



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DAIANE FERNANDA DOS SANTOS

**Triagem para a identificação de novos compostos com atividade
sobre linhagem celular infectada pelo HTLV-1**

Ribeirão Preto

2018

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

DAIANE FERNANDA DOS SANTOS

**Triagem para a identificação de novos compostos com atividade sobre
linhagem celular infectada pelo HTLV-1**

Ribeirão Preto

2018

DAIANE FERNANDA DOS SANTOS

**Triagem para a identificação de novos compostos com atividade sobre
linhagem celular infectada pelo HTLV-1**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica.

Orientadora: Dra. Simone Kashima Haddad
Coorientador: Dr. Lucio Holanda de Freitas Junior

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da publicação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Santos, Daiane Fernanda dos

Triagem para a identificação de novos compostos com atividade sobre linhagem celular infectada pelo HTLV-1. Ribeirão Preto, 2018.

96 p.: il.; 30 cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de Concentração: Diferenciação Celular e Neoplásica.

Orientadora: Kashima, Simone.

1. HTLV-1. 2. Triagem de drogas. 3. Proliferação celular. 4. Apoptose. 5. Tax.

Folha de Aprovação

SANTOS, Daiane Fernanda dos

Triagem para a identificação de novos compostos com atividade sobre linhagem celular infectada pelo HTLV-1.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular para a obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ . Instituição: _____

Julgamento: _____ . Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ . Instituição: _____

Julgamento: _____ . Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ . Instituição: _____

Julgamento: _____ . Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ . Instituição: _____

Julgamento: _____ . Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ . Instituição: _____

Julgamento: _____ . Assinatura: _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Trabalho desenvolvido nos Laboratórios de Biologia Molecular, Cultura de Células e Transferência Gênica da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biomédicas II (ICB-II) da Universidade de São Paulo (USP), e Laboratório de Epigenética Celular e Molecular da *Université de Liège* (Bélgica), com apoio financeiro das seguintes agências de fomento e instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos: 2015/11566-0 e 2016/17301-1;
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo: 462290/2014-0;
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP;
- Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

*Dedico esta tese aos meus pais Benedito e Sueli, à minha irmã
Débora e ao meu noivo Leonardo, pelo apoio, confiança e
compreensão em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus e a minha família: meus pais Benedito e Sueli e minha irmã Débora, que sempre contribuíram para a minha formação pessoal, e conseqüentemente, para a realização desse estudo.

Ao meu noivo, Leonardo, pelo apoio, confiança e incentivo em todos os momentos. Obrigada por estar sempre ao meu lado! Agradeço também os meus sogros, Humberto e Maria Inês, e cunhados, David, Gyl e Paty (*in memoriam*).

À minha orientadora Dra. Simone Kashima, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Biologia Molecular, pela confiança, incentivo e conhecimentos científicos adquiridos.

Ao coorientador Dr. Lucio Freitas Junior, pela confiança e oportunidade de desenvolver esse estudo.

À Denise Pilger, doutoranda da UNIFESP e colaboradora desse estudo. Obrigada pelas discussões de protocolos e resultados, e pelo auxílio na execução dos ensaios de triagem de compostos. Enfim, obrigada pela excelente contribuição nesse trabalho.

Também agradeço os alunos do Dr. Lucio: Beto, Caio, Giovana, Laura, Rafaela e Talita, e à Dra. Carolina Borsoi Moraes, pelo apoio durante os períodos que estive em São Paulo.

Ao Dr. Bruno Pascoalino pela atenção e auxílio no início do projeto.

Ao Prof. Dr. Jorge Casseb, coordenador do auxílio vinculado a esse projeto, pela confiança e oportunidade de trabalhar nesse estudo.

Ao Dr. Ricardo Khouri, pesquisador da Fiocruz Salvador, pelas discussões de protocolos e resultados, bem como pelas críticas e sugestões.

À Profa. Dra. Ivone Carvalho, docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pelo fornecimento da biblioteca de derivados 1,2,3-triazólicos empregada nesse estudo. Também quero agradecer a Dra. Susimair Mantoani e ao doutorando Paulo Nunes pela síntese e caracterização dos compostos dessa biblioteca. Enfim, agradeço todos pela atenção e disponibilidade nas reuniões.

Ao Prof. Dr. Luc Willems, pela oportunidade de executar uma das metas desse estudo no seu laboratório (doutorado sanduíche na *Université de Liège*, Bélgica), e aos seus alunos, em especial a Dra. Hélène Gazon. Agradeço também o Dr. Jean-

Claude Twizere e sua aluna Charlotte Vandermeulen pelo auxílio com os vetores lentivirais.

À equipe do Laboratório de Citometria de Fluxo, Patrícia Palma, Natalia Aydar e, em especial, à Camila Menezes, pelo auxílio na aquisição e análise dos experimentos envolvendo citometria de fluxo. Também agradeço a secretária Carmen Simão por todos os auxílios prestados. Obrigada todas pela atenção e amizade!

Ao Dr. Rodrigo Panepucci, à funcionária Dra. Josiane Schiavinato, Dr. Ildercílio Lima e Dr. Bruno Sangiorgi, pela atenção, disponibilidade e todo auxílio prestado na execução das técnicas envolvendo *High Content Screening*. Infelizmente não foi possível adotar essa abordagem nos ensaios de triagem de drogas, porém, todos se empenharam bastante nas padronizações.

À Dra. Bruna Rodrigues Muys, pela disponibilização do protocolo de ciclo celular, ao Prof. Dr. Yuetsu Tanaka por fornecer o anticorpo anti-Tax (clone LT-4), e ao Prof. Dr. Amílcar Tanuri pelo fornecimento da linhagem celular Huh-7.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular, pela convivência e auxílio, direto ou indireto, nesse estudo: Alexander, Felipe, Fernanda, Jonathan, Juliana, Katia, Lorena, Marta, Péricles, Rafaela, Rogério, Talitha, Vanessa e Yann. Quero agradecer também a Dra. Evandra Rodrigues e o Dr. Svestolav Slavov, pelas discussões, sugestões, momentos de descontração e amizade. Agradeço ainda o Dr. Maurício Rocha Junior, ex-integrante do laboratório, pela confiança e incentivo para execução desse estudo. E em especial, agradeço a Suellen Salustiano pelo apoio, companheirismo, momentos de descontração e amizade.

À Dra. Maristela Orellana e suas funcionárias, Sâmia e Taísa, pela disponibilização da sala de cultura celular, pela atenção, disposição e auxílios técnicos prestados.

Ao Laboratório de Transferência Gênica, em especial à Dra. Virgínia Castro, pelo auxílio e sugestões na confecção dos bancos das linhagens celulares.

Ao Laboratório de Cultura de Células, em especial à Profa. Dra. Kamilla Swiech e ao funcionário Mário Soares Neto, pela disponibilização do equipamento de fluorimetria, pela atenção e auxílios técnicos prestados. Também quero agradecer a Dra. Luciana Jarduli, pela amizade, incentivo e toda ajuda referente à FAPESP e à tese.

Às colegas que conviveram comigo durante meu estágio no exterior, Dra. Fernanda Amorim e Dra. Luciana Coitinho. Muito obrigada pelo apoio, atenção, por toda a ajuda prestada e pelos momentos de descontração.

À Secretaria de Pós-graduação, Vinícius Godoi e Rosane, e às ex-funcionárias, Adriana Fuzaro e Raquel Botelho, por todo o auxílio prestado e atenção. Agradeço também ao Coordenador do Programa de Pós-graduação, Prof. Dr. Rodrigo Calado.

À Dalvinha, sobretudo pela amizade, atenção, disponibilidade, e todo o auxílio prestado no transporte das linhagens desenvolvidas na Bélgica para o Brasil.

À Sandra Navarro Bresciani pela arte gráfica na realização das ilustrações da tese, manuscrito e pôsteres.

A todos os funcionários e amigos do Hemocentro de Ribeirão Preto, pela convivência, atenção e serviços prestados.

Ao Diretor-Presidente do Hemocentro de Ribeirão Preto, Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas, e à Coordenadora de Gestão, Dra. Elaine Faria de Sousa, pela oportunidade e viabilização da execução desse estudo na Instituição.

Às agências de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2015/11566-0 e 2016/17301-1, e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo: 462290/2014-0, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desse estudo.

*“Há apenas uma maneira de evitar críticas: não
faça nada, não diga nada e não seja nada.”*

Aristóteles

RESUMO

SANTOS, D. F. **Triagem para a identificação de novos compostos com atividade sobre linhagem celular infectada pelo HTLV-1**. 2018. 118f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O vírus linfotrófico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) é um retrovírus associado a duas manifestações clínicas principais: i) mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) e a ii) leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL). Devido à ausência de tratamentos específicos e efetivos, faz-se necessário o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento das doenças associadas ao HTLV-1. Nesse sentido, nosso objetivo foi realizar a triagem de compostos químicos para identificar indutores de apoptose e/ou bloqueadores da proliferação celular em linhagem celular infectada pelo HTLV-1 (MT-2), bem como drogas com efeito sobre a atividade de Tax viral. Inicialmente, foi estabelecido um ensaio baseado em células, o qual permitiu realizar a triagem de compostos pelo método de redução da resazurina. A partir de 26 derivados 1,2,3-triazólicos, oito compostos (*hits*) apresentaram atividade $\geq 70\%$ por reduzirem de forma significativa a atividade metabólica da MT-2. Tais *hits* foram selecionados para as etapas de validação. O composto **61** foi o único a induzir uma parada na fase S do ciclo celular, enquanto os compostos **48**, **49**, **65** e **66** induziram a apoptose da linhagem MT-2. Na avaliação do efeito dos compostos sobre a atividade da proteína viral Tax, uma linhagem repórter com a expressão induzida de Tax foi estabelecida. Verificamos que apenas os compostos **48** e **49** foram capazes de reduzir a expressão de GFP, e consequentemente, interferir na atividade de Tax. Uma biblioteca de 707 compostos do NIH também foi avaliada neste estudo. A partir da triagem primária, 34 compostos (*hits*) com atividade $\geq 50\%$ foram obtidos, enquanto na triagem secundária, apenas cinco *hits* foram confirmados. Entretanto, apenas dois destes foram selecionados para as futuras etapas de validação (dissulfiram e bromidrato de galantamina). Por fim, exceto os compostos **65** e **66**, os demais *hits* não interferiram na viabilidade da linhagem hepática Huh-7. Os resultados deste estudo mostraram que os compostos **48**, **49**, **61**, dissulfiram e bromidrato de galantamina deveriam ser explorados como novas abordagens terapêuticas das doenças associadas ao HTLV-1.

Palavras-chave: HTLV-1, triagem de drogas, proliferação celular, apoptose, Tax.

ABSTRACT

SANTOS, D. F. **Screening for identification of new compounds with activity on HTLV-1-infected cell line.** 2018. 118f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is a retrovirus associated with two main clinical manifestations: i) HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) and ii) adult T cell leukemia/lymphoma (ATL). Due to the lack of a specific and an effective therapy, the development of new drugs for treatment of HTLV-1 associated diseases is urgently required. Thus, our aim was to perform a drug screening for identification of apoptosis inducers and/or cell proliferation inhibitors in a HTLV-1-infected cell line (MT-2), as well as drugs with effect on activity of viral Tax. First, it was established a cell-based assay in order to perform a drug screening by resazurin reduction method. From 26 1,2,3-triazole derivatives, eight compounds (hits) presented $\geq 70\%$ of activity, since they significantly reduced the metabolic activity of MT-2. These hits were selected for the further validation steps. Compound **61** was the only one that induced an S phase cell cycle arrest, while compounds **48**, **49**, **65** and **66** promoted apoptosis of MT-2. In the evaluation of the effect of these compounds on activity of Tax viral protein, an inducible-tax reporter cell line was established. We verified that only compounds **48** and **49** were able to reduce GFP expression and, then, get involved on the Tax activity. A NIH library of 707 compounds was also assessed in this study. From a primary screening, 34 compounds (hits) with activity $\geq 50\%$ were obtained, while in secondary screening, five hits were confirmed, of which two of them were selected for future validation steps (disulfiram and galantamine hydrobromide). Finally, except for compounds **65** and **66**, other hits did not interfere in cellular viability of hepatic cell line, Huh-7. The results of this study showed that compounds **48**, **49**, **61**, disulfiram and galantamine hydrobromide should be explored as new therapeutic approaches of HTLV-1-associated diseases.

Keywords: HTLV-1, drug screening, cell proliferation, apoptosis, Tax.

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura da partícula viral (HTLV-1).....	3
Figura 2. Genoma proviral do HTLV-1.....	4
Figura 3. Desenvolvimento de ATL.....	8
Figura 4. Descoberta e desenvolvimento de drogas.....	11
Figura 5. Delineamento experimental.....	15
Figura 6. Biblioteca <i>NIH Clinical Collection</i> – NCC 108 (Evotec).....	26
Figura 7. Formatação da biblioteca <i>NIH Clinical Collection</i> – NCC 108 (Evotec) para placas-384 poços.....	27
Figura 8. Mapa das placas-384 poços dos ensaios de triagem primária dos compostos NIH.....	28
Figura 9. Morfologia das linhagens celulares em cultura.....	34
Figura 10. Análise de expressão de GFP na linhagem Jurkat LTR-GFP Tet3G controle após incubação com diferentes concentrações de DOX durante 48 h.....	38
Figura 11. Análise de expressão de GFP na linhagem Jurkat LTR-GFP Tet3G controle após incubação com diferentes concentrações de DOX durante 72 h.....	38
Figura 12. Análise de expressão de GFP na linhagem Jurkat LTR-GFP <i>inducible-tax</i> após incubação com diferentes concentrações de DOX durante 48 h.....	39
Figura 13. Análise de expressão de GFP na linhagem Jurkat LTR-GFP <i>inducible-tax</i> após incubação com diferentes concentrações de DOX durante 72 h.....	40
Figura 14. Expressão de Tax e GFP na linhagem Jurkat LTR-GFP <i>inducible-tax</i> após indução com 1 µg/mL de DOX por 72 h.....	41
Figura 15. Quantidade de células/poço na linhagem celular Jurkat.....	44
Figura 16. Quantidade de células/poço na linhagem celular MT-2.....	45
Figura 17. Quantidade de células/poço na linhagem celular MT-4.....	46
Figura 18. Quantidade de células/poço na linhagem celular C8166.....	47
Figura 19. Quantificação do número de células e viabilidade celular após 72 h de cultivo na presença de diferentes concentrações de DMSO.....	48
Figura 20. Determinação da concentração de etoposídeo (ETO).....	49
Figura 21. Atividade metabólica da linhagem MT-2 após tratamento com diferentes compostos de referência por 72 h.....	51
Figura 22. Curvas de dose-resposta (DRC) dos compostos ácido L-ascórbico (AA), IFN-α e zidovudina (AZT).....	52

Figura 23. Atividade metabólica da linhagem MT-2 após tratamento com diferentes derivados 1,2,3-triazólicos (compostos FCFRP) na concentração de 50 µM durante 72h	53
Figura 24. Curvas de dose-resposta (DRC) do composto de referência AZT na linhagem MT-2.....	54
Figura 25. Curvas de dose-resposta (DRC) dos compostos 48 (A), 49 (B), 50 (C), 61 (D), 65 (E), 66 (F), 74 (G) e 75 (H) na linhagem MT-2.....	55
Figura 26. Curvas de dose-resposta (DRC) do composto de referência AZT na linhagem MT-2.....	58
Figura 27. Análise de correlação dos valores de atividade normalizada dos controles (DMSO e ETO) entre os ensaios de triagem 01 e 02.....	59
Figura 28. Análise de correlação dos valores de atividade normalizada dos controles (DMSO e ETO) e compostos entre os ensaios de triagem 01 e 02.....	60
Figura 29. Curvas de dose-resposta (DRC) do composto de referência AZT na linhagem MT-2.....	61
Figura 30. Análise de correlação dos valores de atividade normalizada dos controles (DMSO e ETO) entre os ensaios de curva dose-resposta (DRC) 01 e 02.....	62
Figura 31. Análise de correlação dos valores de atividade normalizada dos controles (DMSO e ETO) e compostos entre os ensaios de curva dose-resposta (DRC) 01 e 02.....	62
Figura 32. Curvas de dose-resposta (DRC) dos compostos NIH dissulfiram (A), citarabina (B), clorambucil (C), cladribina (D) e bromidrato de galantamina (E) na linhagem MT-2.....	63
Figura 33. Taxa de obtenção de <i>hits</i> nas triagens primária e secundária.....	64
Figura 34. Efeito de diferentes derivados 1,2,3-triazólicos (compostos FCFRP) sobre o ciclo celular da linhagem MT-2.....	67
Figura 35. Análises representativas do ciclo celular da MT-2 por citometria de fluxo.....	68
Figura 36. Efeito de diferentes derivados 1,2,3-triazólicos (compostos FCFRP) sobre a apoptose da linhagem MT-2.....	69
Figura 37. Análise de ativação de caspase-3/7 na linhagem MT-2 após incubação com diferentes derivados 1,2,3-triazólicos (compostos FCFRP) por citometria de fluxo.....	70

Figura 38. Análise de marcação de anexina-V na linhagem MT-2 após incubação com diferentes derivados 1,2,3-triazólicos (compostos FCFRP) por citometria de fluxo.....	70
Figura 39. Efeito dos derivados 1,2,3-triazólicos (compostos FCFRP) selecionados sobre a expressão de GFP na linhagem Jurkat LTR-GFP <i>inducible-tax</i>	72
Figura 40. Análise representativa da redução da expressão de GFP na linhagem Jurkat LTR-GFP <i>inducible-tax</i> após incubação com os compostos 48 e 49	73
Figura 41. Curvas de dose-resposta (DRC) dos compostos 48 (A), 49 (B), 61 (C), 65 (D), 66 (E), dissulfiram (F) e bromidrato de galantamina (G) na linhagem MT-4.....	74
Figura 42. Curvas de dose-resposta (DRC) dos compostos 48 (A), 49 (B), 61 (C), 65 (D), 66 (E), dissulfiram (F) e bromidrato de galantamina (G) na linhagem C8166.....	75
Figura 43. Viabilidade da linhagem celular Jurkat após incubação com as diferentes concentrações dos compostos 48 (A), 49 (B), 61 (C), 65 (D), 66 (E), dissulfiram (F) e bromidrato de galantamina (G).....	76
Figura 44. Viabilidade da linhagem celular Huh-7 após incubação com as diferentes concentrações dos compostos 48 (A), 49 (B), 61 (C), 65 (D), 66 (E), dissulfiram (F) e bromidrato de galantamina (G).....	76

Lista de Tabelas

Tabela 1. Linhagens celulares obtidas para esse estudo.	17
Tabela 2. Imunofenótipo das linhagens celulares Jurkat, MT-2, MT-4 e C8166.	35
Tabela 3. Análise de expressão de GFP na linhagem Jurkat LTR-GFP Tet3G controle após incubação com diferentes concentrações de DOX durante 48 h.	36
Tabela 4. Análise de expressão de GFP na linhagem Jurkat LTR-GFP <i>inducible-tax</i> após incubação com diferentes concentrações de DOX durante 48 h.	37
Tabela 5. Análise de expressão de GFP na linhagem Jurkat LTR-GFP Tet3G controle após incubação com diferentes concentrações de DOX durante 48 e 72 h.	37
Tabela 6. Análise de expressão de GFP na linhagem Jurkat LTR-GFP <i>inducible-tax</i> após incubação com diferentes concentrações de DOX durante 48 e 72 h.	39
Tabela 7. Cálculo de coeficiente de variação (CV) e <i>Z-factor</i> na triagem de compostos FCFRP.	55
Tabela 8. Média e desvio-padrão do EC ₅₀ dos compostos 48, 49, 50, 61, 65, 66, 74 e 75	56
Tabela 9. Cálculo de coeficiente de variação (CV) e <i>Z-factor</i> na triagem de compostos NIH (ensaio 01).	57
Tabela 10. Cálculo de coeficiente de variação (CV) e <i>Z-factor</i> na triagem de compostos NIH (ensaio 02).	57
Tabela 11. Cálculo de coeficiente de variação (CV) e <i>Z-factor</i> na triagem por meio de ensaio de curva dose-resposta (DRC) dos compostos NIH.	60
Tabela 12. Média e desvio-padrão do EC ₅₀ dos compostos NIH (<i>hits</i>).	63
Tabela 13. Propriedades químicas e biológicas dos compostos NIH selecionados.	65

Lista de Abreviaturas e Siglas

- AA – Ácido L-ascórbico
- ADME – Absorção, distribuição, metabolismo, excreção
- ATL – Leucemia/Linfoma de células T do adulto
- ATRA – Ácido trans-retinóico
- AZT - Zidovudina
- CDK – Ciclina dependente de quinase
- CTL – Linfócito T CD8⁺ citotóxico
- CV – Coeficiente de variação
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DOX – Doxíciclina
- DP – Desvio-padrão
- DRC – Curva dose-resposta
- EC₅₀ – do inglês “*effective concentration of 50 %*”
- ETO - Etoposídeo
- FCFRP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
- FDA – do inglês “*Food and Drug Administration*”
- FSC – do inglês “*forward scatter channel*”, tamanho
- G-CSF – Fator estimulador de colônias granulocíticas
- GFP – Proteína fluorescente verde
- GLUT-1 – Transportador de glicose 1
- HAM/TSP – Mielopatia associada à infecção pelo HTLV-1/Paraparesia espástica tropical
- HTLV-1 – Vírus linfotrópico de células T humanas
- IFN- α – Interferon alfa
- IFN- β – Interferon beta
- IFN- γ – Interferon gama
- IL-2 – Interleucina 2
- IP – Iodeto de propídio
- LTR – do inglês “*long terminal repeats*”
- MOI – Multiplicidade de infecção
- NIH – do inglês “*National Institute of Health*”
- NRP-1 – Neurofilina 1

PBMC – Células mononucleares do sangue periférico

PBS – do inglês “*phosphate buffer saline*”

SFB – Soro fetal bovino

SNC – Sistema nervoso central

SSC – do inglês “*side scatter channel*”, complexidade interna

URF – Unidade relativa de fluorescência

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 ORIGEM E EPIDEMIOLOGIA DO VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS DO TIPO 1 (HTLV-1)	1
1.2 ESTRUTURA GENÔMICA E REPLICAÇÃO VIRAL	2
1.3 PROTEÍNA REGULADORA TAX	4
1.4 MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV-1/PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL (HAM/TSP)	5
1.5 LEUCEMIA/LINFOMA DE CÉLULAS T DO ADULTO (ATL)	6
1.6 TRATAMENTO DA HAM/TSP E ATL	8
1.7 DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE DROGAS	11
1.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	13
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	15
3.2 LINHAGENS CELULARES	17
3.2.1 <i>Cultivo celular</i>	17
3.2.2 <i>Morfologia</i>	18
3.2.3 <i>Imunofenotipagem por citometria de fluxo</i>	18
3.2.4 <i>Viabilidade celular</i>	18
3.2.5 <i>Estabelecimento de linhagem repórter: Jurkat LTR-GFP inducible-tax</i>	19
3.2.6 <i>Caracterização da linhagem repórter Jurkat LTR-GFP inducible-tax</i>	20
3.2.7 <i>Análise de expressão de GFP e Tax</i>	20
3.3 ESTABELECIMENTO DE ENSAIO BASEADO EM CÉLULA NO FORMATO DE PLACA-384 POÇOS	21
3.3.1 <i>Compostos de referência e controle</i>	21
3.3.2 <i>Definição de densidade celular</i>	22
3.3.3 <i>Definição de concentração de dimetilsulfóxido</i>	22
3.3.4 <i>Análise de atividade metabólica pelo método de resazurina</i>	23
3.3.5 <i>Definição de composto de referência/controle através de ensaio de curva dose-resposta (DRC)</i>	23
3.4 TRIAGEM DE COMPOSTOS	24
3.4.1 <i>Biblioteca de compostos</i>	24

3.4.2	<i>Triagem de compostos pelo método de resazurina</i>	24
3.4.3	<i>Análise dos dados</i>	29
3.5	VALIDAÇÃO DE COMPOSTOS SELECIONADOS	31
3.5.1	<i>Identificação de compostos inibidores de proliferação celular</i>	31
3.5.2	<i>Identificação de compostos indutores de apoptose</i>	31
3.5.3	<i>Identificação de inibidores de expressão de tax e/ou transativação viral</i>	32
3.5.4	<i>Teste com outras linhagens celulares</i>	33
4.	RESULTADOS	34
	PARTE I – CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS CELULARES	34
4.1	MORFOLOGIA	34
4.2	IMUNOFENÓTIPO DAS LINHAGENS CELULARES	34
4.3	VIABILIDADE CELULAR	35
4.4	CARACTERIZAÇÃO DA LINHAGEM REPÓRTER JURKAT LTR-GFP <i>INDUCIBLE-TAX</i>	36
4.5	ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE GFP E TAX	40
	PARTE II – ESTABELECIMENTO DE ENSAIO BASEADO EM CÉLULA NO FORMATO 384-POÇOS	43
4.6	DEFINIÇÃO DE DENSIDADE CELULAR	43
4.7	DEFINIÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE DIMETILSULFÓXIDO	48
4.8	ANÁLISE DE ATIVIDADE METABÓLICA PELO MÉTODO DE RESAZURINA	49
4.9	DEFINIÇÃO DE COMPOSTO DE REFERÊNCIA/CONTROLE ATRAVÉS DE ENSAIO DE CURVA DOSE-RESPOSTA (DRC)	50
	PARTE III – TRIAGEM DE COMPOSTOS	53
4.10	TRIAGEM DE COMPOSTOS PELO MÉTODO DE RESAZURINA	53
4.10.1	<i>Compostos FCFRP</i>	53
4.10.2	<i>Compostos NIH</i>	56
	PARTE IV – VALIDAÇÃO DA ATIVIDADE DE COMPOSTOS	66
4.11	VALIDAÇÃO DOS COMPOSTOS	66
4.11.1	<i>Identificação de compostos inibidores de proliferação celular</i>	66
4.11.2	<i>Identificação de compostos indutores de apoptose</i>	68
4.11.3	<i>Identificação de compostos inibidores de expressão de tax e/ou transativação viral</i>	71
4.11.4	<i>Atividade dos compostos em outras linhagens celulares</i>	74
5.	DISCUSSÃO	77
6.	CONCLUSÕES	88

7. REFERÊNCIAS.....	89
---------------------	----

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 30 anos, os avanços na descoberta de compostos para a terapia das doenças associadas ao vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) mostram-se vagarosos, insuficientes e limitados, tornando insatisfatório o tratamento e o prognóstico dos indivíduos acometidos por esta infecção. Portanto, a triagem de novos compostos é uma ferramenta muito importante no processo de identificação de novas drogas com ação terapêutica eficaz para esta retrovirose e doenças associadas.

