1997.

Harris, T. E.; Persaud, S. J.; Jones, P. M. Atypical isoforms of pKc and insulin secretion from pancreatic beta-cells: evidence using Gö 6976 and Ro 31-8220 as Pkc inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 227, n. 3, p. 672-676, 1996.

Hezareh, M. et al. Mechanisms of HIV receptor and co-receptor down-regulation by prostratin: role of conventional and novel PKC isoforms. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, v. 15, p. 207-222, 2004.

Hofmann, J. Modulation of protein kinase C in antitumor treatment. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, v. 142, p. 1-96, 2001.

Jiang, G. et al. Synergistic Reactivation of Latent HIV Expression by Ingenol-3-Angelate, PEP005, Targeted NF- κ B Signaling in Combination with JQ1 Induced p-TEFb Activation. *Plos Pathogens*, v. 11, n. 7, p. e1005066, 2015.

Jordan, A.; Bisgrove, D.; Verdin, E. HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells *in vitro*. *EMBO Journal*, v. 22, n. 8, p. 1868-1877, 2003.

José, D. P., Bartholomeeusen, K., Cunha, R. D. et al. Reactivation of latent HIV-1 by new semi-synthetic ingenol ester. *Virology*, v. 462-463, p. 328-339, 2014.

Korin, Y. D. et al. Effects of Prostratin on T-Cell Activation and Human Immunodeficiency Virus Latency. *Journal of Virology*, v. 76, n. 16, p. 8118-8123, 2002.

Kupchan, S. M. et al. Jatrophone, a novel macrocyclic diterpenoid tumor inhibitor from *Jatropha gossypifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, v. 92, n. 14, p. 4476-4477, 1970.

Laird, G. M. et al. Ex vivo analysis identifies effective HIV-1 latency-reversing drug combinations. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 125, n. 5, p. 1901-1912, 2015.

Li, Y.; Mak, G.; Franza, B. R. *In vitro* study of functional involvement of Sp1, NF-kappa B/Rel, and AP1 in phorbol 12-myristate 13-acetate-mediated HIV-1 long terminal repeat activation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n. 48, p. 30616-30619, 1994.

Lu, Z. et al. Ingenane diterpenoids from *Euphorbia esula*. *Phytochemistry*, v. 69, p. 812-819, 2008.

Mccloskey, T. W. et al. Response to Superantigen Stimulation in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Children Perinatally Infected with Human Immunodeficiency Virus and Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 11, n. 5, p. 957-962, 2004.

Mcdougal, J. S.; Klatzmann, D. R.; Maddon, P. J. CD4-gp120 interactions. *Current Opinion in Immunology*, v. 3, n. 4, p. 552-558, 1991.

Mehla, R. et al. Bryostatin Modulates Latent HIV-1 Infection via PKC and AMPK Signaling but Inhibits Acute Infection in a Receptor Independent Manner. *Plos One*, v. 5, n. 6, p. 1-15, 2010.

Murray, A. J.; Kwon, K. J.; Farber, D. L. et al. The Latent Reservoir for HIV-1: How Immunologic Memory and Clonal Expansion Contribute to HIV-1 Persistence. *Journal of Immunology*, v. 15, n. 2, p. 407-417, 2016.

Nagaharika, Y.; Kalyani, S.; Rasheed, S. et al. Anti-inflammatory activity of leaves of *Jatropha gossypifolia* L. by HRBC membrane stabilization method. *Journal of Acute Disease*, v.2, n.2, p. 156-158, 2013.

Nothias-Scaglia, L. F. et al. Antiviral Activity of Diterpene Esters on Chikungunya Virus and HIV Replication. *Journal of Natural Products*, v. 78, n. 6, p. 1277-1283, 2015.

Novis, C. L. et al. Reactivation of latent HIV-1 in central memory CD4⁺T cells through TLR-1/2 stimulation. *Retrovirology*, v. 10, n. 119, 2013.

Oliveira, J. S.; Leite, P. M.; Souza, L. B. et al. Characteristics and composition of *Jatropha gossypifolia* and *Jatropha curcas* L. oils and application for biodiesel production. *Biomass and Bioenergy*, v. 33, n. 3, p. 449-453, 2009.

Perry, C. M.; Faulds, D. Lamivudine: a review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of HIV infection. *Drugs*, v. 53, p. 657-680, 1997.

Peterlin, B. M.; Trono, D. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nature Reviews Immunology*, v. 3, p. 97-107, 2003.

Pomerantz, R. J. Reservoirs of Human Immunodeficiency Virus Type 1: The Main Obstacles to Viral Eradication. *Clinical Infectious Diseases*, v. 34, n. 1, p. 91-97, 2002.

Purohit, M. C.; Purohit, R. Evaluation of antimicrobial and anti-inflammatory activities of bark of *Jatropha gossypifolia*. *World Journal of Science and Technology*, v.1, n.10, p. 1-5, 2011.

Rasmussen, T. A.; Tolstrup, M.; Sogaard, O. S. Reversal of Latency as Part of a Cure for HIV-1. *Trends in Microbiology*, v. 24, p. 90-97, 2016.

Saraiva, L. et al. Characterization of phorbol esters activity on individual mammalian protein kinase C isoforms, using the yeast phenotypic assay. *European Journal of Pharmacology*, v. 491, n. 2-3, p. 101-110, 2004.

Savarino, A. et al. "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*, v. 6, n. 52, 2009.

Singh, J. Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants. In: *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, Padrician, Italy, p.67-82, 2008.

Touraine, J. et al. Phorbol myristate acetate: a mitogen selective for a T-lymphocyte subpopulation. *Journal of Experimental Medicine*, v. 145, p. 460-465, 1977.

Van Praag, R. M. et al. OKT3 and IL-2 treatment for purging of the latent HIV-1 reservoir *in vivo* results in selective long-lasting CD4+ T cell depletion. *Journal of Clinical Immunology*, v. 21, p. 218-226, 2001.

Vigone, A. et al. Ingenol derivatives inhibits proliferation and induce apoptosis in breast cancer cell lines. *European Journal of Gynaecological Oncology*, v. 26, p. 526-530, 2005.

Wang, F. X. et al. IL-7 is a potente and proviral strain-specific inducer of latent HIV-1 cellular reservoirs of infected individuals on virally suppressive HAART. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 115, n. 1, p. 128-137, 2005.

Wang, H. et al. Estimates of global, regional, and national incidence, prevalence, and mortality of HIV, 1980-2015: the Global Burden of Disease Study 2015. *The lancet HIV*, v. 3, n. 8, p. 361-387, 2016.

Xu, H. et al. Persistent Simian Immunodeficiency Virus Infection Drives Differentiation, Aberrant Accumulation, and Latent Infection of Germinal Center Follicular T Helper Cells. *Journal of Virology*, v. 90, p. 1578-1587, 2015.

Zhang, X. P. et al. Chemical constituents of the plants from genus *Jatropha*. *Chemistry and Biodiversity*, v. 6, n. 12, p. 2166-2183, 2009.