1.1 Origem e epidemiologia do vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1)

A descoberta do vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) ocorreu em 1979, com o isolamento viral a partir de células cancerígenas de um paciente com linfoma cutâneo de células T (POIESZ et al., 1980), confirmando a hipótese da existência de retrovírus humanos e de seu papel etiológico no desenvolvimento do câncer (GALLO, 2005). Posteriormente, a infecção pelo HTLV-1 foi associada à mielopatia progressiva denominada paraparesia espástica tropical – TSP (GESSAIN et al., 1985; MORGAN et al., 1989), e em 1986, as manifestações neurológicas apresentadas por pacientes portadores da infecção por este retrovírus receberam a denominação de mielopatia associada à infecção pelo HTLV-1 – HAM (OSAME M, USUKU K, IZUMO S, IJICHI N, 1986). Subsequentemente, estas duas doenças foram classificadas como a mesma enfermidade, recebendo a denominação HAM/TSP.

Além do acometimento neurológico, os indivíduos portadores do HTLV-1 podem apresentar uma neoplasia agressiva que envolve células T, conhecida como leucemia/linfoma de células T do adulto – ATL (POIESZ et al., 1980). Outras manifestações clínicas de caráter inflamatório têm sido associadas à infecção pelo HTLV-1, tais como a dermatite infecciosa, uveíte, artropatia, dentre outras (FRANCHINI; NICOT; JOHNSON, 2003; HÖLLSBERG, 1999).

Cerca de 95 - 98% dos indivíduos acometidos por esta infecção permanecem assintomáticos durante toda a vida (KAUL et al., 2010; NAMEN-LOPES et al., 2009; ROMANELLI; CARAMELLI; PROIETTI, 2010; THE; BOMFORD, 1993) . Estima-se

que no mundo haja 10 - 20 milhões de pessoas infectadas pelo HTLV-1. As regiões endêmicas são o sudoeste do Japão, África Subsaariana, Oriente Médio, região da Melanésia, Austrália, o Caribe e a América do Sul (GESSAIN; CASSAR, 2012). O Brasil, segundo triagens sorológicas em doadores de sangue, detém cerca de 2,5 milhões de indivíduos infectados pelo HTLV-1, o que torna o país com o maior número absoluto de indivíduos acometidos por esta retrovirose (CATALAN-SOARES; CARNEIRO-PROIETTI; PROIETTI, 2005).

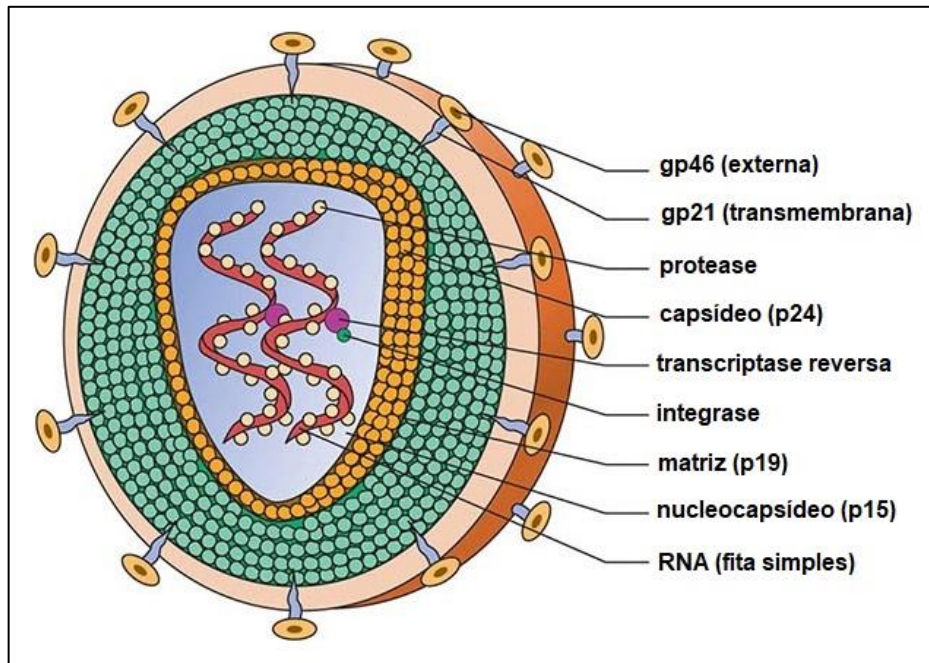
1.2 Estrutura genômica e replicação viral

O HTLV-1 é um retrovírus humano pertencente à Família *Retroviridae*, Subfamília *Orthoretrovirinae* e Gênero *Deltaretrovirus*. A partícula viral é esférica e possui um diâmetro de aproximadamente 100 nm. Além disso, o HTLV-1 é um vírus envelopado, ou seja, apresenta um envelope derivado da membrana das células hospedeiras (VERDONCK et al., 2007). O envelope viral é constituído pelas glicoproteínas gp46 (externa) e gp21 (transmembrana), as quais são importantes para a ligação com os receptores celulares e consequente internalização do vírus (PIÑON et al., 2003). O HTLV-1 é constituído também pela matriz, capsídeo e nucleocapsídeo, os quais são formados pelas proteínas estruturais p19, p24 e p15, respectivamente. No interior do nucleocapsídeo, estão presentes o genoma viral e as enzimas virais integrase, protease e transcriptase reversa (VERDONCK et al., 2007) (**Figura 1**).

O genoma do HTLV-1 é relativamente pequeno (cerca de 9 kb) e consiste em duas fitas simples de RNA, cuja polaridade é positiva. Tal genoma é típico de retrovírus (**Figura 2**), uma vez que possui regiões gênicas estrutural e reguladora flanqueadas por segmentos não codificadores denominados LTR (do inglês *long terminal repeats*). As sequências LTR são subdivididas em três regiões, U3, R e U5, as quais atuam como sítios para ligação de fatores de transcrição, bem como sítios de início e término de transcrição, poliadenilação e *splicing*. A região estrutural contém os genes *gag*, *pol* e *env*, que, por sua vez, codificam as proteínas estruturais, a transcriptase reversa e as proteínas do envelope, respectivamente. Enquanto a região reguladora denominada pX, localizada entre o gene *env* e o 3'LTR, codifica proteínas acessórias (p21, p12, p13 e p30) e reguladoras (Rex, Tax e HBZ) (BOXUS; WILLEMS, 2009; KANNIAN; GREEN, 2010). Dentre as proteínas reguladoras, Tax e HBZ apresentam um papel importante na persistência e patogênese viral, uma vez que elas

regulam a transcrição viral e a proliferação celular, além de outras funções (BOXUS; WILLEMS, 2009; CARPENTIER et al., 2015).

Figura 1. Estrutura da partícula viral (HTLV-1)

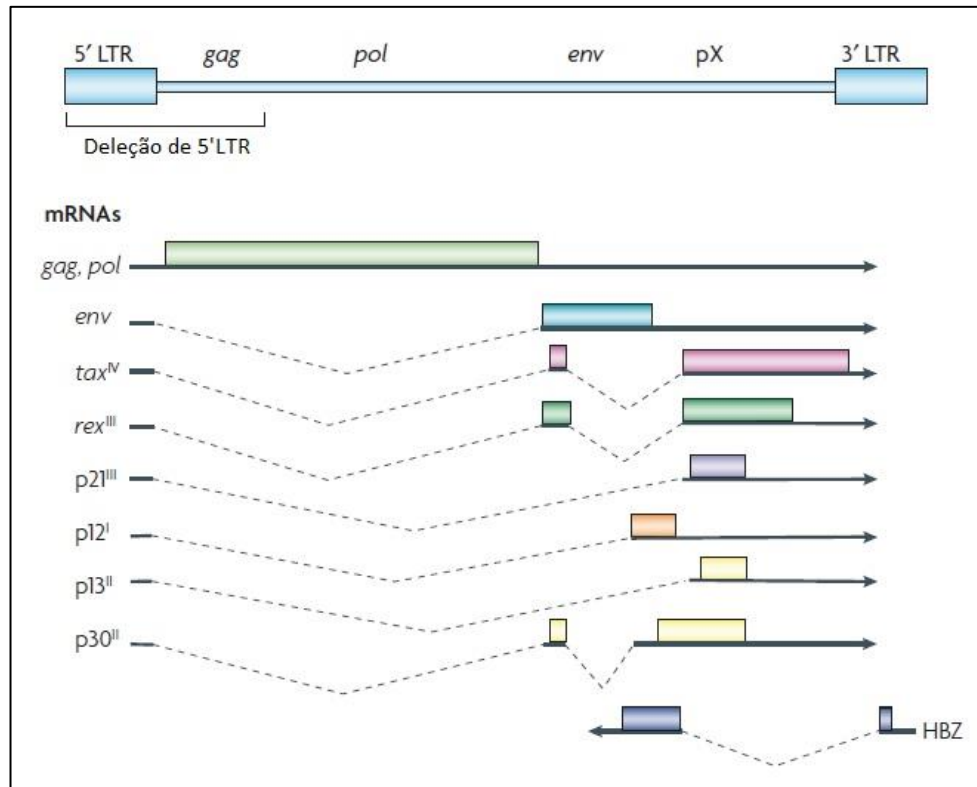


O HTLV-1 é constituído por um envelope derivado da membrana celular hospedeira, que por sua vez, contém as glicoproteínas gp46 e gp21. Além disso, é formado por uma matriz (p19), capsídeo (p24) e nucleocapsídeo (p15). No seu interior, estão presentes as enzimas integrase, protease e transcriptase reversa, e o RNA genômico. Imagem adaptada de: <https://clinicalgate.com/human-immunodeficiency-virus-disease-aids-and-related-disorders/> (Acesso em: 23/04/2018).

A transmissão do HTLV-1 pode ocorrer pelas vias parenteral, sexual e vertical, na qual o aleitamento materno é a forma mais comum. Independente da forma de transmissão, a presença de células infectadas pelo vírus é fundamental (MURPHY, 2016; PERCHER et al., 2016; PIQUE; JONES, 2012). Uma vez no organismo, o HTLV-1 pode ser reconhecido por alguns receptores celulares, tais como o transportador de glicose 1 (GLUT-1) (MANEL et al., 2003), neurofilina-1 (NRP-1) (GHEZ et al., 2006) e proteoglicanas de heparan sulfato (JONES et al., 2005). Em seguida, ocorre a entrada da partícula viral e a liberação do genoma viral no citosol. O RNA sofre transcrição reversa para formação do DNA, que, por sua vez, é integrado ao genoma da célula hospedeira na forma de DNA proviral. O DNA proviral é transcrito em RNA para

formação tanto do RNA genômico quanto do RNA mensageiro que codificará as proteínas virais (TAKENOUCI et al., 2007).

Figura 2. Genoma proviral do HTLV-1



Os genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*) e reguladores (região pX) estão flanqueados por segmentos não codificadores (LTR). Essa região pX é responsável pela codificação de proteínas acessórias (p21, p12, p13 e p30) e reguladoras (Tax, Rex e HBZ). A transcrição do gene HBZ, ao contrário dos demais genes, ocorre a partir do 3'LTR no modo *antisense*. Imagem adaptada de: (MATSUOKA; JEANG, 2007).

O HTLV-1 pode infectar vários tipos celulares *in vitro*, porém, *in vivo*, há um marcante tropismo por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Além disso, a disseminação viral é mais eficiente através do contato célula a célula (sinapse virológica) e da divisão das células infectadas (CARPENTIER et al., 2015; PIQUE; JONES, 2012).

1.3 Proteína reguladora Tax

Tax é uma proteína transativadora produzida pelo HTLV-1 e constituída por 353 aminoácidos (40 KDa) (CURRER et al., 2012). Sua expressão é essencial para a

replicação viral uma vez que a geração do RNA genômico e das proteínas Gag, Env e Pol é dependente de Tax. Para exercer essa atividade transativadora, Tax possui domínios em sua estrutura para interação com a região promotora LTR, o que culmina na ativação da transcrição viral (CHAN; KOK; JIN, 2017; TANAKA; MATSUOKA, 2018). Além disso, por ser imunogênica, Tax é o principal alvo antigênico reconhecido por linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs). No entanto, para escapar do reconhecimento pelos CTLs e consequente resposta imunológica efetora contra o vírus, a expressão de *tax* pode ser suprimida. Portanto, a expressão de *tax* é considerada transiente a fim de manter e expandir as células infectadas pelo HTLV-1, e com isso, contribuir para a disseminação viral, e ao mesmo tempo, para evasão do sistema imunológico (TANAKA; MATSUOKA, 2018).

Duas vias de sinalização celular importantes são ativadas pela proteína Tax durante a infecção pelo HTLV-1: NF- κ B e Akt. Tais vias são cruciais para a proliferação e sobrevivência das células infectadas (CURRER et al., 2012; MATSUOKA; JEANG, 2007; TANAKA; MATSUOKA, 2018). Tax também é capaz de inibir genes supressores de tumor, como por exemplo, o gene *p53*, o que contribui para a prevenção da morte celular programada (apoptose) (GAZON et al., 2018). Além disso, essa proteína viral inibe o reparo do dano ao DNA, e com isso, promove o acúmulo de mutações. Sendo assim, Tax exerce um papel importante na transformação celular e consequente desenvolvimento da ATL (CURRER et al., 2012).

Outro papel importante desempenhado pela Tax é o controle do ciclo celular. Essa proteína é capaz de interagir com componentes do ciclo celular, que por sua vez, resulta em descontrole da divisão celular. Portanto, Tax ativa a transcrição de proteínas que promovem a proliferação das células infectadas, tais como a ciclina D2 e as quinases dependentes de ciclina (CDK) 4 e 6 (CURRER et al., 2012; GAZON et al., 2018).

1.4 Mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP)

Embora a maioria das pessoas infectadas pelo HTLV-1 permaneça assintomática, após várias décadas, cerca de 0,25 – 3,8 % desenvolvem uma doença neuroinflamatória denominada mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) (BANGHAM et al., 2015a; YAMANO; SATO, 2012).

Na prática clínica, tem se observado que a HAM/TSP caracteriza-se como uma mielopatia crônica, de caráter inflamatório, sem remissão e com progressão variável entre os diferentes pacientes (ARAÚJO et al., 1995; GOTUZZO et al., 2004; KURODA; FUJIYAMA; NAGUMO, 1991; VERNANT et al., 1987). Suas características clínicas incluem distúrbios motores e sensoriais, tais como fraqueza nas pernas, distúrbio de marcha, dores nos membros inferiores, e disfunção autonômica, como, por exemplo, incontinência urinária e disfunção sexual (YAMANO; SATO, 2012).

Um dos fatores associados ao desenvolvimento da HAM/TSP é a alta carga proviral, entretanto, não é suficiente para o prognóstico da doença, o que indica a participação de outros fatores como a resposta imunológica individual e características genéticas do hospedeiro neste processo (CATALAN-SOARES et al., 2009; NAGAI et al., 1998; ROCHA-JÚNIOR et al., 2012; TALLEDO et al., 2010).

Estudos sugerem que o aumento no número de linfócitos T CD4⁺ infectados pelo HTLV-1, cujo fenótipo é caracterizado pela produção exacerbada da citocina inflamatória interferon-gama (IFN- γ), contribui para o desenvolvimento da HAM/TSP (YAMANO; SATO, 2012). Nesse sentido, os linfócitos T CD4⁺ infectados são capazes de migrar para o sistema nervoso central (SNC), uma vez que o HTLV-1, ao induzir um aumento de expressão de CD166 na superfície dos linfócitos, facilita sua passagem pela barreira hematoencefálica (CURIS et al., 2016). Os linfócitos T CD4⁺ infiltrados no SNC expressam antígenos virais, como Tax, e produzem citocinas inflamatórias que, por sua vez, ativam linfócitos T CD8⁺. Uma vez ativadas, tais células residentes produzem quimiocinas que atraem mais células inflamatórias para o local, contribuindo dessa forma, para a destruição do tecido nervoso (YAMANO; SATO, 2012).

1.5 Leucemia/Linfoma de células T do adulto (ATL)

A leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL) é uma doença linfoproliferativa agressiva que acomete aproximadamente 5 % dos indivíduos infectados após um longo período de latência (cerca de 50 anos). Essa neoplasia é caracterizada pela infiltração de células T CD4⁺ malignas nos linfonodos, baço, trato gastrointestinal e pele, além da presença de células T anormais com núcleo lobulado ou forma de flor (*flower cells*) no sangue periférico (BITTENCOURT et al., 2007; MATSUOKA, 2005; SHIMOYAMA, 1991; TAKASHI UCHIYAMA, JUNJI YODOI, KIMITAKA SAGAWA,

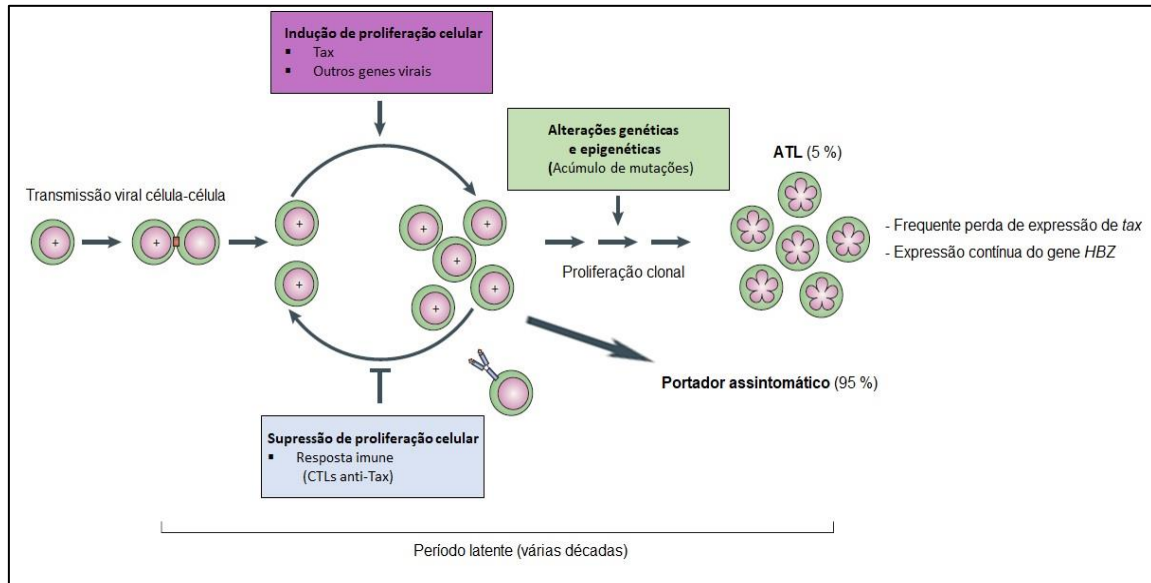
KIYOSHI TAKATSUKI, 1977). A diversidade das manifestações clínicas determinou a subdivisão da doença em quatro formas clínicas: aguda, crônica, indolente e linfomatosa (SHIMOYAMA, 1991). Além desses tipos clínicos, existe ainda outra categoria, conhecida como forma tumoral primária de pele, cujas manifestações são restritas à pele e apresenta um curso altamente agressivo (BITTENCOURT et al., 2007).

Dados apontam que cerca de um terço a um quarto dos linfomas de células T maduras estão associados à infecção pelo HTLV-1. Devido à semelhança dos sintomas com outras doenças linfoproliferativas como a leucemia linfóide crônica, síndrome de Sézary e outros linfomas, a ATL permanece subdiagnosticada em vários países no mundo, inclusive no Brasil (OLIVEIRA et al., 1995; SHIMOYAMA, 1991).

O longo período de latência para o desenvolvimento da ATL indica que o processo de oncogênese é lento. Em relação a esse processo de transformação maligna, sabe-se que a mutagênese por inserção é um mecanismo amplamente aceito para a oncogênese por retrovírus. Porém, na infecção pelo HTLV-1 tal mecanismo ainda necessita ser elucidado. Análises em portadores assintomáticos e pacientes ATL indicam que a integração do DNA proviral no genoma da célula hospedeira é não-randômica. Nesse sentido, a integração proviral pode ocasionar mutações, que por sua vez, podem culminar na ativação de proto-oncogenes, conferindo crescimento e sobrevivência das células mutadas. Tal ocorrência rara poderia explicar a pequena taxa de desenvolvimento de ATL (CHAN; KOK; JIN, 2017; MATSUOKA, 2005; MATSUOKA; JEANG, 2007).

As oncoproteínas Tax e HBZ também podem induzir alterações em reguladores epigenéticos e padrões de expressão de microRNA (CHAN; KOK; JIN, 2017). Além disso, as alterações genéticas podem conduzir à perda de expressão de Tax nas células de pacientes ATL, enquanto a expressão de HBZ permanece constante mesmo após o desenvolvimento dessa leucemia (**Figura 3**). Portanto, o acúmulo de mutações genéticas ao longo dos anos nas células infectadas e o escape da resposta imunológica devido à perda de expressão de Tax, contribuem para o desenvolvimento da ATL (MATSUOKA, 2005; MATSUOKA; JEANG, 2007; TANAKA; MATSUOKA, 2018).

Figura 3. Desenvolvimento de ATL



A transmissão do HTLV-1 depende do contato célula-célula. Uma vez estabelecida a infecção viral, genes virais como *tax* são responsáveis por induzir a proliferação das células infectadas, enquanto a supressão é decorrente da ação de CTLs específicos para Tax. Após um longo período de latência, o acúmulo de mutações genéticas e o escape imune podem culminar na ATL. Imagem adaptada de: (MATSUOKA; JEANG, 2007).

1.6 Tratamento da HAM/TSP e ATL

Apesar dos amplos estudos sobre a patogênese da HAM/TSP culminarem na identificação de biomarcadores e alvos terapêuticos, até o momento, não há um tratamento específico e efetivo para a HAM/TSP. Uma série de estratégias terapêuticas vem sendo avaliada, podendo ser dividida em duas abordagens: terapia imunomoduladora e terapia antiviral (BANGHAM et al., 2015b; NAKAMURA, 2009). A terapia imunomoduladora tem como alvo o bloqueio da ativação da resposta imunológica, principalmente da ativação das células infectadas pelo HTLV-1, a inibição da migração das células infectadas para o SNC, bem como a diminuição da inflamação crônica no tecido nervoso. Por outro lado, a terapia antiviral visa a supressão da expressão e/ou replicação do HTLV-1, inibição da proliferação das células infectadas pelo HTLV-1, e eliminação dos clones infectados (NAKAMURA, 2009).

Na prática clínica, as drogas imunomoduladoras mais prescritas são os corticosteroides, cuja eficácia terapêutica é variável. Além disso, o uso contínuo em

altas doses dos corticosteroides, tais como a prednisolona, é limitado devido aos efeitos colaterais (YAMANO; SATO, 2012). Na busca de terapias alternativas, Britta e cols. (2012), demonstraram em experimentos *ex vivo* e *in vitro* que o tratamento com altas doses de ácido L-ascórbico (AA) foi capaz de induzir a apoptose em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de indivíduos e linhagens celulares infectadas pelo HTLV-1. Além disso, foram observados efeitos anti-proliferativos e imunomoduladores nestas células (MOENS et al., 2012a). Outros estudos avaliaram o efeito da administração de pentoxifilina, um derivado da xantina (SHIRABE et al., 1997) e danazol (HARRINGTON et al., 1991) nos pacientes com HAM/TSP. Embora ambas as drogas exibissem uma melhora nas funções motora e neurológica, tais terapias não evidenciaram resultados robustos para sua recomendação clínica.

Outras estratégias terapêuticas com foco em efeitos antivirais são descritas, como a utilização de interferons alfa (IFN- α) e beta (IFN- β), inibidores de transcriptase reversa, inibidores da enzima histona deacetilase (ácido valpróico), anticorpos anti-receptor de IL-2 (anti-Tac, daclizumab) e prosultiamina (BANGHAM et al., 2015b; NAKAMURA, 2009). Um ensaio clínico multicêntrico e randomizado descreveu um efeito terapêutico positivo nos pacientes HAM/TSP tratados com IFN- α (IZUMO et al., 1996). Outro estudo demonstrou que a terapia com IFN- α contribuiu para um aumento no número de linfócitos T CD8⁺ de memória e uma redução na carga proviral dos pacientes HAM/TSP (SAITO et al., 2004). No entanto, assim como os corticosteroides, a terapia com IFN- α apresenta uma série de efeitos adversos.

Apesar de não apresentarem efeitos colaterais inesperados, os inibidores de transcriptase reversa zidovudina (AZT) e lamivudina não provocaram uma redução da carga proviral nos pacientes com HAM/TSP durante um estudo randomizado (TAYLOR et al., 2006). Isso sugere que a carga proviral nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 é mantida pela proliferação das células infectadas e não pela replicação viral. Portanto, o alvo da terapia na HAM/TSP deveria ser as células infectadas (YAMANO; SATO, 2012). Diante disso, foi relatado que a administração de anticorpos humanizados anti-receptor de IL-2 (anti-Tac) em pacientes HAM/TSP pode induzir a apoptose das células infectadas, uma vez que tais células dependem de IL-2 para proliferarem (LEHKY et al., 1998).

O uso de ácido valpróico, um inibidor da histona deacetilase, também foi testado no tratamento da HAM/TSP. A inibição dessa enzima culmina na hiperacetilação da histona e, conseqüentemente, na indução da expressão de genes

virais que tornam as células infectadas expostas à ação do sistema imunológico. Com isso, os pacientes tratados com ácido valpróico exibiram redução na carga proviral (LEZIN et al., 2007). Outra abordagem terapêutica é a utilização de prosultiamina (análogo da vitamina B1) pelos pacientes HAM/TSP. Um estudo clínico mostrou que ao induzir a apoptose das células infectadas pelo HTLV-1, a prosultiamina foi capaz de reduzir a carga proviral e melhorar as disfunções motora e urinária dos pacientes HAM/TSP (NAKAMURA et al., 2013).

Em relação à ATL, o prognóstico dos pacientes continua insatisfatório. Estudos demonstram que tratamentos convencionais para pacientes apresentando as formas aguda ou crônica, incluindo quimioterapia convencional e infusão intravenosa de anticorpos anti-Tac não renderam remissões duráveis e completas nesses indivíduos, além da resistência à terapia (MARÇAIS et al., 2013; TSUKASAKI; TOBINAI, 2014). No entanto, desde 1995, estudos promissores combinando AZT com IFN- α atingiram a remissão parcial ou completa da ATL (KCHOUR et al., 2009; TAYLOR; MATSUOKA, 2005). Além disso, o transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas, precedido de intensa quimioterapia com fator estimulador de colônias granulocíticas (G-CSF), tem mostrado grande potencial de cura (OKAMURA et al., 2005). Ainda, outras terapias são descritas, como a combinação de AZT e IFN- α , trióxido de arsênio e IFN- α e uso de ácido trans retinóico (ATRA) (NICOT, 2005). Entretanto, devido à ausência de estudos randomizados e controlados, não há nenhuma evidência clara para sustentar a efetividade de qualquer tipo de tratamento em detrimento de outro.

Uma nova estratégia que vem sendo avaliada é o emprego do anticorpo monoclonal anti-CCR4 (mogamulizumab) no tratamento dos casos de recidiva da ATL, na qual as células são positivas para CCR4 (ISHIDA et al., 2012). Embora haja uma tolerância aceitável nos pacientes, o risco de efeitos severos ou fatais decorrentes do tratamento com mogamulizumab deve ser considerado (ISHITSUKA et al., 2017). Além disso, o alto custo dessas novas terapias representa um desafio para os países em desenvolvimento que já sofrem com inúmeras doenças endêmicas.

Portanto, várias abordagens terapêuticas vêm sendo avaliadas no tratamento das doenças associadas ao HTLV-1. Contudo, tais estratégias não mostram eficácia clínica robusta, fazendo necessária a investigação de outros compostos com atividade sobre as células infectadas pelo HTLV-1.

1.7 Descoberta e desenvolvimento de drogas

A descoberta e desenvolvimento de novas drogas é um processo longo, cujo tempo médio é aproximadamente 10 – 15 anos, além de apresentar um alto custo. Para tornar esse processo mais eficiente e robusto, as abordagens são realizadas em vários níveis: 1) triagem de compostos para identificação de *hits* (compostos ativos); 2) confirmação de *hits* para identificação de *leads* (candidato à fármaco); 3) otimização de *leads* (modificações no composto e análise de ADME – absorção, distribuição, metabolismo e excreção); 4) ensaios pré-clínicos em modelos animais; 5) ensaios clínicos; e 6) aprovação da droga por agências reguladoras (**Figura 4**) (EVERTS et al., 2017).

Figura 4. Descoberta e desenvolvimento de drogas



Uma série de etapas são necessárias para a obtenção de uma nova droga e sua aprovação por agências reguladoras para liberação no mercado (EVERTS et al., 2017).

Duas abordagens podem ser adotadas para a etapa inicial de triagem de drogas. Uma delas envolve a triagem de compostos frente a um alvo específico (triagem baseada em alvo ou do inglês *target-based screening*), enquanto outro tipo de triagem visa a identificação de compostos químicos com efeitos biológicos desejáveis (fenótipo) sobre células ou organismos (triagem fenotípica ou do inglês *phenotypic screening*) (EVERTS et al., 2017; MOFFAT; RUDOLPH; BAILEY, 2014). Além disso, a triagem fenotípica pode ser considerada a mais vantajosa por permitir a identificação de compostos com maior probabilidade de possuir eficácia clínica (MOFFAT; RUDOLPH; BAILEY, 2014).

Um dos métodos que está sendo amplamente empregado na triagem de drogas para a descoberta e desenvolvimento de compostos com eficácia terapêutica é o ensaio baseado em célula (do inglês *cell-based assay*). Esses ensaios *in vitro* incluem principalmente ensaios de viabilidade e proliferação celular, e gene repórter (ADAN; BARAN, 2016; ASSAYS et al., 2016; KEPP et al., 2011; MICHELINI et al., 2010; ZANG et al., 2012). Em relação aos testes de viabilidade e proliferação celular, alguns estudos têm adotado ensaios baseados no método de redução da resazurina, uma vez que tal método é considerado simples, rápido e com baixo custo (CRUZ et al., 2013a; LIM et al., 2016).

Nesse contexto, na busca de novas terapias para as doenças virais, diversos autores têm realizado a triagem em larga escala de compostos com potencial ação terapêutica (CRUZ et al., 2013a, 2013b). Em 2013, Cruz e cols. identificaram novos agentes terapêuticos inibidores da infecção pelo vírus da dengue, bem como compostos exibindo potente ação antiviral contra os quatro genótipos deste vírus (CRUZ et al., 2013b). Ainda, em outro trabalho do mesmo grupo, foram identificados compostos farmacológicos ativos capazes de inibir o vírus Chikungunya *in vitro* (CRUZ et al., 2013a). Na busca por novos inibidores da transcriptase reversa, um estudo realizou uma triagem com 26.500 compostos utilizando cepas selvagens e multidroga resistentes do HIV-1, dos quais foi possível identificar um composto com atividade antirretroviral (KIM et al., 2013).

Assim, diante da ineficiência das drogas existentes para o tratamento das doenças associadas ao HTLV-1 e ausência de ensaios para triagem de novos compostos farmacológicos, faz-se necessária a triagem de compostos para a identificação de novos candidatos com ação antiviral na infecção pelo HTLV-1.

1.8 Considerações finais

Ao contrário dos inúmeros avanços ocorridos no tratamento de pacientes infectados pelo HIV-1, os pacientes portadores do HTLV-1 dispõem de um número restrito de drogas inespecíficas para tratar a infecção e as suas formas clínicas. Além disso, corticosteroides e IFN- α apresentam eficácia variável e muitos efeitos colaterais, o que dificulta a administração de altas doses por períodos prolongados. A terapia com inibidores de transcriptase reversa também é controversa, uma vez que a carga proviral não sofre alteração nos pacientes tratados. Por outro lado, na ATL há a resistência ao tratamento quimioterápico convencional e o transplante de células-tronco hematopoiéticas é indicado apenas em alguns casos.

À exceção da introdução do uso de ácido valpróico (inibidor de histona deacetilase, HDCA), prosultiamina e mogamulizumab (anti-CCR4), não há novos compostos disponíveis para o tratamento de HAM/TSP e ATL em fase de teste. Desta forma, é muito importante intensificar as pesquisas e a descoberta de novos compostos para o tratamento de pacientes portadores de HTLV-1.

Portanto, neste estudo, a partir da triagem de duas bibliotecas de compostos, planejou-se encontrar novos candidatos promissores com atividade antiviral sobre a linhagem celular infectada pelo HTLV-1, MT-2. Além disso, a estratégia desenvolvida poderá servir de modelo para a triagem de outros compostos.

2. OBJETIVOS

Realizar uma triagem para a identificação de novos compostos com atividade sobre linhagem celular infectada pelo HTLV-1. Para isso, as seguintes metas específicas foram estabelecidas:

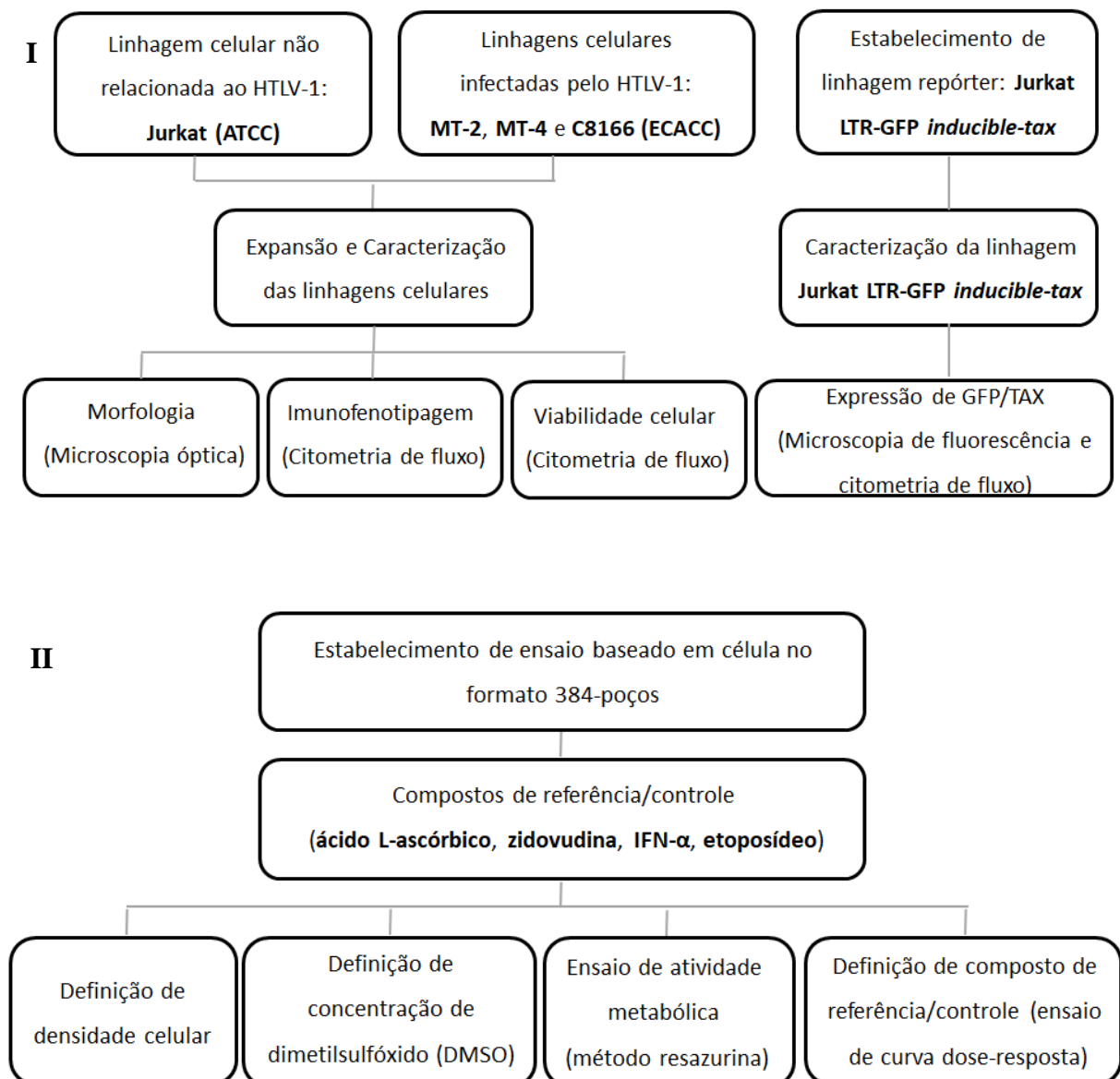
1. Caracterizar as linhagens celulares Jurkat (não infectada pelo HTLV-1) e infectadas por HTLV-1 (MT-2, MT-4 e C8166) quanto à morfologia, viabilidade e fenótipo;
2. Construir uma linhagem celular repórter (Jurkat LTR-GFP *inducible-tax*) que expresse a proteína verde fluorescente (GFP) em fusão com a região viral LTR após indução de *tax* para uso nos ensaios de inibição ou diminuição da atividade de Tax viral;
3. Realizar uma triagem primária pelo método de resazurina para a identificação de compostos que interferem no crescimento da linhagem MT-2;
4. Determinação do EC_{50} (*effective concentration of 50%*) dos compostos ativos;
5. Validação dos compostos selecionados na triagem por meio da identificação de inibidores da proliferação celular na linhagem MT-2;
6. Validação dos compostos selecionados na triagem por meio da identificação de indutores de apoptose na linhagem MT-2;
7. Identificar os compostos envolvidos no bloqueio ou diminuição da atividade de Tax viral (Jurkat LTR-GFP *inducible-tax*) através da expressão de GFP avaliada por citometria de fluxo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

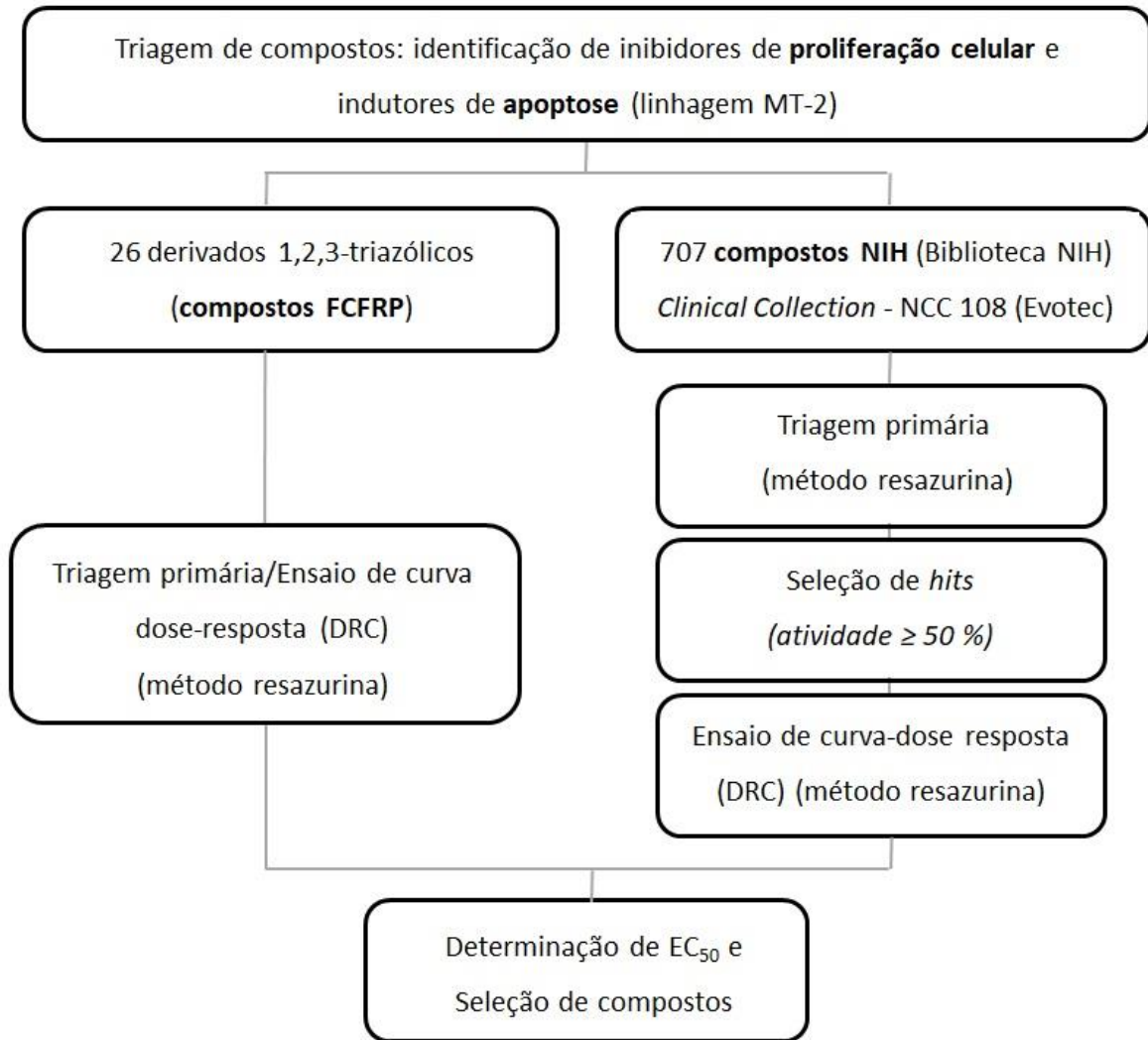
3.1 Delineamento experimental

A estratégia experimental adotada nesse estudo foi dividida em quatro partes e está representada pelos fluxogramas abaixo (**Figura 5**).

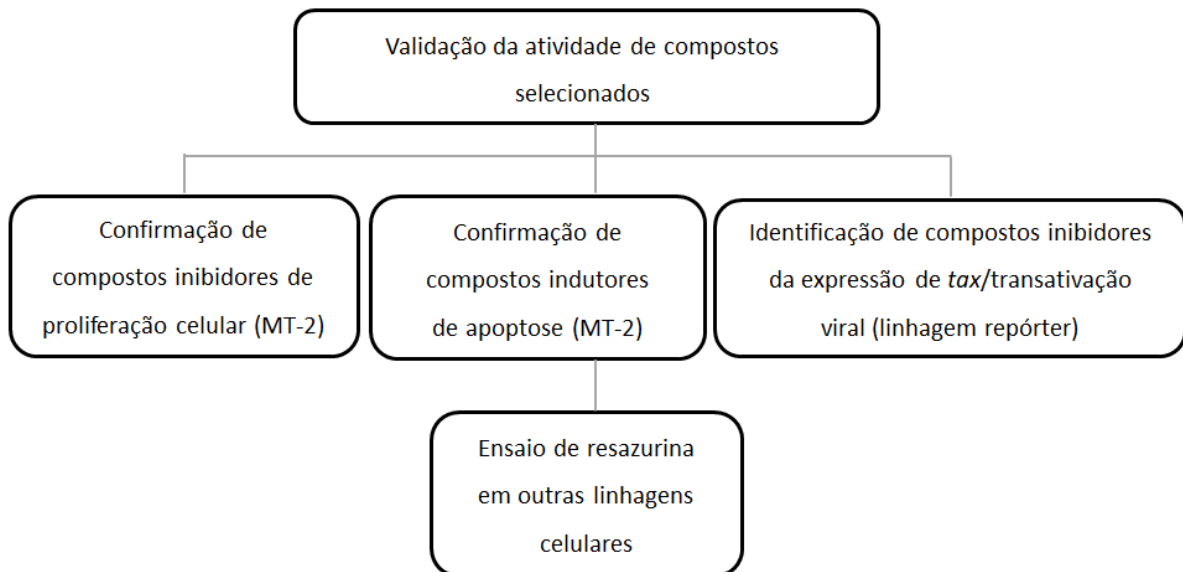
Figura 05. Delineamento experimental



III



IV



Esse estudo foi dividido em quatro estratégias experimentais, as quais estão representadas nos fluxogramas I, II, III e IV. Fonte: elaborado pelo autor (2018).

3.2 Linhagens celulares

3.2.1 Cultivo celular

As linhagens celulares MT-2 (número de catálogo 88051601, ECACC), MT-4 (número de catálogo 08081402, ECACC), C8166 (número de catálogo 88051601, ECACC) e Jurkat (Clone E6-1, número de catálogo ATCC® TIB-152™) (**Tabela 1**) foram cultivadas em garrafas de 25 cm² (Greiner Bio-One) contendo 05 mL de meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com soro fetal bovino (SFB) inativado a 10 % (Hyclone). As culturas foram mantidas em incubadoras Forma Steri-Cult 200 (Thermo Scientific) à temperatura de 37° C, 5 % CO₂ e 85 % de umidade relativa do ar.

Para a realização desse estudo, as linhagens celulares foram expandidas, congeladas em solução de SFB com 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) e armazenadas em criotubos a - 120° C. Em paralelo, os sobrenadantes de cultura das linhagens celulares foram submetidos ao teste periódico para detecção de *Mycoplasma* spp. através do kit *MycoAlert™ Mycoplasma Detection* (Lonza).

Tabela 1. Linhagens celulares obtidas para esse estudo.

	MT-2	MT-4	C8166	Jurkat
<i>Espécie</i>	Humana	Humana	Humana	Humana
<i>Tipo celular</i>	Linfoblasto	Linfoblasto	Linfoblasto	Linfócito T
<i>Características em cultura</i>	Crescimento em suspensão	Crescimento em suspensão	Crescimento em suspensão	Crescimento em suspensão
<i>Origem/Obtenção</i>	Co-cultivo de leucócitos obtidos de paciente com ATL e linfócitos de cordão umbilical	Co-cultivo de leucócitos obtidos de paciente com ATL e linfócitos de cordão umbilical	Fusão de células do sangue de cordão umbilical com células produtoras de HTLV-1	Leucemia aguda de células T

3.2.2 Morfologia

A morfologia das células em cultura foi observada em microscópio invertido (Olympus). Em seguida, determinados campos foram selecionados e imagens foram registradas por meio do *software DP Controller* (Olympus).

3.2.3 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

As linhagens celulares (MT-2, MT-4, C8166 e Jurkat), foram avaliadas quanto à expressão de alguns marcadores de superfície celular através da técnica de citometria de fluxo. Primeiramente, a suspensão de células foi distribuída em tubos de poliestireno 12 x 75 mm devidamente identificados. Em seguida, as células (cerca de 1×10^5 por tubo) foram incubadas com 5 μ L de cada anticorpo monoclonal específico conjugado com fluorocromo (BD Biosciences) durante 15 minutos, à temperatura ambiente e no escuro. Após esse período, a suspensão celular foi lavada com solução de PBS 1X (do inglês *phosphate buffer saline*) e ressuspendida com 200 μ L dessa mesma solução.

Para a imunofenotipagem, os seguintes anticorpos monoclonais murinos com especificidade humana foram utilizados: IgG1 FITC, IgG1 PE, IgG1 PerCP e IgG1 APC, como isotipos controles; anti-CD3 FITC, anti-CD7 PE, anti-CD16,56 PE, anti-CD19 APC, anti-CD20 FITC, anti-CD4 PerCP, anti-CD8 APC, anti-CD25 FITC, e anti-CD69 PE. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (BD Biosciences) por meio do *software BD CellQuest™ Pro* (BD Biosciences). Para os experimentos de imunofenotipagem, 10.000 eventos foram adquiridos e analisados através do mesmo *software*. A partir do *dot plot forward scatter channel* (FSC, tamanho) versus *side scatter channel* (SSC, complexidade interna), foi feito um *gate* para analisar a população de eventos de interesse. Assim, foram gerados histogramas com a porcentagem de expressão celular para cada marcador de superfície.

3.2.4 Viabilidade celular

A viabilidade das linhagens celulares foi avaliada por citometria de fluxo a partir do corante iodeto de propídio (IP). Para tanto, 50 μ L de solução de IP foram adicionados à suspensão celular. Em seguida, as amostras foram adquiridas em

citômetro de fluxo (BD FACSCalibur™). Um total de 10.000 eventos foi adquirido e analisado quanto à incorporação desse corante, ou seja, as células viáveis com integridade de membrana não foram capazes de incorporar o IP no seu DNA.

3.2.5 Estabelecimento de linhagem repórter: Jurkat LTR-GFP inducible-tax

A linhagem celular repórter Jurkat LTR-GFP foi gerada de acordo com o artigo de Alais, S. e cols. (ALAIS; MAHIEUX; DUTARTRE, 2015) e cedida gentilmente pelo Dr. Luc Willems e Dr. Renaud Mahieux. A expressão de GFP nessa célula está sob controle do promotor LTR do HTLV-1. Nesse sentido, a linhagem Jurkat LTR-GFP foi utilizada para o desenvolvimento de uma linhagem repórter contendo gene *tax* cuja expressão é controlada por doxícilina (DOX). Tal etapa do projeto foi realizada durante estágio no exterior (BEPE) pela Universidade de Liège, Bélgica.

Primeiramente, o gene viral *tax* foi clonado no vetor *pLenti-CMVtight-Blast-DEST* (w762-1) (Addgene, 26434) através do sistema de clonagem *Gateway*. Os vetores lentivirais foram produzidos pela Plataforma de Vetores Virais da Universidade de Liège (*GIGA Viral Vectors*), sendo que a geração da linhagem Jurkat LTR-GFP *inducible-tax* foi baseada no sistema de expressão gênica controlada - *Tet-On® Clontech*. Sua produção foi realizada a partir da transfecção da linhagem celular Lenti-X™ 293T (Clontech-Takara) com os seguintes plasmídeos: i) construção *packaging* contendo os genes *gag*, *pol* e *rev* (*psPAX2*); ii) plasmídeo Env expressando a glicoproteína G do envelope do vírus da estomatite vesicular (*VSV-G*); e iii) um plasmídeo com gene de interesse (*pLVX-Tet3G* ou *pLenti6 Tight Tax*). Após a transfecção, os sobrenadantes contendo lentivírus foram coletados, concentrados e titulados através de qRT-PCR (Lentiviral Titration Kit LV900, AbmGood) para serem utilizados na etapa de transdução.

A linhagem Jurkat LTR-GFP (5×10^5 células/mL) foi co-transduzida com as partículas lentivirais (*pLVX-Tet3G [G418]+ pLenti6 Tight Tax [blastidina]*), ou apenas *pLVX-Tet3G [G418]*. A multiplicidade de infecção (MOI) para os vetores *pLVX-Tet3G* e *pLenti6 Tight Tax* foi 1:30 e 1:16, respectivamente. Para esta etapa, o reagente sulfato de protamina (MP Biomedicals) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante (8 µL/mL). Em seguida, as células foram centrifugadas a 800 x g durante 30 minutos a 32° C. O sedimento foi ressuscitado em RPMI-1640 contendo 10 % de SFB e as células foram incubadas a 37° C em 5 % CO₂ e 85 % de umidade relativa

do ar. Após 72 h, as células foram cultivadas em meio de cultura contendo os antibióticos G418 (1 mg/mL) e blasticidina (1 µg/mL) a fim de selecionar as células transduzidas, ou seja, àquelas que estavam expressando os genes de interesse. Essas células foram mantidas em cultura na presença desses antibióticos até a eliminação das células não transduzidas, cuja morte celular foi determinada pelo corante azul de Tripán (0,4 %, Gibco™).

3.2.6 Caracterização da linhagem repórter Jurkat LTR-GFP inducible-tax

Jurkat LTR-GFP *inducible-tax* é uma linhagem celular baseada no sistema de expressão gênica controlada (*Tet-On® Clontech*), no qual a DOX pode promover a expressão de *tax*. A fim de determinar a concentração de DOX mais adequada para os ensaios de triagem de compostos, essa linhagem repórter foi incubada com diferentes concentrações desse reagente a 37° C, 5 % CO₂ e 85 % de umidade relativa do ar durante 48 h. As seguintes concentrações de DOX foram testadas: 0,01, 0,1, 1, 10 e 50 µg/mL. Em paralelo, a linhagem Jurkat LTR-GFP Tet3G (controle) também foi incubada com diferentes concentrações de DOX. Células sem DOX também foram adotadas como controles. Após 48 h, a expressão de GFP foi analisada por citometria de fluxo (BD FACSCanto II) e microscopia de fluorescência (FSX100 Olympus). Além da concentração de DOX, foi realizado outro teste para analisar o tempo de incubação mais adequado (48 h ou 72 h).

A fim de aumentar o número de células positivas para GFP, foi realizada a separação celular ou *cell sorting* (BD FACSAria III). Para isso, após indução de *tax* com DOX (concentração definida previamente) durante 48 h, a linhagem Jurkat LTR-GFP *inducible-tax* foi submetida à separação celular de acordo com a expressão de GFP, na qual as células sem DOX foram empregadas como controle (células negativas para GFP). Dessa forma, a linhagem repórter foi mantida em cultura para expansão e congelamento celular.

3.2.7 Análise de expressão de GFP e Tax

Foi realizada a análise de expressão de GFP e Tax por citometria de fluxo. Para isso, as linhagens Jurkat LTR-GFP *inducible-tax* (5 x 10⁵ células) e Jurkat LTR-GFP Tet3G controle (5 x 10⁵ células) foram incubadas na presença ou ausência de DOX.

Após 72 h de incubação, as células foram coletadas, distribuídas em tubos de poliestireno previamente identificados e lavadas com solução PBS 1X a 1.000 x g por 3 minutos. Essas células foram fixadas com PBS contendo 4 % de paraformaldeído (Sigma-Aldrich) durante 20 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz. Em seguida, as suspensões celulares foram centrifugadas a 1.000 x g por 3 minutos, e então, as mesmas foram lavadas com PBS 1X contendo 4 % de soro de cabra (Sigma-Aldrich). Uma solução de PBS 1X contendo 0,5 % de Triton X-100 (Bio-Rad) foi adicionada em cada tubo de amostra a fim de permeabilizar as células. Essa etapa foi executada durante 7 minutos à temperatura ambiente, e em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação a 600 x g por 3 minutos. Cada suspensão celular foi lavada com solução PBS 1X/4 % de soro de cabra. Para a marcação intracelular de Tax, o anticorpo primário murino anti-LT-4 (diluído 1/1.000; gentilmente cedido por Yuetsu Tanaka, Universidade de Kitasato, Kanagawa, Japão) foi adicionado às células, sendo a incubação de 30 minutos e à temperatura ambiente. Após esse tempo, as células foram lavadas com PBS 1X/4 % de soro de cabra e incubadas com anticorpo secundário conjugado com PE (IgG *goat anti-mouse*, diluído 1/500; BD Biosciences) durante 30 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Por fim, foi realizada uma etapa de lavagem com PBS 1 X/4 % de soro de cabra e o sedimento foi ressuspenso em solução de PBS 1X. A linhagem MT-2 foi utilizada como controle positivo de expressão de Tax, enquanto as células incubadas com isotipo controle ou com apenas anticorpo secundário foram também utilizadas como controle de marcação. Portanto, as células foram analisadas quanto à expressão de GFP e Tax por citometria de fluxo (BD FACSCalibur™) a partir de um total de 10.000 eventos adquiridos. Em paralelo, a expressão de GFP também foi verificada por microscopia de fluorescência, sendo que as imagens foram registradas por meio do *software DP Controller* (Olympus).

3.3 Estabelecimento de ensaio baseado em célula no formato de placa-384 poços

3.3.1 Compostos de referência e controle

Foram adquiridos os seguintes compostos: ácido L-ascórbico (AA, Sigma-Aldrich), zidovudina (AZT, Farmanguinhos; cedida gentilmente pela Unidade Especial

de Tratamento de Doenças Infecciosas – UETDI, do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto), interferon-alfa (IFN- α , Invitrogen) e um inibidor da enzima topoisomerase II, etoposídeo (ETO, Sigma-Aldrich). Foi preparada uma solução estoque de AA ($C_6H_8O_6$, PM = 176,12 g/mol) em meio RPMI-1640 na concentração de 10 mg/mL. Para o preparo das alíquotas de AZT, cada cápsula de 100 mg (PM = 267,24 g/mol) foi dissolvida em DMSO para concentração primária de 200 mM. Enquanto alíquotas de ETO foram preparadas em solução de DMSO na concentração de 50 mM. Todas as alíquotas de ambas as soluções foram armazenadas em freezer - 20° C. Já as alíquotas de IFN- α foram preparadas em meio RPMI-1640 contendo 10 % de SFB e na concentração de 25.000 U/mL. Essas alíquotas foram estocadas em freezer - 80°C. Quando necessárias, alíquotas em diferentes concentrações foram preparadas e estocadas sob as mesmas condições.

3.3.2 *Definição de densidade celular*

Para iniciar os ensaios de triagem de drogas, é necessário definir uma série de parâmetros, dentre eles a quantidade de células por poço. Nestes ensaios, podem ser utilizadas microplacas pretas de poliestireno contendo 384 poços (Greiner Bio-One), as quais foram adotadas nesse estudo. Diferentes quantidades de células por poço foram adicionadas em volume de 50 μ L: 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000 e 10.000. Após 72 h de cultivo das linhagens celulares (Jurkat, MT-2, MT-4 e C8166), a confluência de cada poço foi observada em microscópio invertido.

3.3.3 *Definição de concentração de dimetilsulfóxido*

A partir da determinação da quantidade de células para uma confluência ideal nas microplacas de 384 poços, foram avaliadas diferentes concentrações de DMSO. Uma vez que tal reagente é o veículo das drogas e de alguns compostos de referência/controle, o intuito foi definir a concentração de DMSO que não interferisse no número de células e nem na viabilidade das mesmas. Para tanto, diferentes concentrações de DMSO no volume de 10 μ L foram testadas: 2 %, 1 % e 0,5 %. A quantidade de células por poço adotada foi a densidade celular definida a partir do item 3.2.2. Após 72 h, o número absoluto de células e a viabilidade foram

determinados a partir da contagem de células viáveis e mortas em câmara de Neubauer pela técnica de exclusão pelo azul de Tripán (0,4 %, Gibco™).

3.3.4 Análise de atividade metabólica pelo método de resazurina

Devido à quantidade de compostos a serem utilizados nesse estudo, somente a linhagem celular infectada pelo HTLV-1, MT-2, foi adotada nos ensaios de padronização, triagem e validação. Sendo assim, para estabelecer a triagem primária de compostos para a identificação de inibidores de proliferação celular e/ou indutores de apoptose na linhagem celular MT-2, alguns testes foram realizados utilizando o corante resazurina (Sigma-Aldrich). O método de resazurina é um método simples e de baixo custo, sendo indicado para avaliar a atividade metabólica, ou seja, a proliferação e a viabilidade celular. Nesse sentido, as células metabolicamente ativas (viáveis) são capazes de promover a oxirredução da resazurina, que, por sua vez, emite fluorescência no comprimento de onda de 590 nm (RISS et al., 2013).

Primeiramente, foi realizado um teste com diferentes concentrações de ETO (10, 15 e 20 μM) que é um inibidor da enzima topoisomerase II, e conseqüentemente, um controle de inibição de proliferação celular e indução de apoptose. Um volume de 10 μL de cada concentração foi adicionado por poço numa microplaca de 384 poços. Em seguida, 50 μL de suspensão da linhagem MT-2 (4.000 células) foram adicionados. Como controles experimentais foram utilizados: i) MT-2 com PBS 1X a 0,5 % DMSO; ii) poços somente com RPMI a 10 % de SFB. A microplaca foi incubada por 72 h a 37° C / 5 % CO₂. Antes de completar 72 h, foram adicionados 10 μL por poço de resazurina para uma concentração final de 10 μM . Após 4 e 8 h de incubação com a resazurina, foi realizada a análise da placa por fluorometria no equipamento SpectraMax M5 (Molecular Devices).

3.3.5 Definição de composto de referência/controle através de ensaio de curva dose-resposta (DRC)

O ensaio de curva dose-resposta (DRC) foi realizado a fim de avaliar um composto de referência a ser utilizado como controle durante os ensaios de triagem de drogas, e determinar qual a sua concentração capaz de induzir 50 % de atividade (EC₅₀). Dessa forma, com a definição da concentração de ETO e do tempo de

incubação com a resazurina, foi realizado o ensaio de DRC. Para isso, cada composto de referência foi diluído de forma seriada 1:2, iniciando nas concentrações de 200 µg/mL (AA), 1.000 U/mL (IFN-α), e 3.200 µM (AZT). Os seguintes controles foram adotados: i) MT-2 com PBS 1X a 0,5 % DMSO; ii) MT-2 incubada com ETO; iii) poços somente com RPMI a 10 % de SFB. A quantidade de MT-2 e Jurkat por poço foi 4.000 células em volume de 50 µL. Portanto, após a pipetagem de 10 µL/poço dos compostos ou controles e 50 µL das suspensões celulares, a microplaca foi incubada por 72 h a 37° C / 5 % CO₂. A resazurina foi adicionada 4 h antes de completar o tempo final de incubação.

3.4 Triagem de compostos

3.4.1 Biblioteca de compostos

Um total de 26 derivados 1,2,3-triazólicos (compostos FCFRP) foi sintetizado por Síntese Orgânica pelo Laboratório de Química Medicinal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) e cedido para testes pela Profa. Dra. Ivone de Carvalho, Dra. Susimaira Pedersoli Mantoani e pelo doutorando Paulo Sérgio Nunes. Tais compostos foram reconstituídos em DMSO para uma concentração final de 10 mM e armazenados a - 20° C. Além disso, outro conjunto de compostos foi disponibilizado pelo NIH (*National Institute of Health*): biblioteca *NIH Clinical Collection* – NCC 108 (Evotec). Essa biblioteca consiste em 707 compostos na concentração de 10 mM em 100 % de DMSO e foi armazenada a - 20° C. Além disso, tais compostos são aprovados para uso clínico pela Agência Reguladora de Medicamentos dos Estados Unidos *Food and Drug Administration (FDA)*.

3.4.2 Triagem de compostos pelo método de resazurina

Compostos FCFRP

A fim de identificar compostos inibidores da proliferação celular e/ou indutores de apoptose, foi realizada uma triagem primária com 26 derivados 1,2,3-triazólicos (compostos FCFRP) através do ensaio de atividade metabólica com resazurina. Devido ao pequeno número de compostos, a triagem consistiu em ensaio de DRC. Para isso, cada composto foi diluído de maneira seriada 1:2 em placa intermediária

contendo 384 poços (Greiner Bio-One) para concentração de 300 μM contendo PBS 1X a 3 % de DMSO como diluente (DRC com 10 pontos de diluição). Em microplaca preta com 384 poços (placa de ensaio), foram transferidos 10 μL /poço de cada composto. Os seguintes controles foram adotados: i) PBS 1X a 0,5 % DMSO; ii) ETO (20 μM); iii) AZT a 3.200 μM ; iv) DRC de AZT (DRC 12.800 – 25 μM); v) poços somente com RPMI a 10 % de SFB. Conforme definido previamente, foram pipetados 10 μL /poço dos compostos ou controles e 50 μL da linhagem celular MT-2 (4.000 células/poço). Dessa forma, os compostos foram avaliados a partir da concentração de 50 μM . Além disso, a microplaca foi incubada por 72 h a 37° C / 5 % CO₂ e a resazurina foi adicionada 4 h antes de completar o tempo final de incubação.

Compostos NIH

A biblioteca *NIH Clinical Collection* – NCC 108 (Evotec) foi disponibilizada sob o formato de nove placas de 96 poços (10 μL /poço) na concentração de 10 mM em 100 % DMSO (**Figura 6**). Para confecção do estoque, os 707 compostos distribuídos nas nove placas foram transferidos para microplacas de poliestireno contendo 384 poços (Greiner Bio-One) (**Figura 7**). Além disso, foi preparado um estoque intermediário na concentração de 1 mM (10 μL /poço) em 100 % DMSO. Ambos os estoques foram armazenados em freezer a - 20° C.

Para a triagem pelo método de resazurina, os 707 compostos a 1 mM (estoque intermediário) foram diluídos previamente em solução PBS 1X para a concentração de 0,03 mM (30 μM) a 3 % DMSO. Em seguida, 10 μL /poço de cada composto foram transferidos para as placas de ensaio. Como controles, foram utilizados: i) PBS 1X a 0,5 % DMSO; ii) ETO (20 μM); iii) DRC de AZT (15.000 – 29,30 μM); iv) poços somente com RPMI a 10 % de SFB. Nesse sentido, os compostos foram submetidos à triagem primária na concentração de 5 μM . Foram utilizadas cinco placas de ensaio: i) placa DRC AZT; ii) placa 0,5 % DMSO; iii) placa NIH 01; iv) placa NIH 02; v) placa NIH 3 + DRC AZT (**Figura 8**). Por fim, 50 μL /poço da linhagem celular MT-2 (4.000 células/poço) foram adicionados nas placas de ensaio, as quais foram incubadas por 72 h a 37° C/5 % CO₂. Antes de completar o tempo final de incubação, a resazurina foi adicionada e as placas foram incubadas por 4 h. Esse ensaio foi realizado em duplicata (2 ensaios independentes, ou seja, testes em dias diferentes).

Figura 6. Biblioteca NIH Clinical Collection – NCC 108 (Evotec)

O mapa das nove placas de 96 poços (Racks 1 a 9) é composto por nove tabelas, cada uma representando um rack. Cada rack contém 8 linhas (A-H) e 12 colunas (1-12). Os compostos são nomeados de RA2 a RH11, seguindo um padrão de letras e números. As placas são coloridas de forma cíclica: Rack 1 (laranja), Rack 2 (verde), Rack 3 (azul), Rack 4 (amarelo), Rack 5 (cinza), Rack 6 (verde), Rack 7 (laranja), Rack 8 (azul) e Rack 9 (rosa).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	RA2	RA3	RA4	RA5	RA6	RA7	RA8	RA9	RA10	RA11		
B	RB2	RB3	RB4	RB5	RB6	RB7	RB8	RB9	RB10	RB11		
C	RC2	RC3	RC4	RC5	RC6	RC7	RC8	RC9	RC10	RC11		
D	RD2	RD3	RD4	RD5	RD6	RD7	RD8	RD9	RD10	RD11		
E	RE2	RE3	RE4	RE5	RE6	RE7	RE8	RE9	RE10	RE11		
F	RF2	RF3	RF4	RF5	RF6	RF7	RF8	RF9	RF10	RF11		
G	RG2	RG3	RG4	RG5	RG6	RG7	RG8	RG9	RG10	RG11		
H	RH2	RH3	RH4	RH5	RH6	RH7	RH8	RH9	RH10	RH11		

Mapa das nove placas de 96 poços com 707 compostos (Racks 1 a 9).

A partir da triagem primária, os compostos que apresentaram atividade $\geq 50\%$ (*hits*) foram selecionados para os ensaios secundários confirmatórios, os quais foram realizados na forma de DRC. Para isso, os compostos das placas de estoque (10 mM) foram diluídos em PBS 1X para a concentração inicial de $300\ \mu\text{M}/3\%$ DMSO em placas intermediárias. A DRC consistiu em 10 pontos de diluição seriada 1:2. Em seguida, a DRC dos compostos foi transferida para as placas de ensaio ($10\ \mu\text{L}/\text{poço}$). As mesmas condições da triagem primária foram adotadas nos ensaios confirmatórios. Sendo assim, após a adição da linhagem celular MT-2, as placas foram incubadas por 72 h a $37^\circ\text{C}/5\%$ CO_2 para posterior análise de proliferação/viabilidade celular pelo método de resazurina. Os ensaios de DRC confirmatórios também foram realizados em duplicata (2 ensaios independentes).

3.4.3 Análise dos dados

Após a leitura de resazurina a 590 nm por fluorometria, os dados referentes aos valores de unidade de fluorescência relativa (URF) obtidos foram normalizados a partir do emprego da seguinte fórmula:

$$\text{Atividade normalizada}(\%) = \left(1 - \frac{(\text{Valor URF da célula com composto}) - (\text{Média URF célula com ETO})}{(\text{Média URF célula com DMSO}) - (\text{Média URF célula com ETO})}\right) * 100$$

Sendo:

- URF da célula com composto: valor de URF para linhagem celular incubada com composto teste ou composto de referência;
- Média URF célula com ETO: média dos valores de URF para linhagem celular incubada com ETO (20 µM);
- Média URF célula com DMSO: média dos valores de URF para linhagem celular somente com 0,5 % DMSO.

Para alguns ensaios, a viabilidade celular também foi avaliada através da fórmula:

$$\text{Viabilidade celular} = \frac{\text{Valor URF da célula não infectada com composto}}{\text{Média URF célula não infectada com DMSO}}$$

Sendo:

- URF da célula não infectada com composto: valor de URF para linhagem celular não infectada pelo HTLV-1 e incubada com composto teste ou composto de referência;
- Média URF célula não infectada: média dos valores de URF para linhagem celular não infectada pelo HTLV-1 somente com 0,5 % DMSO.

O coeficiente de variação (CV) foi calculado para os dados de URF obtidos nos poços com linhagem celular somente com 0,5 % DMSO e linhagem celular incubada com ETO (20 µM). Para avaliar a qualidade dos ensaios de triagem dos compostos, foi calculado o *Z-factor* a partir do desvio-padrão dos valores obtidos para célula com 0,5 % DMSO ou ETO e da média dos valores desses mesmos controles. Os ensaios

que apresentaram valores de *Z-factor* $\geq 0,5$ e $< 1,0$ foram considerados satisfatórios (ZHANG et al., 2012). A fórmula adotada foi a seguinte:

$$Z - factor = 1 - 3 * \frac{(DP \text{ célula com DMSO} + DP \text{ célula com ETO})}{(Média \text{ célula com DMSO} - Média \text{ célula com ETO})}$$

Sendo:

- DP célula com DMSO: desvio-padrão dos valores de URF da célula com 0,5 % DMSO;
- DP célula com ETO: desvio-padrão dos valores de URF da célula com ETO (20 μ M);
- Média célula com DMSO: média dos valores de URF da célula com 0,5 % DMSO;
- Média célula com ETO: média dos valores de URF da célula com ETO (20 μ M).

Para os ensaios de triagem dos compostos NIH, também foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson entre os ensaios. Todos os dados da triagem de compostos foram processados a partir da utilização dos *softwares Microsoft Excel* e *TIBCO Spotfire*.

Uma forma de avaliar o potencial do composto é determinar o seu EC_{50} , ou seja, a concentração do composto que corresponde à 50 % de atividade normalizada (inibição ou diminuição do crescimento celular) após 72 h de incubação com a MT-2. Então, quanto mais potente ou eficaz for o composto, menor deverá ser o seu EC_{50} , e conseqüentemente, sua atividade normalizada será próxima de 100 %. Nesse sentido, para calcular o EC_{50} de cada composto após os ensaios de DRC, os valores de concentração dos compostos foram transformados em *log X*. O valor de EC_{50} de cada composto foi determinado pela construção de curvas para os dados usando uma análise de regressão não linear através de equação de dose-resposta sigmóide com 4 parâmetros. Os gráficos de curva dose-resposta e os valores de EC_{50} por meio de interpolação foram gerados utilizando o *software GraphPad Prism* (versão 05).

Por fim, o critério para a seleção de *hits* consistiu em selecionar compostos FCFRP com atividade ≥ 70 %, uma que vez a triagem envolveu um número reduzido de compostos sintéticos. Enquanto para os compostos NIH, foram selecionados

aqueles com atividade $\geq 50\%$ por se tratar de uma triagem em escala maior (707 compostos).

3.5 Validação de compostos selecionados

3.5.1 Identificação de compostos inibidores de proliferação celular

A fim de confirmar o efeito dos compostos previamente triados pelo método de resazurina sobre a proliferação da linhagem MT-2, foram realizados ensaios de ciclo celular por citometria de fluxo. Para tanto, tais ensaios foram executados em placa com 24 poços, na qual foram distribuídos 100 μL /poço de composto a 50 μM (em 0,5 % DMSO). Como controles, foram utilizados i) MT-2 com PBS 1X a 0,5 % DMSO; ii) MT-2 incubada com ETO (20 μM). Assim, foram pipetados 100 μL /poço dos compostos ou controles e 500 μL da linhagem celular MT-2 (3×10^5 células/poço), e a placa foi incubada por 72 h a 37° C / 5 % CO_2 .

Após o tempo de incubação, foi realizada a marcação com IP a fim de analisar o ciclo celular por citometria de fluxo. Primeiramente, as células foram coletadas e lavadas duas vezes com solução de PBS 1X. Em seguida, 700 μL de etanol a 70 % gelado foram adicionados nas amostras por gotejamento e sob leve agitação. Após incubação *overnight* e a - 20° C, as amostras foram centrifugadas a 400 x *g*/5 minutos. Cada sobrenadante foi aspirado e o sedimento ressuspensionado com 225 μL de PBS 1X. Para evitar a marcação do RNA com IP, foi realizado o tratamento das amostras com 10 ng/mL de RNase A (Qiagen) durante 30 minutos a 37° C. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 400 x *g*/5 minutos, e em seguida, transferidas para tubos de poliestireno 12 x 75 mm devidamente identificados. Finalmente, 100 μL de IP (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram adicionados em cada tubo para a marcação do DNA. Um total de 10.000 eventos foi adquirido no citômetro de fluxo (BD FACSCalibur™) e o ciclo celular foi analisado através do *software ModFit LT 5.0*.

3.5.2 Identificação de compostos indutores de apoptose

O efeito dos compostos identificados com a triagem primária sobre a apoptose da linhagem MT-2 foi avaliado. A análise de apoptose foi realizada por meio de dois métodos: avaliação da ativação de caspases efetoras-3/7 e da externalização da

fosfatidilserina na membrana celular. Para ambas as análises, foi realizado o mesmo ensaio em placas de 24 poços conforme o item 3.5.1. Após 72 h de incubação das células com os diferentes compostos a 50 μM , as células foram coletadas e transferidas para tubos de poliestireno 12 x 75 mm devidamente identificados. O reagente *CellEvent Caspase-3/7 Green Detection Reagent* (Thermo Fisher Scientific) foi adicionado em cada tubo na concentração final de 0,5 μM . As amostras foram incubadas por 45 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Após esse período, as amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo (BD FACSCalibur™) para analisar a porcentagem de células com caspases-3/7 ativadas.

A partir das mesmas amostras, foi possível confirmar a apoptose através da marcação com anexina-V Cy5 (BD Biosciences). Para isso, ao término da aquisição dos tubos, as células foram lavadas com solução PBS 1X e ressuspensas com 200 μL de tampão de ligação 1X (BD Biosciences). Em seguida, as amostras foram incubadas com 5 μL de anexina-V Cy5 por 15 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Após esse período, cada amostra foi adquirida por citometria de fluxo. Dessa forma, foi possível avaliar um dos eventos envolvidos com a apoptose mediados pela ativação de caspases efetoras: a externalização da fosfatidilserina na membrana celular. Tal evento pode ser confirmado através da ligação da anexina-V Cy5 com esse fosfolípido, com o qual ela possui alta afinidade.

3.5.3 Identificação de inibidores de expressão de *tax* e/ou transativação viral

A linhagem Jurkat LTR-GFP *inducible-tax* é uma linhagem *Tet-On*® que expressa *tax* sob indução da DOX. Assim, a proteína Tax promove a transativação do LTR, que por sua vez, culmina na expressão de GFP. Nesse sentido, essa linhagem foi empregada na validação de compostos selecionados para a identificação de inibidores da expressão de *tax* e/ou transativação de LTR. Para isso, 500 μL de suspensão celular (3×10^5 células/poço) foram distribuídos em placas de 24 poços contendo 0,5 % de DMSO, sendo: i) Jurkat LTR-GFP *inducible-tax*; ii) Jurkat LTR-GFP *inducible-tax* + DOX; iii) Jurkat LTR-GFP Tet3G controle; e iv) Jurkat LTR-GFP Tet3G controle + DOX. Além disso, a linhagem Jurkat LTR-GFP *inducible-tax* + DOX foi incubada com os compostos selecionados na triagem primária nas concentrações de 50 μM . A placa foi incubada por 72 h em estufa a 37° C/5 % CO₂. Ao final desse período, as células foram coletadas, transferidas para tubos de poliestireno, marcadas

com IP e adquiridas no ciômetro de fluxo (BD FACSCalibur™) para a análise da expressão de GFP dentro da população de células viáveis (GFP⁺/PI⁻).

3.5.4 Teste com outras linhagens celulares

A última etapa desse estudo foi avaliar a atividade dos compostos selecionados em outras linhagens celulares. Para isso, linhagens celulares infectadas pelo HTLV-1 (MT-4 e C8166) e não infectada com esse retrovírus (Jurkat e Huh-7) foram incubadas com os diferentes compostos. A linhagem Huh-7 (linhagem de hepatoma humano), gentilmente cedida pelo Dr. Almícar Tanuri da Universidade Federal do Rio de Janeiro, foi cultivada em meio *Dulbecco's modification of Eagle's medium* (DMEM, Sigma-Aldrich) contendo 10 % de SFB.

Em placas intermediárias, os compostos a 10 mM foram diluídos de forma seriada 1:2 em PBS 1X para a concentração inicial de 300 µM/3 % DMSO. Em seguida, a DRC dos compostos (10 pontos de diluição) foi transferida para as placas de ensaio (10 µL/poço). As mesmas condições da triagem primária pelo método de resazurina foram adotadas. As linhagens MT-4, C8166, Jurkat e Huh-7 foram plaqueadas em placas diferentes, que, por sua vez, foram incubadas por 72 h a 37° C/5 % CO₂ para posterior análise de proliferação/viabilidade celular pelo método de resazurina. Para as linhagens celulares infectadas pelo HTLV-1, a atividade normalizada para cada composto foi determinada através da fórmula descrita no item 3.4.3, e para as linhagens Jurkat e Huh-7, foi utilizada a fórmula de viabilidade celular (item 3.4.3).

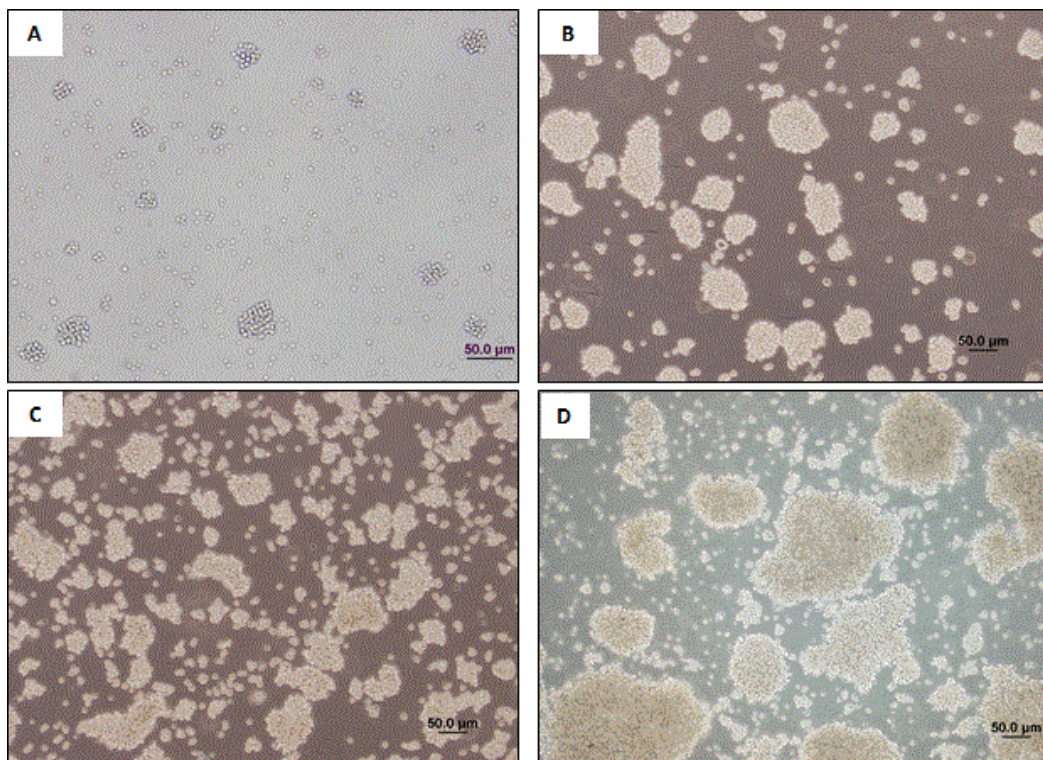
4. RESULTADOS

Parte I – Caracterização de linhagens celulares

4.1 Morfologia

A morfologia das diferentes linhagens foi observada ao longo do período de cultivo através de microscópio invertido, sendo que algumas imagens foram obtidas a partir do *software DP Controller*. A morfologia de todas as linhagens celulares é típica de linfoblasto. O crescimento ocorre em suspensão com a formação de agregados celulares, sendo bastante intenso nas linhagens MT-2, MT-4 e C8166 (**Figura 9A - D**).

Figura 9. Morfologia das linhagens celulares em cultura



A) Jurkat, clone E6-1 (ATCC); B) MT-2 (ECACC); C) MT-4 (ECACC); D) C8166 (ECACC).

4.2 Imunofenótipo das linhagens celulares

Foram realizadas as imunofenotipagens das linhagens Jurkat, MT-2, MT-4 e C8166 por citometria de fluxo. A partir da análise dos histogramas gerados, foi

possível verificar a porcentagem de expressão celular de cada marcador avaliado (**Tabela 2**). A Jurkat é uma linhagem derivada de leucemia aguda de células T, cujo fenótipo é de linfócito T auxiliar: CD3⁺, CD7⁺, CD4⁺, CD8⁻. As linhagens MT-2 e MT-4 são oriundas do co-cultivo de leucócitos de ATL com linfócitos de cordão umbilical. Já a linhagem C8166 é proveniente da fusão de células de cordão umbilical com linhagem produtora de HTLV-1 de paciente com ATL. Tais linhagens MT-2, MT-4 e C8166 são linfócitos T atípicos: CD3⁻, CD7⁻, CD4⁺, CD8⁻, CD25⁺.

Tabela 2. Imunofenótipo das linhagens celulares Jurkat, MT-2, MT-4 e C8166.

Porcentagem de expressão celular* (%)				
Marcador	Jurkat	MT-2	MT-4	C8166
<i>CD16,56</i>	1,02	0,33	0,41	0
<i>CD3</i>	77,63	0,13	0,37	0
<i>CD7</i>	96,44	0	2,35	0
<i>CD4</i>	87,98	97,69	98,09	89,79
<i>CD8</i>	0,24	0,28	0	0,97
<i>CD19</i>	0,13	0,37	0,35	0,44
<i>CD20</i>	0,1	0,12	0,1	0,17
<i>CD25</i>	0,33	98,1	98,04	83,84
<i>CD69</i>	0,69	0,01	0,33	0,06

*Um total de 10.000 eventos foi adquirido. Os valores, subtraídos dos isotipos controles, estão expressos em porcentagem.

4.3 Viabilidade celular

Além da imunofenotipagem, a viabilidade das células foi avaliada por citometria de fluxo através da incorporação ou não do IP. As linhagens Jurkat, MT-2, MT-4 e C8166 apresentaram os seguintes valores de viabilidade, respectivamente: 93,74 % (n = 05), 94,26% (n = 05), 88,14 % (n = 06) e 82,49% (n = 03). Portanto, todas as linhagens celulares foram consideradas viáveis para as finalidades propostas.

4.4 Caracterização da linhagem repórter Jurkat LTR-GFP *inducible-tax*

Após a transdução da linhagem Jurkat LTR-GFP com os vetores lentivirais, foi realizada a caracterização da linhagem Jurkat LTR-GFP *inducible-tax* no intuito de confirmar a indução de expressão do gene *tax* após a estimulação com DOX e determinar a concentração ideal desse derivado de tetraciclina. Sendo assim, verificou-se primeiramente que todas as linhagens na ausência de DOX não expressaram GFP, conforme esperado (**Tabelas 3 e 4**). Também não houve expressão significativa de GFP na linhagem Jurkat LTR-GFP Tet3G controle na presença de DOX, uma vez que estas células não apresentam o gene de interesse sob o controle do promotor Tet3G (**Tabela 3**).

Tabela 3. Análise de expressão de GFP na linhagem Jurkat LTR-GFP Tet3G controle após incubação com diferentes concentrações de DOX durante 48 h.

Porcentagem de células GFP ^{**} (%)	
Amostra	% GFP ⁺
Jurkat LTR-GFP Tet3G controle	0,0
Jurkat LTR-GFP Tet3G controle + 0,1 µg/mL DOX	0,0
Jurkat LTR-GFP Tet3G controle + 1 µg/mL DOX	0,1
Jurkat LTR-GFP Tet3G controle + 10 µg/mL DOX	0,6
Jurkat LTR-GFP Tet3G controle + 50 µg/mL DOX	0,0

*Um total de 10.000 eventos foi adquirido. Valores estão expressos em porcentagem.

Em relação à linhagem Jurkat LTR-GFP *inducible-tax*, houve expressão de GFP após incubação com DOX, porém tal expressão foi considerada baixa: aproximadamente 9 % das células expressaram GFP após estímulo com 1 µg/mL de DOX (**Tabela 4**).

Tabela 4. Análise de expressão de GFP na linhagem Jurkat LTR-GFP *inducible-tax* após incubação com diferentes concentrações de DOX durante 48 h.

Porcentagem de células GFP ^{**} (%)	
Amostra	% GFP ⁺
Jurkat LTR-GFP <i>inducible-tax</i>	0,1
Jurkat LTR-GFP <i>inducible-tax</i> + 0,1 µg/mL DOX	5,9
Jurkat LTR-GFP <i>inducible-tax</i> + 1 µg/mL DOX	8,6
Jurkat LTR-GFP <i>inducible-tax</i> + 10 µg/mL DOX	6,9
Jurkat LTR-GFP <i>inducible-tax</i> + 50 µg/mL DOX ^{**}	-

*Um total de 10.000 eventos foi adquirido. Valores estão expressos em porcentagem.

**Não foi possível obter esse dado, uma vez que toda a população de eventos adquirida apresentou-se como células mortas.

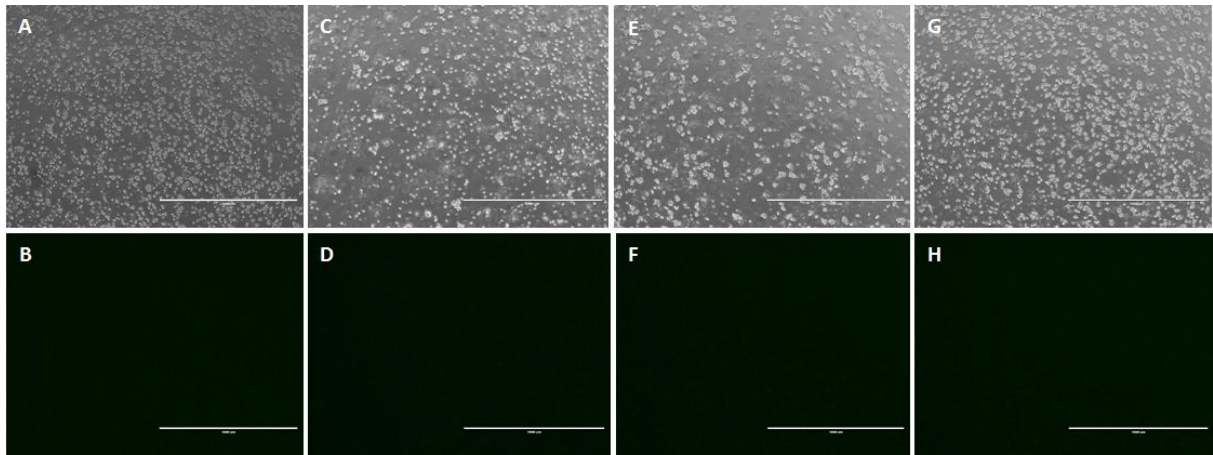
Nesse sentido, o ensaio foi repetido usando as seguintes concentrações de DOX: 0,01, 0,1 e 1 µg/mL de DOX, sendo que a análise de expressão de GFP foi realizada através de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência após 48 e 72 h de incubação. Similar ao observado previamente, na ausência de DOX, nenhuma das células expressaram GFP (**Tabelas 5 e 6**), assim como a linhagem Jurkat LTR-GFP Tet3G controle cultivada na presença de DOX (**Tabela 5, e figuras 10 e 11**).

Tabela 5. Análise de expressão de GFP na linhagem Jurkat LTR-GFP Tet3G controle após incubação com diferentes concentrações de DOX durante 48 e 72 h.

Porcentagem de células GFP ^{**} (%)		
Amostra	% GFP ⁺	% GFP ⁺
	(48 h)	(72 h)
Jurkat LTR-GFP Tet3G controle	0,4	0,7
Jurkat LTR-GFP Tet3G controle + 0,01 µg/mL DOX	0,1	0,4
Jurkat LTR-GFP Tet3G controle + 0,1 µg/mL DOX	0,1	0,4
Jurkat LTR-GFP Tet3G controle + 1 µg/mL DOX	0,2	0,6

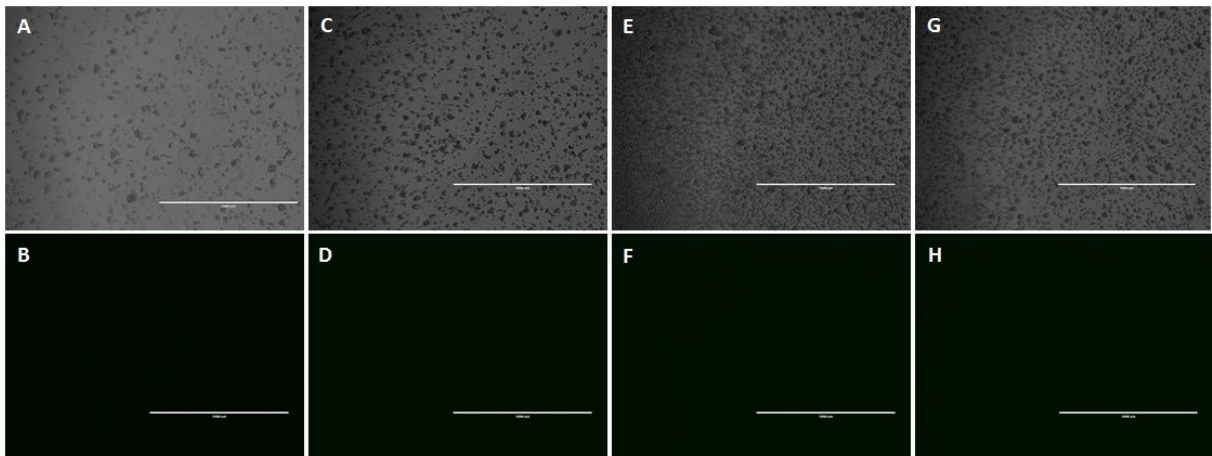
*Um total de 10.000 eventos foi adquirido. Valores estão expressos em porcentagem.

Figura 10. Análise de expressão de GFP na linhagem Jurkat LTR-GFP Tet3G controle após incubação com diferentes concentrações de DOX durante 48 h



Imagens representativas de células: A-B) sem DOX; C-D) 0,01 µg/mL; E-F) 0,1 µg/mL; G-H) 1 µg/mL. Aumento: 4X. Escala: 1.000 µm.

Figura 11. Análise de expressão de GFP na linhagem Jurkat LTR-GFP Tet3G controle após incubação com diferentes concentrações de DOX durante 72 h



Imagens representativas de células: A-B) sem DOX; C-D) 0,01 µg/mL; E-F) 0,1 µg/mL; G-H) 1 µg/mL. Aumento: 4X. Escala: 1.000 µm.

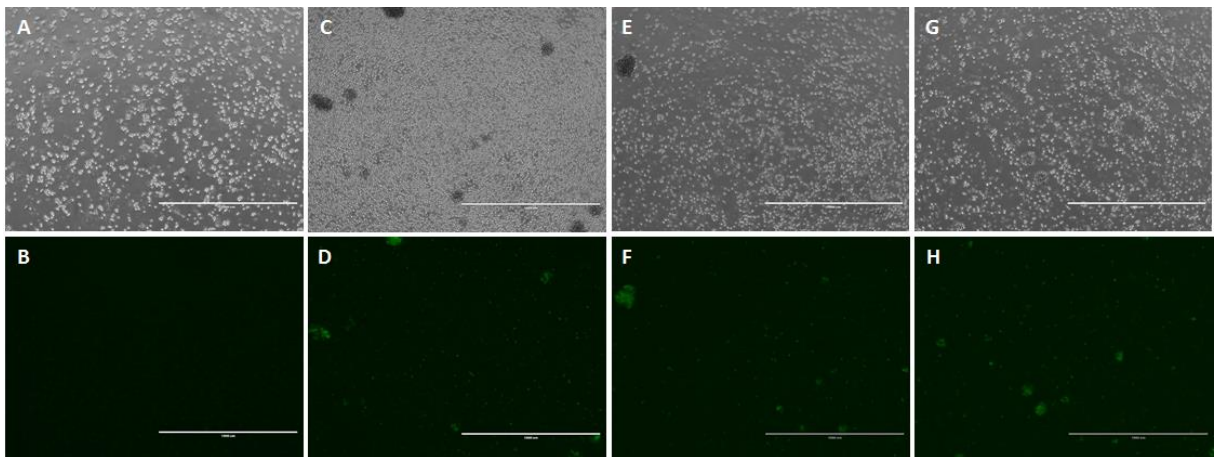
Em relação à linhagem Jurkat LTR-GFP *inducible-tax*, foi possível verificar um aumento da expressão de GFP proporcional ao aumento da concentração de DOX. Assim, 1 µg/mL de DOX foi capaz de induzir a expressão de GFP em 19,3 % e 22,6 % das células após incubação por 48 h e 72 h, respectivamente (**Tabela 6, figuras 12 e 13**).

Tabela 6. Análise de expressão de GFP na linhagem Jurkat LTR-GFP *inducible-tax* após incubação com diferentes concentrações de DOX durante 48 e 72 h.

Porcentagem de células GFP+ (%)		
Amostra	% GFP+ (48 h)	% GFP+ (72 h)
Jurkat LTR-GFP <i>inducible-tax</i>	0,5	1,1
Jurkat LTR-GFP <i>inducible-tax</i> + 0,01 µg/mL DOX	10,1	11,4
Jurkat LTR-GFP <i>inducible-tax</i> + 0,1 µg/mL DOX	15,3	19,7
Jurkat LTR-GFP <i>inducible-tax</i> + 1 µg/mL DOX	19,3	22,6

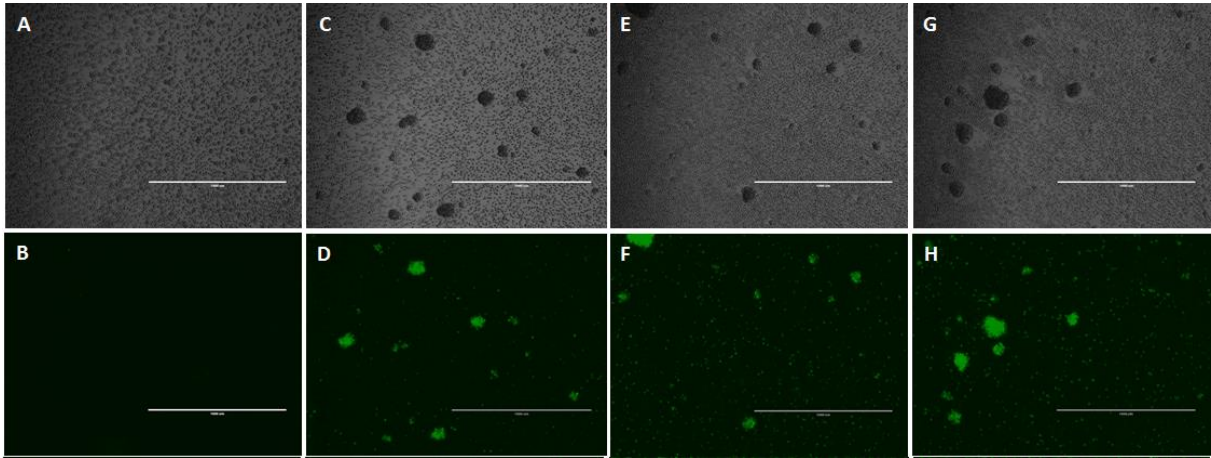
*Um total de 10.000 eventos foi adquirido. Valores estão expressos em porcentagem.

Figura 12. Análise de expressão de GFP na linhagem Jurkat LTR-GFP *inducible-tax* após incubação com diferentes concentrações de DOX durante 48 h



Imagens representativas de células: A-B) sem DOX; C-D) 0,01 µg/mL; E-F) 0,1 µg/mL; G-H) 1 µg/mL. Aumento: 4X. Escala: 1.000 µm.

Figura 13. Análise de expressão de GFP na linhagem Jurkat LTR-GFP *inducible-tax* após incubação com diferentes concentrações de DOX durante 72 h



Imagens representativas de células: A-B) sem DOX; C-D) 0,01 µg/mL; E-F) 0,1 µg/mL; G-H) 1 µg/mL. Aumento: 4X. Escala: 1.000 µm.

Finalmente, foi realizada a separação celular ou *cell sorting* com o intuito de aumentar o número de células positivas para GFP. Nesse sentido, após indução de *tax* com DOX, a linhagem Jurkat LTR-GFP *inducible-tax* foi submetida à separação celular de acordo com a expressão de GFP, sendo que 12,6 % das células GFP⁺ foram selecionadas para separação e coleta. O rendimento final foi de $1,39 \times 10^5$ células. Essa suspensão celular foi mantida em cultura para expansão e posterior congelamento.

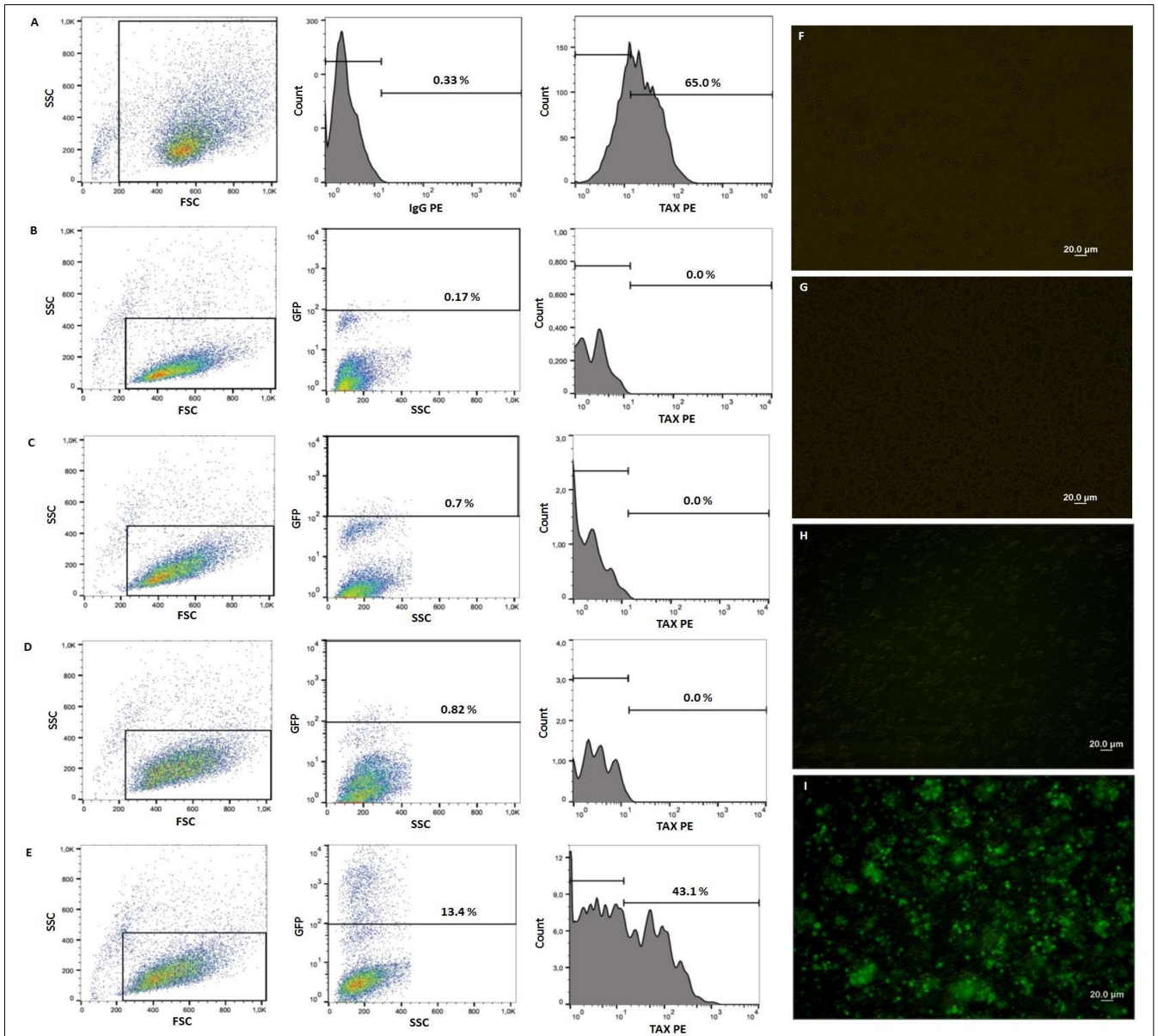
4.5 Análise de expressão de GFP e Tax

As linhagens Jurkat LTR-GFP *inducible-tax* e Jurkat LTR-GFP Tet3G controle foram expandidas, e com isso, o banco celular de cada uma delas foi gerado.

A análise de expressão de GFP e Tax também foi realizada por citometria de fluxo. Após 72 h de incubação com DOX, verificou-se que a partir da população GFP⁺ (13,4 %), houve 43,1 % de expressão da proteína viral Tax na linhagem Jurkat LTR-GFP *inducible-tax* (**Figura 14E**). Tal resultado confirma a indução de expressão de *tax* pela DOX e a consequente transativação do LTR para expressão do GFP. O mesmo não foi observado na ausência de DOX (**Figura 14D**) e nem nos controles negativos: Jurkat LTR-GFP Tet3G controle (**Figura 14B**) e Jurkat LTR-GFP Tet3G controle + DOX (**Figura 14C**). Como controle positivo de expressão de *tax*, foi empregada a

linhagem MT-2 que apresentou 65 % de expressão da proteína viral (**Figura 14A**). Em paralelo, as imagens representativas da expressão de GFP foram obtidas por microscopia de fluorescência (**Figura 14F-I**).

Figura 14. Expressão de Tax e GFP na linhagem Jurkat LTR-GFP *inducible-tax* após indução com 1 $\mu\text{g/mL}$ de DOX por 72 h



Um total de 10.000 eventos foi adquirido por citometria de fluxo (BD FACSCalibur™). Para análise, através do software *FlowJo v10*, foi feito um *gate* de acordo com tamanho (FSC) e complexidade interna (SSC) da população, seguida pela *gate* da população positiva para GFP. A partir das células GFP⁺, histogramas foram gerados para verificar a expressão de Tax. A) MT-2; B) Jurkat LTR-GFP Tet3G controle; C) Jurkat LTR-GFP Tet3G controle + DOX; D) Jurkat LTR-GFP *inducible-tax*; E) Jurkat LTR-GFP *inducible-tax* + DOX. Imagens

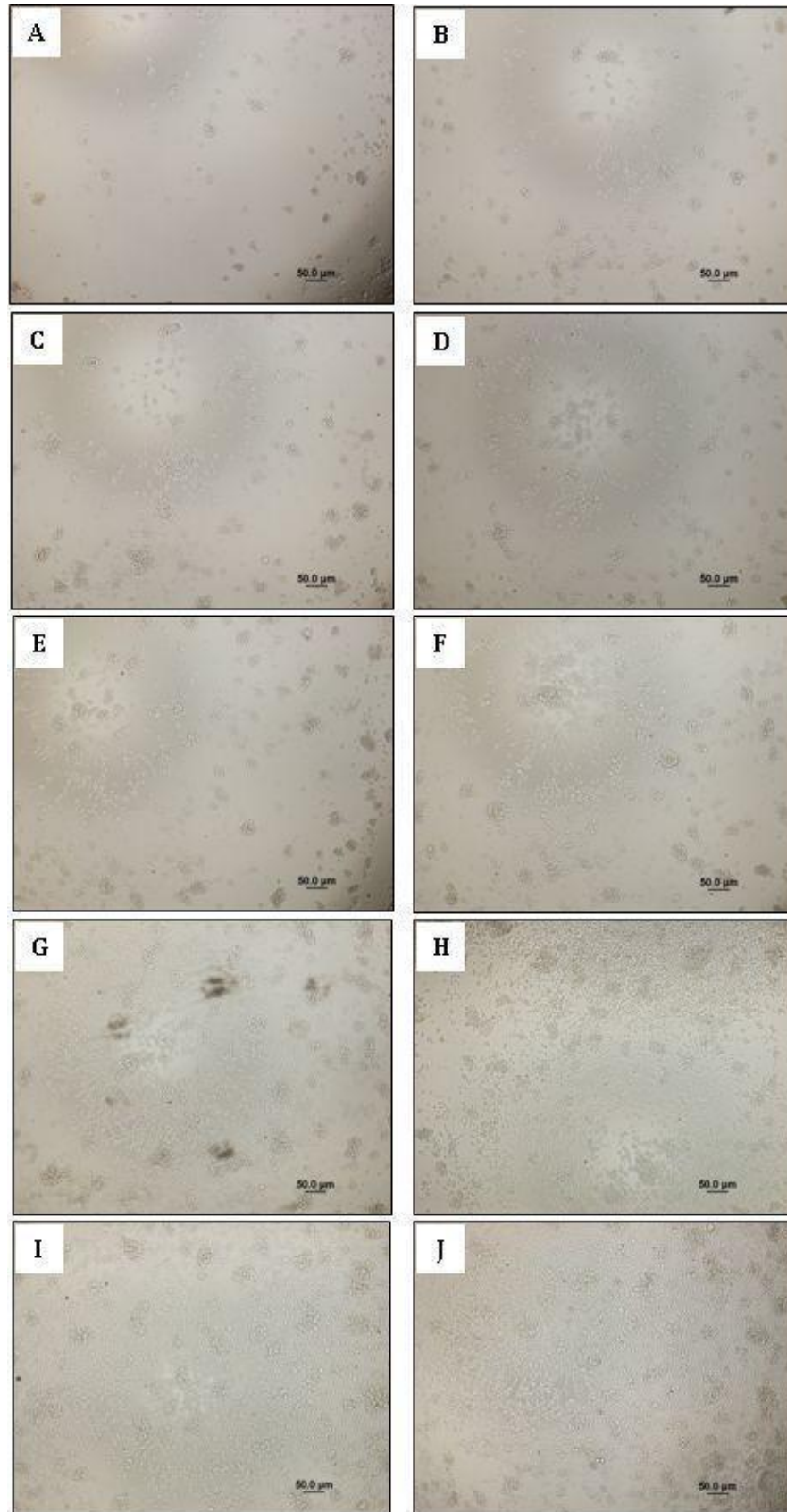
representativas da expressão de GFP também foram obtidas por microscopia de fluorescência. F) Jurkat LTR-GFP Tet3G controle; G) Jurkat LTR-GFP Tet3G controle + DOX; H) Jurkat LTR-GFP *inducible-tax*; I) Jurkat LTR-GFP *inducible-tax* + DOX. Aumento: 10X. Escala: 20 μ m.

Parte II – Estabelecimento de ensaio baseado em célula no formato 384-poços

4.6 Definição de densidade celular

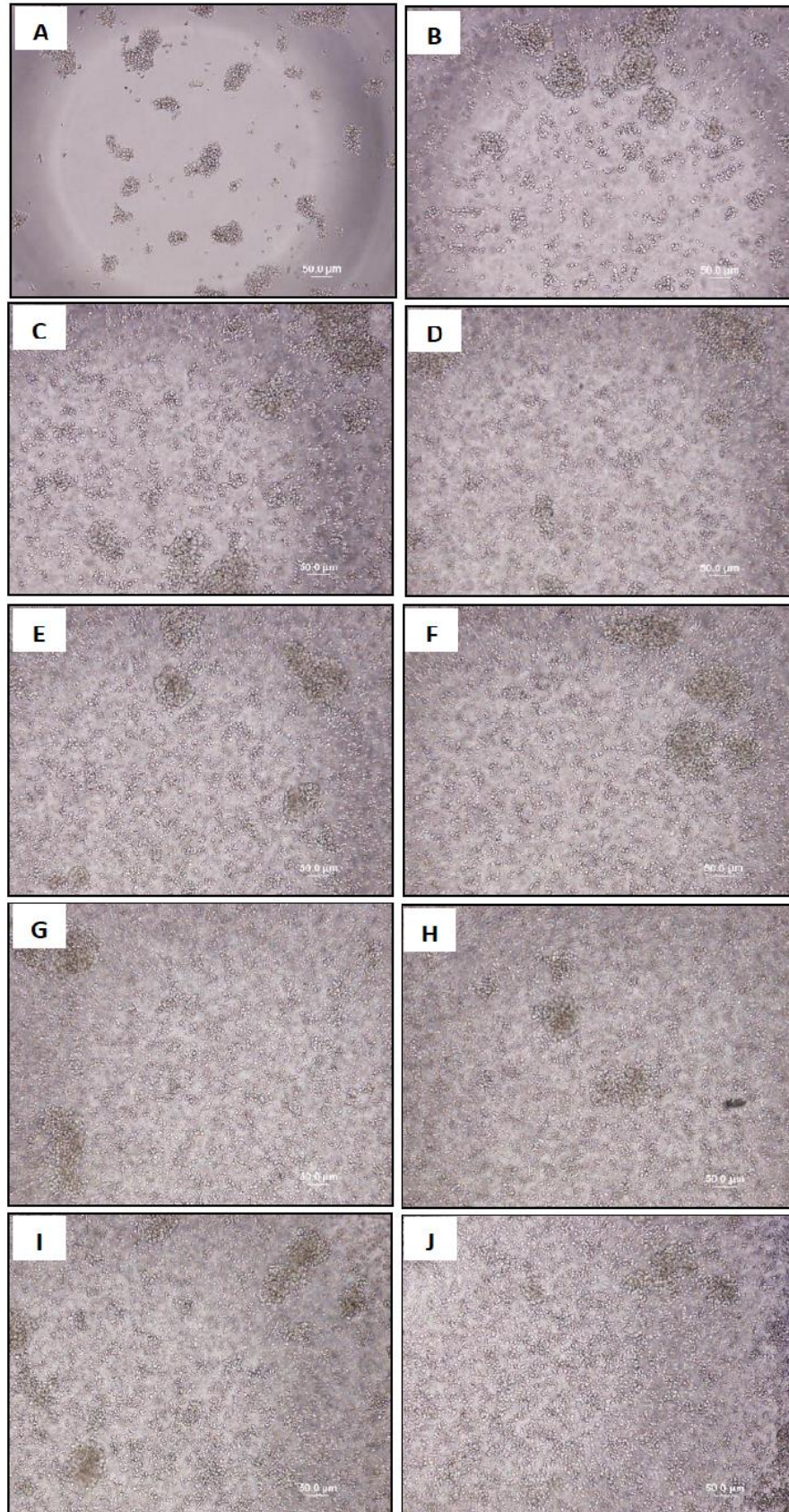
Após a caracterização das linhagens celulares empregadas nesse estudo, iniciou-se a determinação de alguns parâmetros para estabelecer um ensaio baseado em célula no formato 384-poços. Primeiramente, foi definido o número de células/poço nas microplacas de 384 poços. Para isso, após 72 h de cultivo das linhagens Jurkat, MT-2, MT-4 e C8166, a confluência das células em cada poço foi avaliada em microscópio invertido. Imagens de um único campo de cada poço foram registradas a partir do *software DP Controller* (**Figuras 15, 16, 17 e 18**). Para as quatro linhagens celulares, a quantidade de 4.000 células por poço foi considerada a mais apropriada para o cultivo em microplacas-384 poços.

Figura 15. Quantidade de células/poço na linhagem celular Jurkat



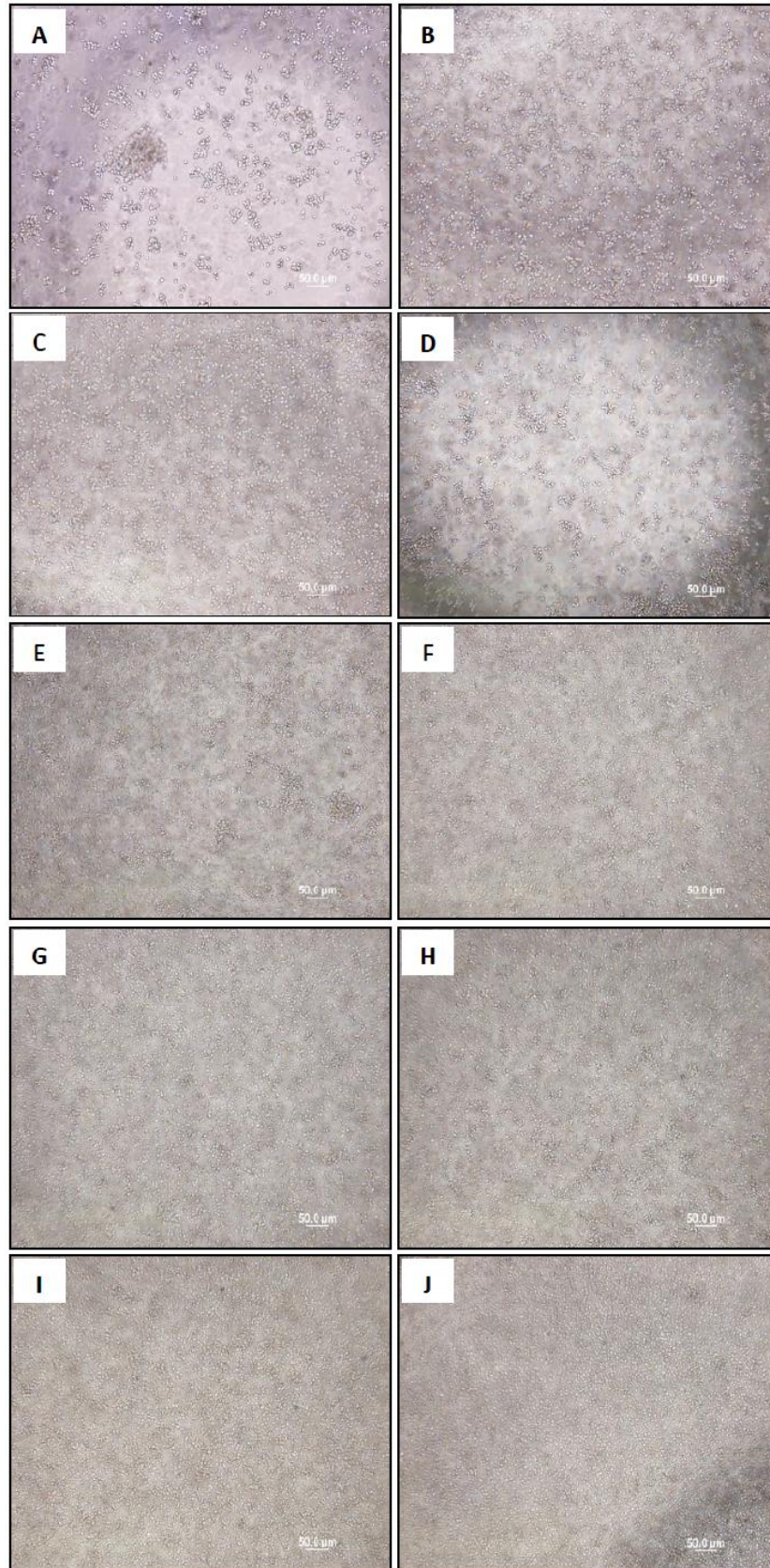
A) 1.000, B) 2.000, C) 3.000, D) 4.000, E) 5.000, F) 6.000, G) 7.000, H) 8.000, I) 9.000, e J) 10.000.

Figura 16. Quantidade de células/poço na linhagem celular MT-2



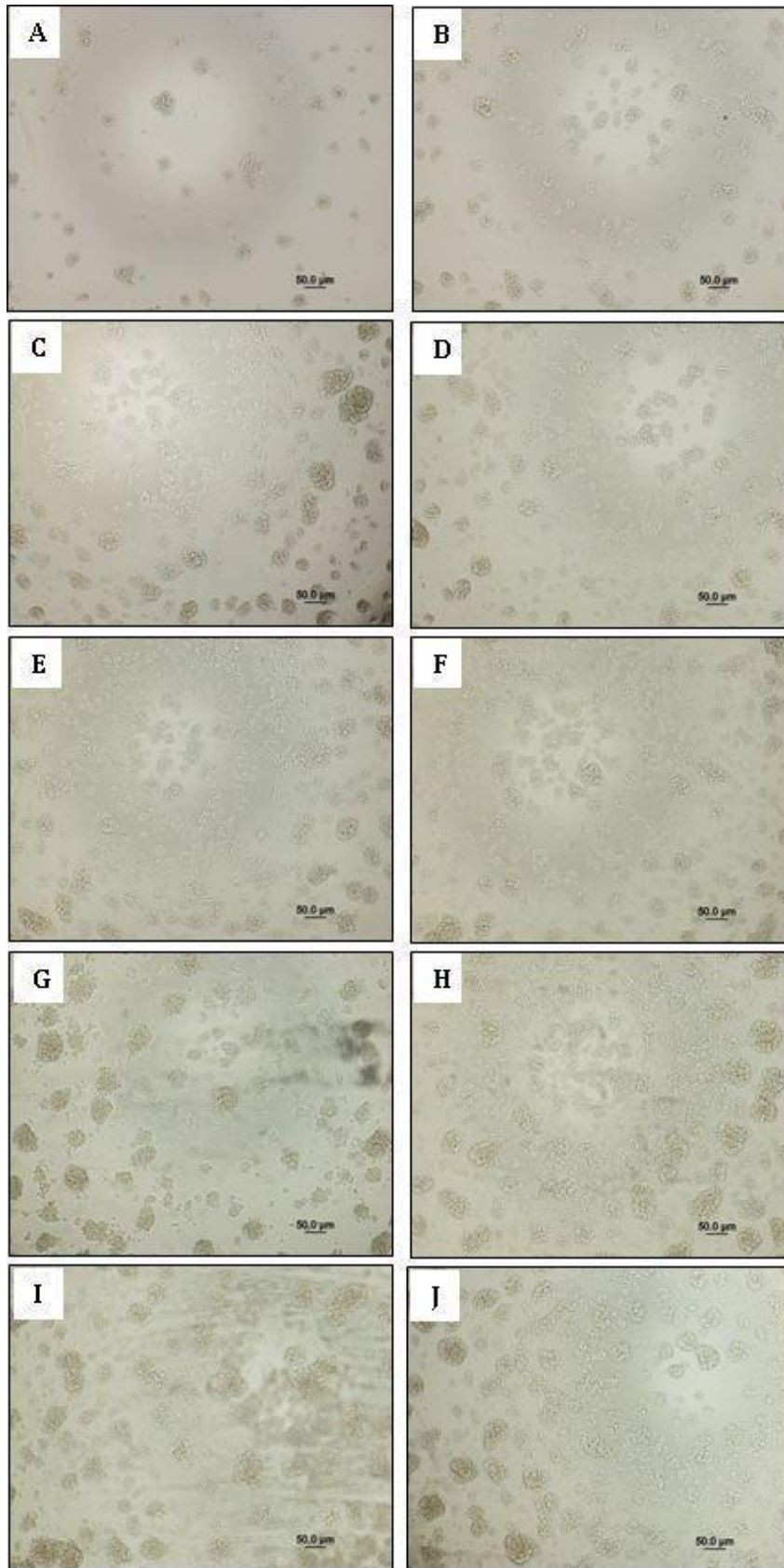
A) 1.000, B) 2.000, C) 3.000, D) 4.000, E) 5.000, F) 6.000, G) 7.000, H) 8.000, I) 9.000, e J) 10.000.

Figura 17. Quantidade de células/poço na linhagem celular MT-4



A) 1.000, B) 2.000, C) 3.000, D) 4.000, E) 5.000, F) 6.000, G) 7.000, H) 8.000, I) 9.000, e J) 10.000.

Figura 18. Quantidade de células/poço na linhagem celular C8166



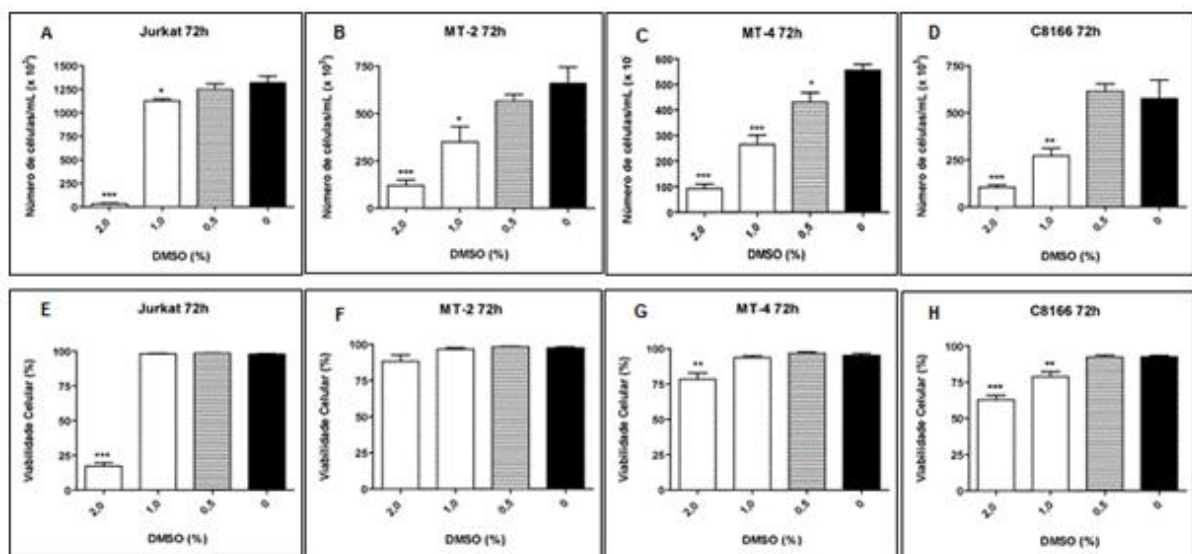
A) 1.000, B) 2.000, C) 3.000, D) 4.000, E) 5.000, F) 6.000, G) 7.000, H) 8.000, I) 9.000, e J) 10.000.

4.7 Definição de concentração de dimetilsulfóxido

Outro parâmetro a ser definido no ensaio baseado em célula no formato 384-poços foi a concentração de DMSO, uma vez que esse reagente é utilizado como veículo da maioria dos compostos testados. Portanto, diferentes concentrações de DMSO foram avaliadas a fim de obter a porcentagem de DMSO que não interfere no número e nem na viabilidade das células em cultivo. Após 72 h de cultivo das linhagens celulares, foram determinados o número absoluto de células e a porcentagem de células viáveis. Quanto ao crescimento celular, a concentração de 0,5 % de DMSO não comprometeu a proliferação das linhagens Jurkat, MT-2 e C8166, enquanto o mesmo efeito não foi observado na linhagem MT-4 (**Figura 19A - D**). No entanto, ao analisar a viabilidade celular, as máximas concentrações de DMSO toleradas pelas células foram: 1,0 % (Jurkat), 2,0 % (MT-2), 1,0 % (MT-4) e 0,5 % (C8166) (**Figura 19E - H**).

Apesar das linhagens celulares apresentarem uma alta porcentagem de viabilidade celular mesmo em concentrações superiores a 0,5 % de DMSO, para os ensaios desse estudo a concentração de 0,5 % foi adotada, uma vez que concentrações superiores a essa interferiram na proliferação celular.

Figura 19. Quantificação do número de células e viabilidade celular após 72 h de cultivo na presença de diferentes concentrações de DMSO



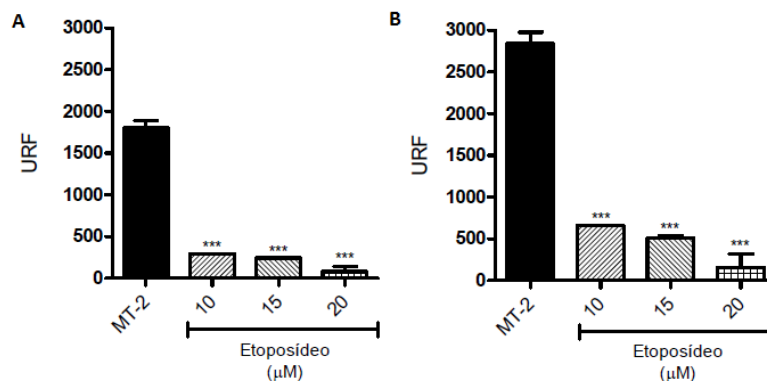
O crescimento celular foi avaliado a partir da contagem das células em câmara de Neubauer, e a viabilidade celular foi determinada a partir do método de exclusão por azul de Tripán. Os dados estão expressos como média \pm desvio-padrão da média; Teste estatístico: *One-way*

ANOVA com pós-teste Tukey; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação aos valores obtidos com o controle sem DMSO ($n = 05$).

4.8 Análise de atividade metabólica pelo método de resazurina

O método de redução metabólica da resazurina foi adotado na triagem primária dos compostos FCFRP e NIH. Para isso, primeiramente foram avaliadas três concentrações diferentes de ETO (controle de indução de apoptose e inibição de proliferação celular): 10, 15 e 20 μM de ETO. Nesse teste, foi utilizada apenas a linhagem MT-2. Após 4 h de incubação com a resazurina, foi observada uma drástica redução na unidade relativa de fluorescência (URF) das células incubadas com ETO em comparação às células sem tratamento (MT-2) (**Figura 20A**). O mesmo efeito ocorreu após 8 h de incubação com a resazurina (**Figura 20B**). Além disso, a concentração de 20 μM de ETO mostrou-se mais efetiva em relação às outras quantidades testadas. Todos os valores de URF foram subtraídos dos valores obtidos apenas com o meio de cultura.

Figura 20. Determinação da concentração de etoposídeo (ETO)

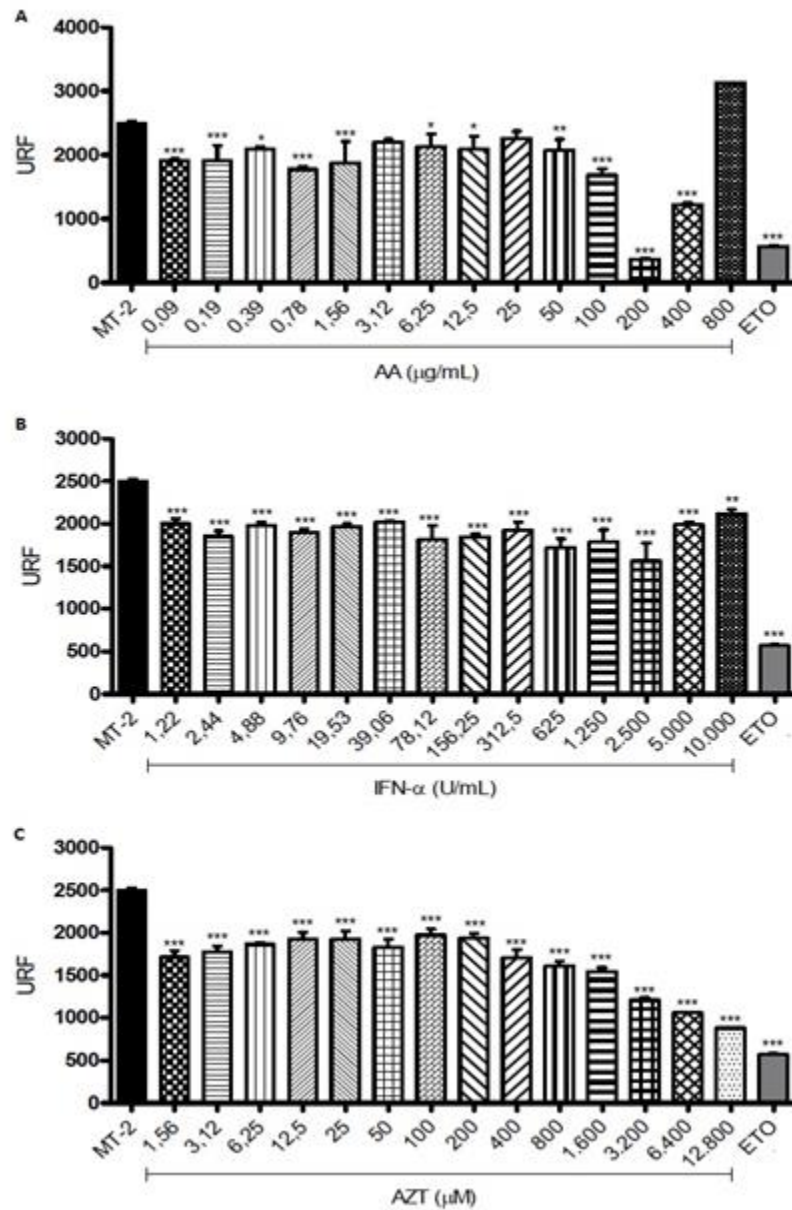


A linhagem MT-2 foi incubada com diferentes concentrações de ETO (10, 15 e 20 μM) por 72 h. Antes de completar esse período, as células foram mantidas com a solução de resazurina por 4 e 8 h. A análise da fluorescência emitida pelo corante foi realizada por fluorometria a 590 nm. Os dados estão expressos em unidades relativas de fluorescência (URF) como média \pm desvio-padrão da média; Teste estatístico: *One-way* ANOVA com pós-teste Tukey; *** $p < 0,001$ em relação aos valores obtidos com o controle (MT-2 com 0,5 % DMSO).

4.9 Definição de composto de referência/controle através de ensaio de curva dose-resposta (DRC)

Um ensaio de curva dose-resposta (DRC) foi realizado com a linhagem celular MT-2. Os compostos de referência a serem definidos foram diluídos de forma seriada 1:2 e para concentrações iniciais de 800 µg/mL (AA), 10.000 U/mL (IFN-α) e 12.800 µM (AZT). Todas as concentrações avaliadas exerceram um efeito significativo sobre a proliferação/viabilidade celular em relação às células sem tratamento (MT-2 0,5 % DMSO), à exceção de 800 µg/mL de AA (**Figura 21A – C**). Além disso, a concentração de 200 µg/mL de AA se manteve como a mais efetiva, uma vez que o aumento de AA não exerceu a mesma resposta (**Figura 21A**). Já com o aumento na concentração de AZT até 12.800 µM, ocorreu uma maior redução na atividade metabólica da MT-2 (**Figura 21C**), enquanto as diferentes concentrações de IFN-α promoveram respostas similares (**Figura 21B**).

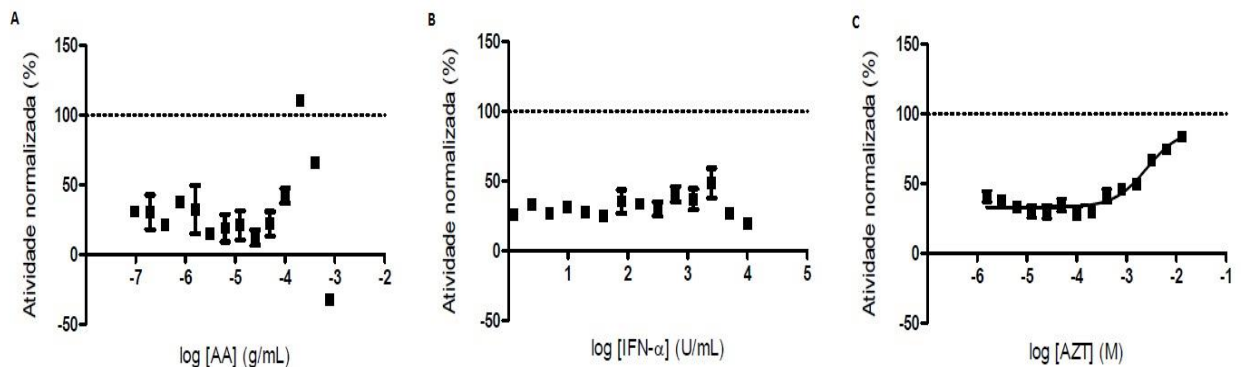
Figura 21. Atividade metabólica da linhagem MT-2 após tratamento com diferentes compostos de referência por 72 h



A linhagem celular MT-2 foi incubada com diferentes concentrações de: A) AA (concentração inicial: 800 µg/mL); B) IFN-α (concentração inicial: 10.000 U/mL); C) AZT (concentração inicial: 12.800 µM). Como controles foram adotados: ETO (20 µM) e célula infectada (MT-2 0,5 % DMSO). Antes de completar 72 h, as células foram incubadas com resazurina por 4 h, cuja fluorescência emitida foi analisada por fluorimetria a 590 nm. Os dados estão expressos em unidades relativas de fluorescência (URF) como média ± desvio-padrão da média; Teste estatístico: *One-way* ANOVA com pós-teste Tukey; * p < 0,05, ** p < 0,01, e *** p < 0,001 em relação aos valores obtidos com o controle (MT-2 0,5 % DMSO).

Os resultados obtidos foram normalizados utilizando a fórmula descrita no item 3.4.3 (**Figura 22**). Não foi possível obter os valores de EC_{50} de cada composto, exceto para o composto AZT que exerceu um efeito dose-dependente na MT-2 e cujo valor de EC_{50} foi 1 mM (**Figura 22A**). Nesse sentido, o composto AZT foi adotado como referência nos ensaios de triagem.

Figura 22. Curvas de dose-resposta (DRC) dos compostos ácido L-ascórbico (AA), IFN- α e zidovudina (AZT)



A linhagem celular MT-2 foi incubada com diferentes concentrações de AA (A), IFN- α (B) ou AZT (C) durante 72 h. Após esse período, foi avaliada a atividade metabólica por meio de ensaio com resazurina. Os valores obtidos e expressos em unidades relativas de fluorescência (URF) foram normalizados, conforme fórmula descrita no item 3.4.3. O eixo x indica o \log da concentração do composto de referência e o eixo y indica a porcentagem de atividade normalizada.

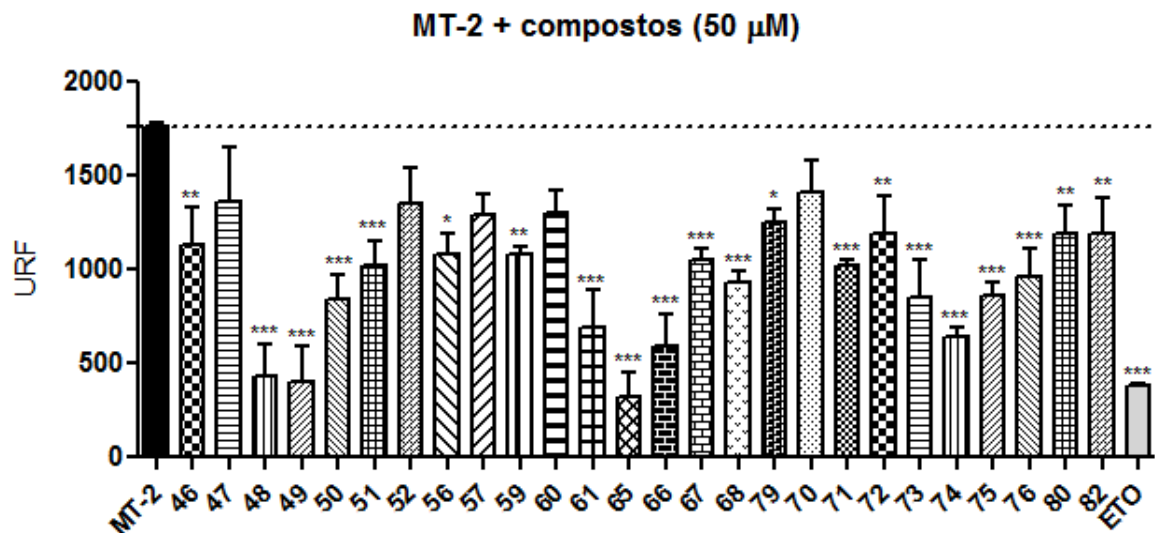
Parte III – Triagem de compostos

4.10 Triagem de compostos pelo método de resazurina

4.10.1 Compostos FCFRP

Foi realizada uma triagem com 26 derivados 1,2,3-triazólicos disponibilizados pela FCFRP (compostos FCFRP). Apenas a linhagem MT-2 foi adotada nos ensaios de atividade metabólica pelo método resazurina, cujo objetivo foi identificar compostos inibidores da proliferação celular. Nesse sentido, verificamos que a maioria dos compostos na concentração máxima de 50 μM foi capaz de interferir na atividade metabólica celular, assim como o controle ETO, quando comparado à linhagem MT-2 com 0,5 % de DMSO (controle) (**Figura 23**).

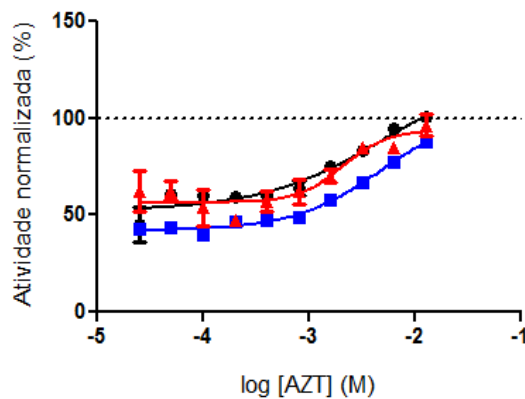
Figura 23. Atividade metabólica da linhagem MT-2 após tratamento com diferentes derivados 1,2,3-triazólicos (compostos FCFRP) na concentração de 50 μM durante 72h



Como controles, foram adotados: ETO (20 μM) e célula infectada com 0,5 % DMSO (MT-2). Antes de completar 72 h, as células foram incubadas com resazurina por 4 h, cuja fluorescência emitida foi analisada por fluorometria a 590 nm. Os dados estão expressos em unidades relativas de fluorescência (URF) como média \pm desvio-padrão da média; Teste estatístico: *One-way* ANOVA com pós-teste Tukey; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, e *** $p < 0,001$ em relação aos valores obtidos com o controle infectado (MT-2 + 0,5 % DMSO).

Para avaliar o efeito das demais concentrações dos compostos sobre a MT-2, os dados obtidos a partir da leitura de resazurina foram normalizados com o controle ETO, de acordo com a fórmula já estabelecida, e as curvas de dose-resposta foram geradas para determinação do EC₅₀. O mesmo foi realizado com o composto de referência AZT (**Figura 24**), cujo valor médio de EC₅₀ foi $0,74 \pm 1,51$ mM.

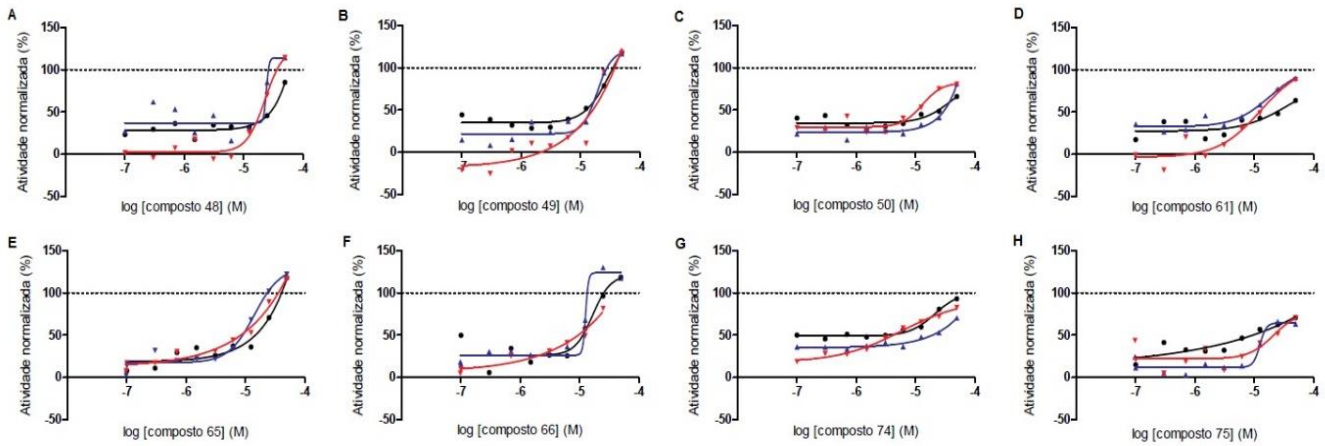
Figura 24. Curvas de dose-resposta (DRC) do composto de referência AZT na linhagem MT-2



A normalização é referente aos valores de MT-2 incubada com ETO. O eixo x indica o *log* da concentração do composto de referência e o eixo y indica a porcentagem de atividade normalizada.

Dentre os 26 derivados 1,2,3-triazólicos avaliados, apenas os compostos **48**, **49**, **50**, **61**, **65**, **66**, **74** e **75** apresentaram curvas dose-resposta mais distribuídas e com tendência a um efeito dose-dependente, o que possibilitou o cálculo do EC₅₀ por meio do *software GraphPad Prism versão 05* (**Figura 25 A-H**). Tais compostos também apresentaram atividade ≥ 70 % na maior concentração testada. Além disso, para analisar a qualidade dos ensaios de triagem, o coeficiente de variação (CV) dos controles DMSO e ETO, e o *Z-factor* foram calculados (**Tabela 7**). Nesse sentido, verificou-se uma pequena variabilidade entre os ensaios devido ao baixo valor médio do CV, e também, a triagem apresentou um *Z-factor* satisfatório (≥ 5).

Figura 25. Curvas de dose-resposta (DRC) dos compostos 48 (A), 49 (B), 50 (C), 61 (D), 65 (E), 66 (F), 74 (G) e 75 (H) na linhagem MT-2



A normalização é referente aos valores de MT-2 incubada com ETO. O eixo x indica o *log* da concentração do composto e o eixo y indica a porcentagem de atividade normalizada. Cada curva representa um ensaio.

Tabela 7. Cálculo de coeficiente de variação (CV) e *Z-factor* na triagem de compostos FCFRP.

Triagem de compostos FCFRP		
	<i>Média</i>	<i>Desvio-padrão</i>
<i>CV (MT-2 + 0,5 % DMSO)</i>	0,12	0,03
<i>CV (MT-2 + ETO)</i>	0,14	0,03
<i>Z-factor</i>	0,50	0,13

Os valores de EC_{50} (média e desvio-padrão) estão exibidos na **tabela 8**, sendo que foram considerados os dados obtidos dos ensaios cuja atividade foi $\geq 70\%$. Além disso, ao analisar as propriedades físico-químicas desses compostos selecionados, foi possível constatar que todos apresentam potencial à fármaco, uma vez que seguem os critérios de *Lipinski* (Regra dos 5): i) massa molecular ≤ 500 daltons; ii) número de átomos doadores de ligação de hidrogênio ≤ 5 ; iii) número de átomos receptores de ligação de hidrogênio ≤ 10 ; iv) coeficiente de partição octanol/água ≤ 5 .

Tabela 8. Média e desvio-padrão do EC₅₀ dos compostos **48, 49, 50, 61, 65, 66, 74 e 75.**

Composto	EC₅₀ (média ± desvio-padrão)
48	23,33 ± 5,77 µM
49	13,33 ± 5,77 µM
50	20,00 ± 10,00 µM
61	13,33 ± 5,77 µM
65	10,0 ± 0,0 µM
66	10,0 ± 0,0 µM
74	9,11 ± 9,45 µM
75	13,33 ± 5,77 µM

4.10.2 Compostos NIH

Além da triagem dos 26 derivados 1,2,3-triazólicos (compostos FCFRP), foi realizada uma triagem com os 707 compostos NIH através de ensaio por resazurina utilizando a linhagem celular MT-2. Devido ao maior número de compostos a serem testados, a triagem primária consistiu em dois ensaios independentes, ou seja, em dois dias, e tais compostos foram avaliados em concentração única (5 µM). Para cada ensaio foram utilizadas cinco placas: i) placa 01 DRC AZT; ii) placa 02 0,5 % DMSO; iii) placa 03 NIH 01; iv) placa 04 NIH 02; v) placa 05 NIH 3 + DRC AZT.

A partir dos valores de URF obtidos com a leitura de resazurina, foram calculados o CV dos controles (DMSO e ETO) e o *Z-factor* em cada placa, exceto na placa 02, na qual foram plaqueadas apenas células com DMSO. Em ambos os ensaios e em todas as placas analisadas, foram obtidos valores baixos de CV e o *Z-factor* foi $\geq 0,5$ (**Tabelas 9 e 10**).

Como critério de seleção dos *hits* (compostos ativos) nessa triagem primária, foram selecionados os compostos que apresentaram atividade normalizada ≥ 50 %, sendo que nos ensaios 01 e 02 foi obtido um total de 39 e 32 *hits*, respectivamente (**Tabelas 9 e 10**). Todavia, para a seleção final, foram considerados os *hits* comuns em ambos os ensaios, além daqueles cuja atividade foi próxima a 50 % em um dos dois ensaios. Portanto, foram selecionados 34 *hits* para a próxima etapa de triagem, sendo a taxa de seleção de *hits* 4,8 %.

Tabela 9. Cálculo de coeficiente de variação (CV) e *Z-factor* na triagem de compostos NIH (ensaio 01).

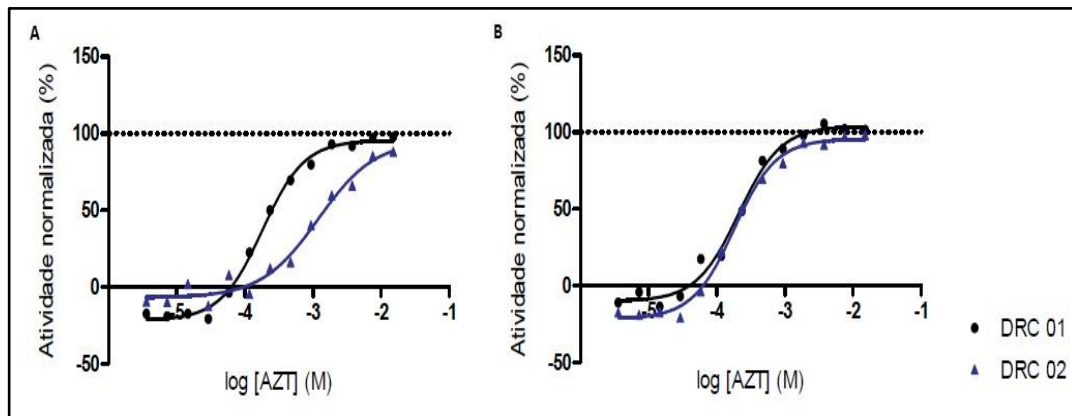
Triagem primária de compostos NIH (ensaio 01)					
	<i>Placa 01</i>	<i>Placa 02</i>	<i>Placa 03</i>	<i>Placa 04</i>	<i>Placa 05</i>
<i>CV (MT-2 + 0,5 % DMSO)</i>	0,07	0,08	0,06	0,05	0,07
<i>CV (MT-2 + ETO)</i>	0,09	-	0,13	0,10	0,30
<i>Z-factor</i>	0,72	-	0,72	0,75	0,54
<i>Número de hits</i>	-	-	15	21	03

Tabela 100. Cálculo de coeficiente de variação (CV) e *Z-factor* na triagem de compostos NIH (ensaio 02).

Triagem primária de compostos NIH (ensaio 02)					
	<i>Placa 01</i>	<i>Placa 02</i>	<i>Placa 03</i>	<i>Placa 04</i>	<i>Placa 05</i>
<i>CV (MT-2 + 0,5 % DMSO)</i>	0,07	0,09	0,06	0,09	0,06
<i>CV (MT-2 + ETO)</i>	0,10	-	0,07	0,06	0,25
<i>Z-factor</i>	0,63	-	0,65	0,52	0,55
<i>Número de hits</i>	-	-	14	15	03

Também foi calculada a média do EC₅₀ do AZT em cada ensaio: 1,25 ± 0,30 mM (ensaio 01, **figura 26A**) e 0,24 ± 0,01 mM (ensaio 02, **figura 26B**). Os gráficos de DRC estão exibidos na **figura 26**.

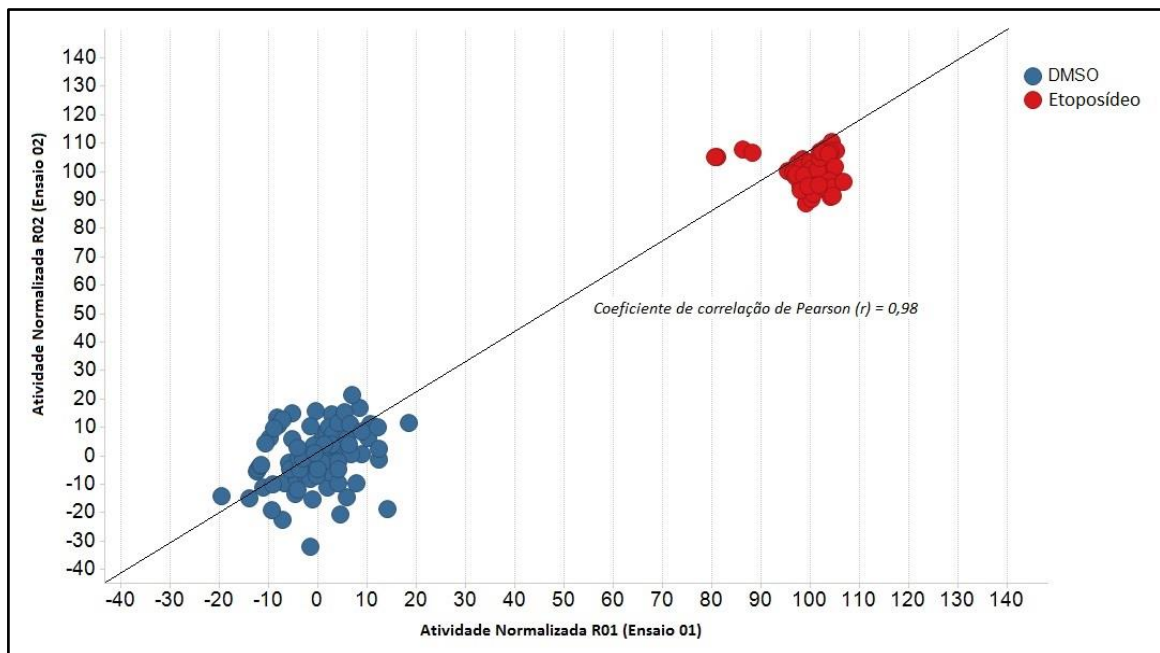
Figura 26. Curvas de dose-resposta (DRC) do composto de referência AZT na linhagem MT-2



A normalização é referente aos valores de MT-2 incubada com ETO. Os gráficos são referentes às DRC do composto AZT nos ensaios de triagem 01 (A) e 02 (B). O eixo x indica o *log* da concentração do composto de referência e o eixo y indica a porcentagem de atividade normalizada. A DRC 01 referente à placa 01 está representada pela linha preta, e a DRC 02 da placa 02, em azul.

Outra abordagem adotada para avaliar a qualidade dos ensaios foi o cálculo de coeficiente de correlação de Pearson, uma vez que foram utilizadas cinco placas por ensaio. Para os valores de atividade normalizada dos controles DMSO e ETO nos ensaios 01 (R01) e 02 (R02), obteve-se um coeficiente de correlação igual a 0,98 (**Figura 27**). Enquanto para a análise de todos os resultados, incluindo os controles, o coeficiente de correlação obtido foi 0,85 (**Figura 28**).

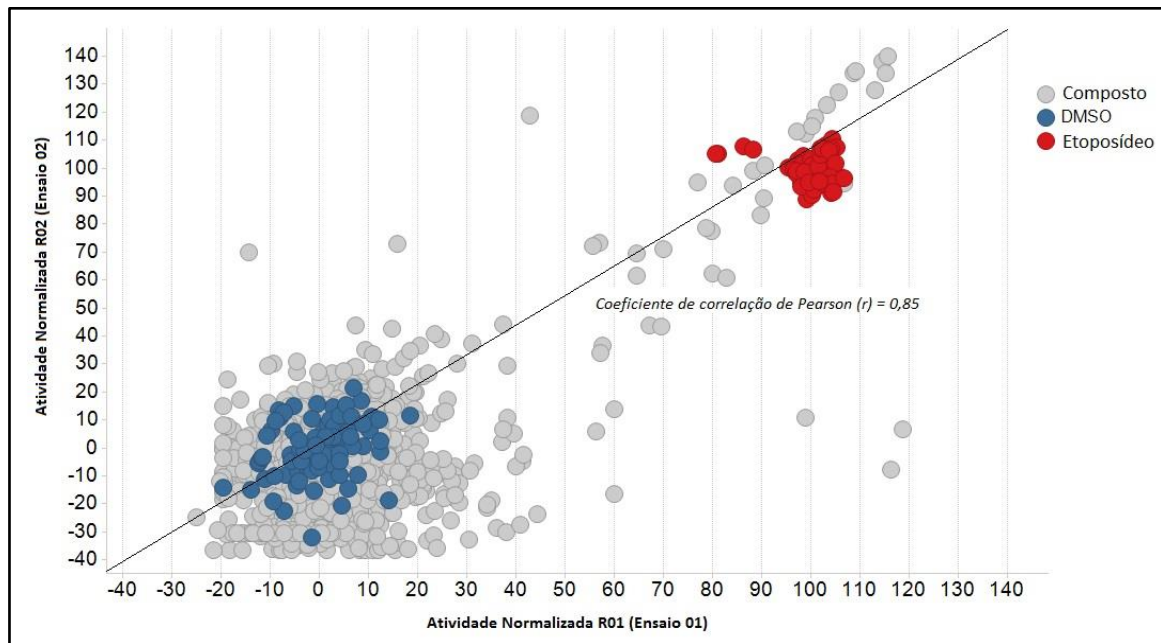
Figura 27. Análise de correlação dos valores de atividade normalizada dos controles (DMSO e ETO) entre os ensaios de triagem 01 e 02



O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado através do *software Microsoft Excel* e o gráfico foi gerado por meio do *software TIBCO Spotfire*.

Na próxima etapa de triagem, os compostos selecionados (*hits*) foram avaliados por meio de ensaios de DRC em dias diferentes (ensaios 01 e 02). Da mesma forma, foram calculados o CV e *Z-factor*, cujos valores obtidos estão exibidos na **tabela 11**. O CV dos controles em todas as placas de ambos ensaios foi considerado baixo e o *Z-factor* foi $\geq 0,5$, exceto na placa 01 do segundo ensaio. O EC_{50} do composto de referência AZT também foi calculado para ambos os ensaios: $0,38 \pm 0,08$ mM (**Figura 29**).

Figura 28. Análise de correlação dos valores de atividade normalizada dos controles (DMSO e ETO) e compostos entre os ensaios de triagem 01 e 02

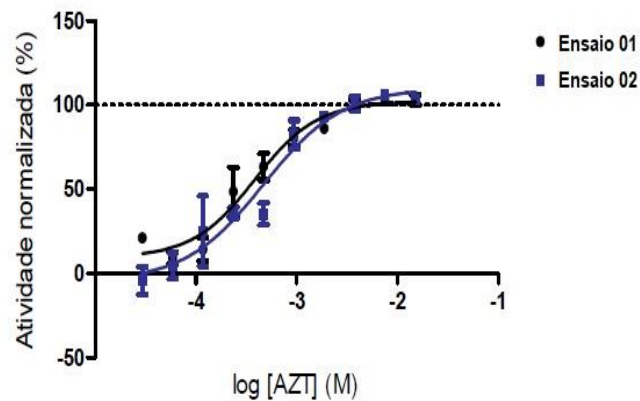


O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado através do *software Microsoft Excel* e o gráfico foi gerado por meio do *software TIBCO Spotfire*.

Tabela 11. Cálculo de coeficiente de variação (CV) e *Z-factor* na triagem por meio de ensaio de curva dose-resposta (DRC) dos compostos NIH.

Ensaio de DRC dos compostos NIH				
	<i>Ensaio 01</i>		<i>Ensaio 02</i>	
	<i>Placa 01</i>	<i>Placa 02</i>	<i>Placa 01</i>	<i>Placa 02</i>
<i>CV (MT-2 + 0,5 % DMSO)</i>	0,09	0,09	0,16	0,09
<i>CV (MT-2 + ETO)</i>	0,09	0,09	0,14	0,15
<i>Z-factor</i>	0,57	0,5	0,33	0,55

Figura 29. Curvas de dose-resposta (DRC) do composto de referência AZT na linhagem MT-2

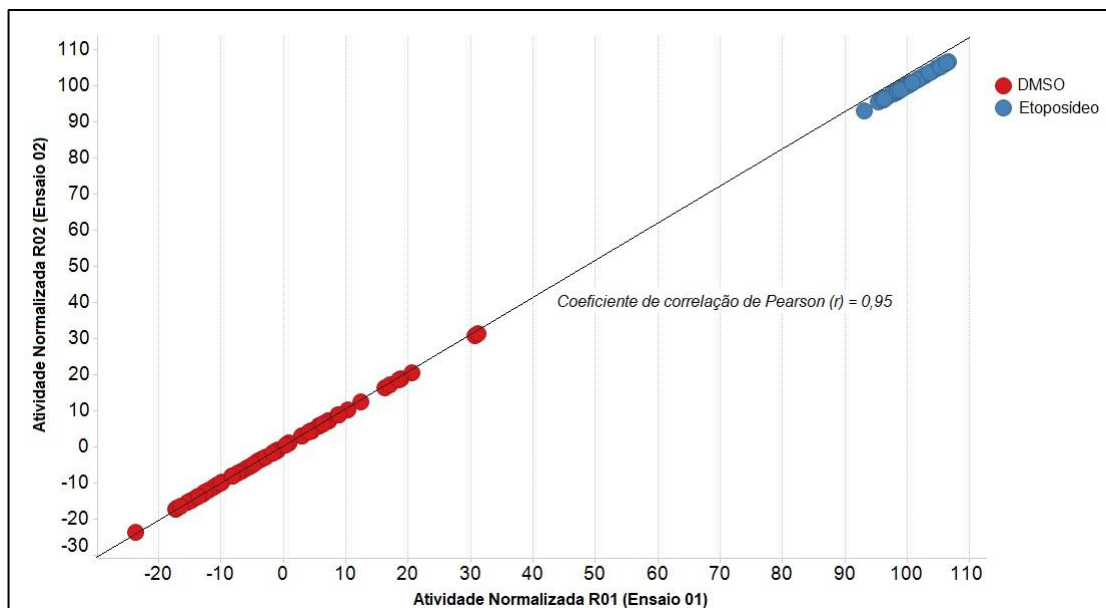


A normalização é referente aos valores de MT-2 incubada com ETO. O eixo x indica o *log* da concentração do composto de referência e o eixo y indica a porcentagem de atividade normalizada. O ensaio 01 está representado pela curva na cor preta, e o ensaio 02, em azul.

Similarmente à triagem primária, também foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson nos ensaios de DRC dos compostos NIH a fim de avaliar a qualidade dos ensaios. Foi obtido um valor de coeficiente de correlação igual a 0,95 para os controles DMSO e ETO dos ensaios 01 e 02 (**Figura 30**). Já na análise total, obteve-se um coeficiente de correlação igual a 0,82 (**Figura 31**).

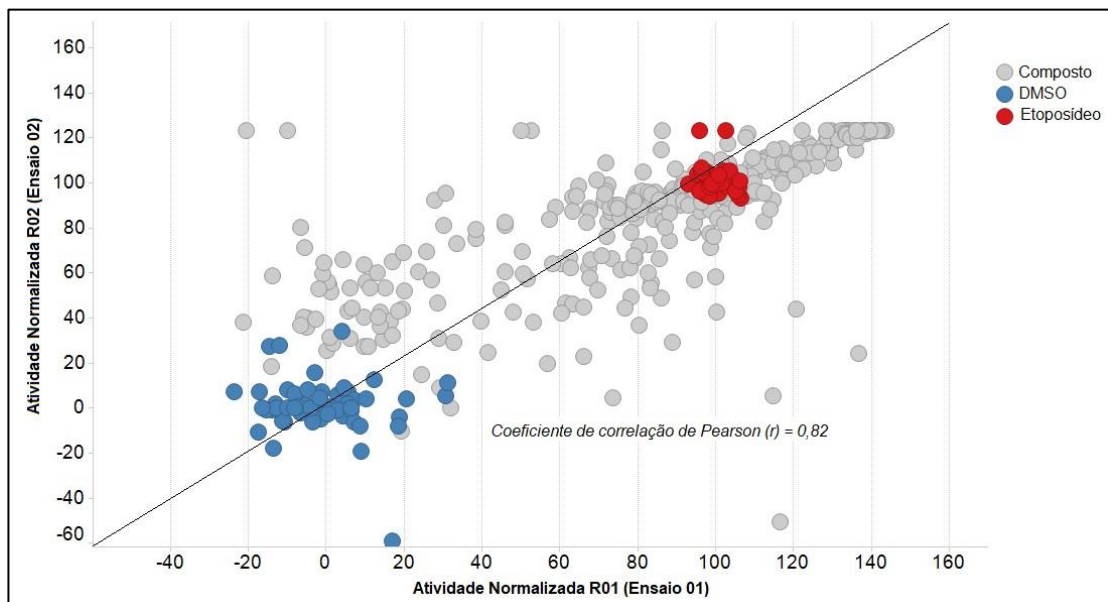
Em relação às curvas DRC dos compostos NIH selecionados (*hits*), foi possível constatar que apenas 05 compostos apresentaram uma atividade efetiva sobre a MT-2, ou seja, tais compostos foram capazes de interferir no crescimento celular (**Figura 32**). Ao consultar a composição da biblioteca NIH, verificou-se que os compostos ativos identificados na triagem foram: i) dissulfiram; ii) citarabina; iii) clorambucil; iv) cladribina; e v) bromidrato de galantamina. Além disso, a **tabela 12** exibe a média e o desvio-padrão dos valores de EC_{50} obtidos para esses compostos em ambos ensaios.

Figura 30. Análise de correlação dos valores de atividade normalizada dos controles (DMSO e ETO) entre os ensaios de curva dose-resposta (DRC) 01 e 02



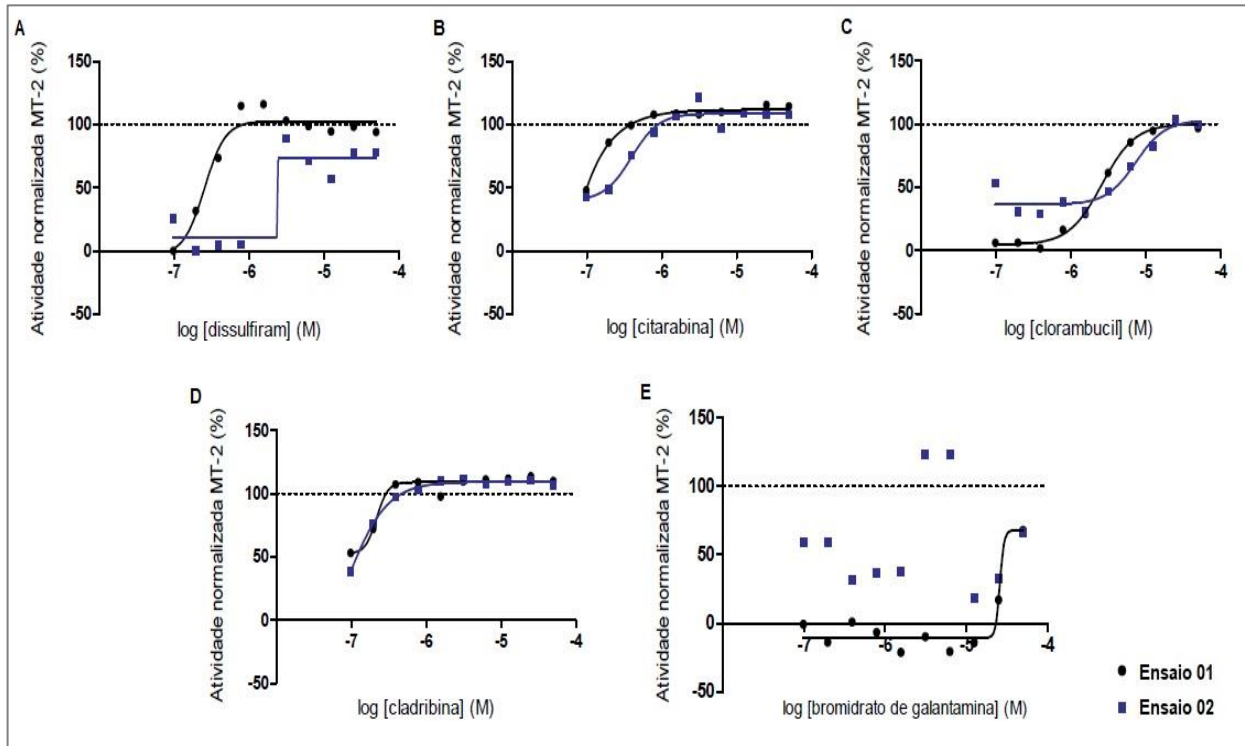
O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado através do *software Microsoft Excel* e o gráfico foi gerado por meio do *software TIBCO Spotfire*.

Figura 31. Análise de correlação dos valores de atividade normalizada dos controles (DMSO e ETO) e compostos entre os ensaios de curva dose-resposta (DRC) 01 e 02



O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado através do *software Microsoft Excel* e o gráfico foi gerado por meio do *software TIBCO Spotfire*.

Figura 32. Curvas de dose-resposta (DRC) dos compostos NIH dissulfiram (A), citarabina (B), clorambucil (C), cladribina (D) e bromidrato de galantamina (E) na linhagem MT-2



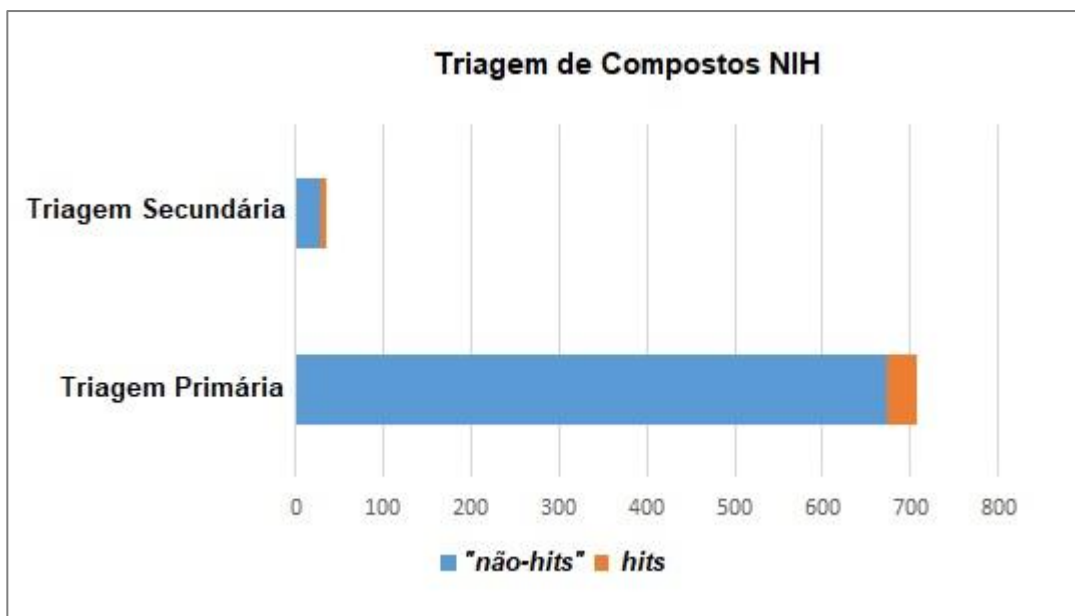
A normalização é referente aos valores de MT-2 incubada com ETO. O eixo x indica o \log da concentração do composto e o eixo y indica a porcentagem de atividade normalizada. O ensaio 01 está representado pela curva na cor preta, e o ensaio 02, em azul.

Tabela 12. Média e desvio-padrão do EC_{50} dos compostos NIH (*hits*).

Composto	EC_{50} (média \pm desvio-padrão)
<i>Dissulfiram</i>	0,26 \pm 0,0 μ M
<i>Citarabina</i>	0,15 \pm 0,06 μ M
<i>Clorambucil</i>	3,0 \pm 1,41 μ M
<i>Cladribina</i>	0,12 \pm 0,0 μ M
<i>Bromidrato de galantamina</i>	28 \pm 0,0 μ M

Portanto, a triagem primária dos 707 compostos NIH permitiu a seleção de 34 *hits*, os quais foram testados em ensaios de DRC (triagem secundária). Dentre os 34 compostos avaliados, apenas cinco deles foram confirmados como *hits* (**Figura 33**).

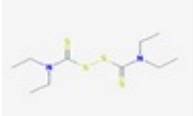
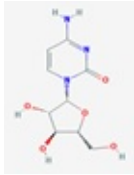
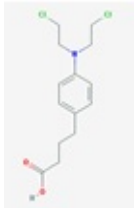
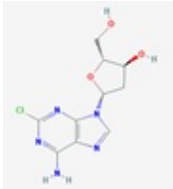
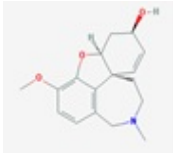
Figura 33. Taxa de obtenção de *hits* nas triagens primária e secundária



A partir de 707 compostos NIH, 34 *hits* foram selecionados para a triagem secundária. Em seguida, dentre os 34 compostos testados em ensaio de DRC (triagem secundária), cinco foram considerados mais efetivos. *Hits*: compostos ativos; "não-hits": compostos sem atividade.

Por fim, algumas informações referentes a cada um dos cinco compostos (dissulfiram, citarabina, clorambucil, cladribina e bromidrato de galantamina), foram obtidas a partir do banco de dados "PubChem Open Chemistry Database" (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), tais como: massa molar, fórmula molecular, estrutura química, classe e indicação terapêutica (**Tabela 13**). Os compostos da biblioteca NIH já são compostos aprovados para uso clínico pelo FDA, sendo que o dissulfiram é empregado no tratamento de etilismo crônico, a citarabina, clorambucil e cladribina são agentes antineoplásicos para terapia de alguns tipos de leucemia e linfoma, enquanto o bromidrato de galantamina é utilizado no tratamento da doença de Alzheimer.

Tabela 13. Propriedades químicas e biológicas dos compostos NIH selecionados.

Compostos NIH					
Nome do composto	Massa molar (g/mol)	Fórmula molecular	Estrutura química	Classe	Indicação terapêutica
<i>Dissulfiram</i>	296,524	C ₁₀ H ₂₀ N ₂ S ₄		Agente que interfere no metabolismo do álcool	Tratamento de etilismo crônico
<i>Citarabina</i>	243,219	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₅		Agente antineoplásico	Tratamento de leucemia não-linfocítica aguda, leucemia linfocítica aguda e leucemia mielocítica crônica
<i>Clorambucil</i>	304,211	C ₁₄ H ₁₉ Cl ₂ NO ₂		Agente antineoplásico	Tratamento de leucemia linfocítica crônica e linfomas, incluindo linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin
<i>Cladribina</i>	285,688	C ₁₀ H ₁₂ ClN ₅ O ₃		Agente antineoplásico	Tratamento de leucemia de células pilosas
<i>Bromidrato de galantamina</i>	287,359	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃		Agente para doença de Alzheimer	Inibidor de acetilcolinesterase utilizado no tratamento da doença de Alzheimer

Parte IV – Validação da atividade de compostos

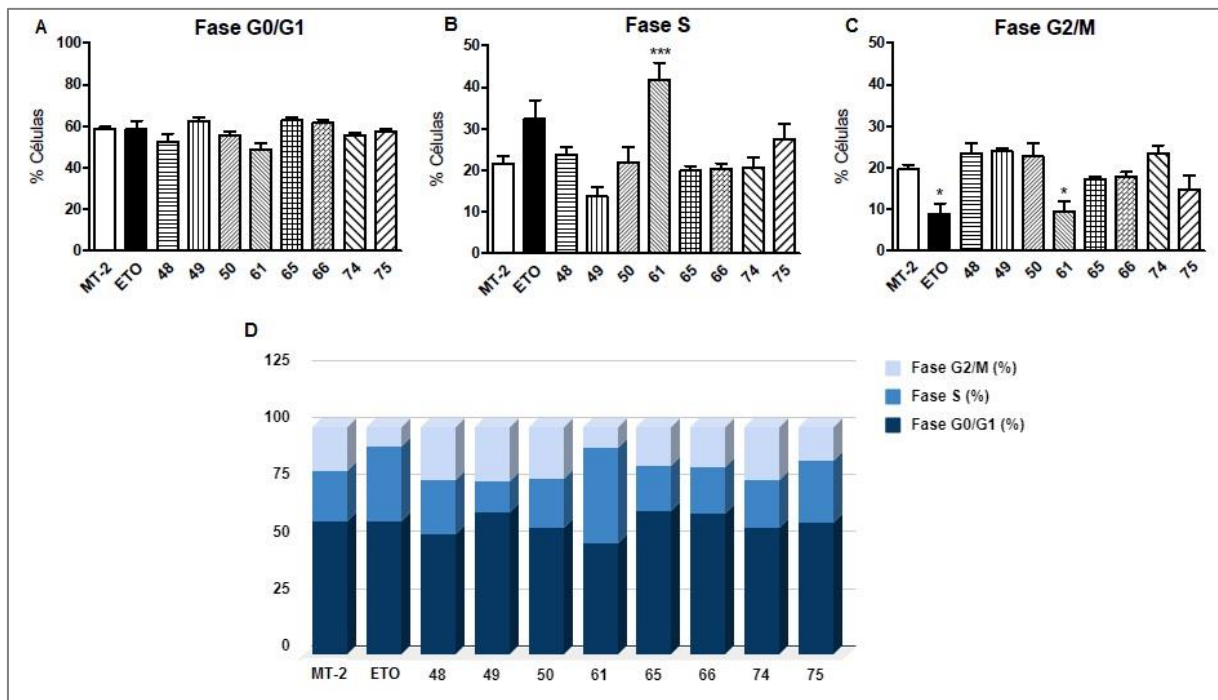
4.11 Validação dos compostos

4.11.1 Identificação de compostos inibidores de proliferação celular

Uma vez que o ensaio de resazurina (análise de atividade metabólica) não é capaz de discriminar uma inibição de proliferação celular de um efeito citotóxico, a próxima etapa foi validar os compostos previamente selecionados após a triagem com resazurina. Para isso, foram realizados três ensaios (n = 02) para análise do efeito dos compostos sobre o ciclo celular da MT-2 (**Figura 34**). Dessa forma, constatou-se que o composto 61 induziu um acúmulo de células na fase S, ou seja, uma parada nessa fase do ciclo celular, em comparação às células incubadas apenas com o veículo DMSO (**Figura 34B**). Conseqüentemente, houve uma menor porcentagem de células na fase G2/M (**Figura 34C**). Tal efeito foi similar ao provocado pelo controle positivo ETO, um inibidor da enzima topoisomerase II, que compromete a proliferação celular.

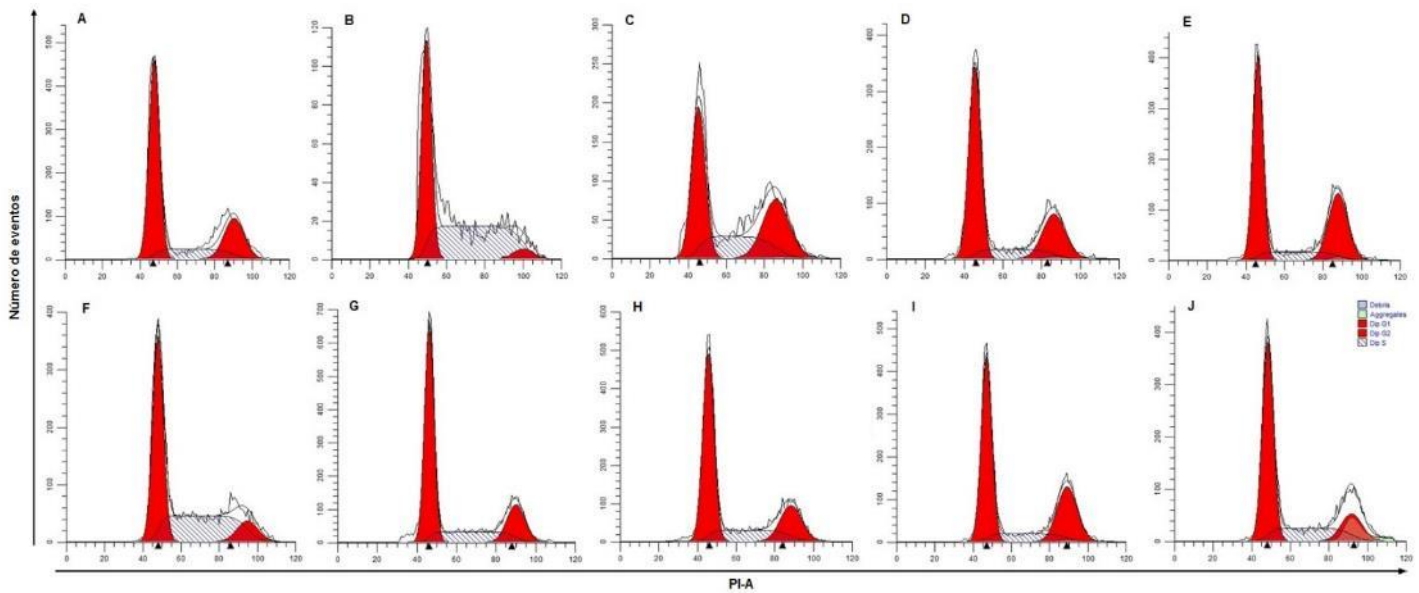
Para fins comparativos, foi construído um gráfico para evidenciar a proporção de células em cada uma das fases do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M) (**Figura 34D**). Assim, em relação ao controle DMSO, foi possível observar uma alteração na distribuição de células entre as diferentes fases do ciclo celular quando as mesmas foram cultivadas na presença do composto **61**. As análises representativas de um experimento estão exibidas na **figura 35**. Tais análises foram realizadas através do *software ModFit LT 5.0*.

Figura 34. Efeito de diferentes derivados 1,2,3-triazólicos (compostos FCFRP) sobre o ciclo celular da linhagem MT-2



Compostos na concentração de 50 μM foram incubados com 3×10^5 células (MT-2) por 72 h. Após esse período, as células foram coletadas para análise do ciclo celular por citometria de fluxo a partir da marcação com IP. Um total de 10.000 eventos foi adquirido, sendo que os gráficos exibem a porcentagem de células nas fases G0/G1 (A), S (B) e G2/M (C) como média \pm desvio-padrão da média. Teste estatístico: *One-way* ANOVA com pós-teste Tukey; * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ em relação aos valores obtidos com o controle DMSO. O gráfico D exhibe a comparação da proporção de células nas diferentes fases do ciclo celular.

Figura 35. Análises representativas do ciclo celular da MT-2 por citometria de fluxo



Condições: (A) controle DMSO, (B) etoposídeo, (C) composto **48**, (D) composto **49**, (E) composto **50**, (F) composto **61**, (G) composto **65**, (H) composto **66**, (I) composto **74** e (J) composto **75**. A análise do ciclo celular foi realizada através do *software ModFit LT 5.0*.

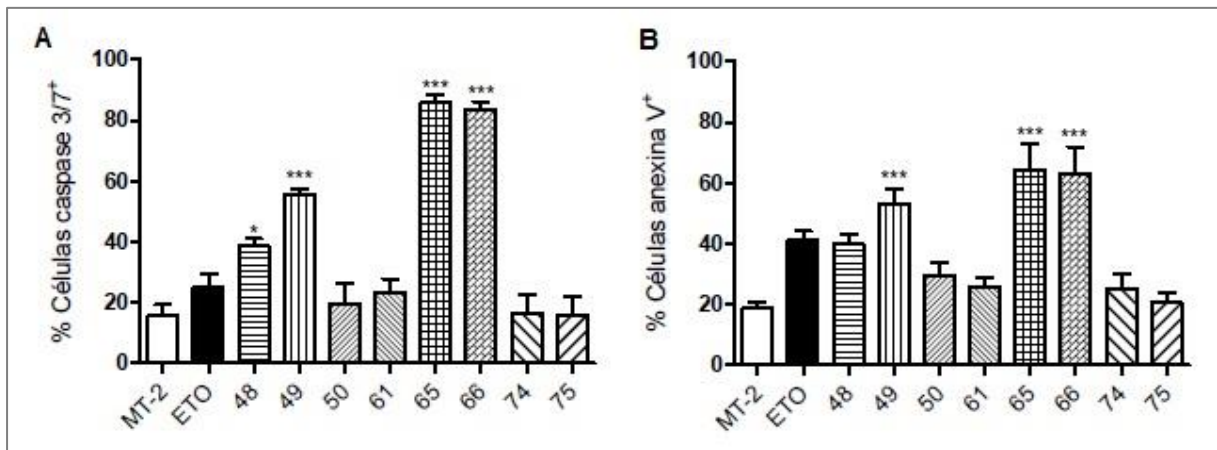
4.11.2 Identificação de compostos indutores de apoptose

A partir dos compostos selecionados pela triagem com resazurina, também foi realizada a etapa de validação para identificar indutores de apoptose, já que uma inibição da atividade metabólica não discrimina uma indução da morte celular por apoptose da morte decorrente do efeito citotóxico do composto. Portanto, foram realizados três ensaios ($n = 02$) com os compostos selecionados, para avaliar a capacidade de indução de apoptose da MT-2 através da ativação de caspases-3/7 efectoras. Quando a célula possui as caspases-3/7 ativas, tais enzimas são capazes de agir sobre o reagente *CellEvent Caspase-3/7 Green*, que consiste num peptídeo cuja sequência é o sítio de clivagem das caspases-3/7. Como esse peptídeo está conjugado a um corante intercalante de DNA, ao sofrer a clivagem na presença de caspases ativas, o corante ligado ao DNA é capaz de emitir fluorescência no comprimento de onda ~ 530 nm (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C10423> Acesso em 10/10/2017).

Então, observou-se que os compostos **48**, **49**, **65** e **66** induziram uma maior quantidade relativa de células apoptóticas, uma vez que foram detectadas mais

células positivas para caspase-3/7 ativa em relação ao controle DMSO (**Figura 36A**). De maneira correspondente, ao analisar a marcação para anexina-V, houve uma maior porcentagem de células apoptóticas após cultivo na presença dos mesmos compostos (**48, 49, 65 e 66**) (**Figura 36B**). Porém, o aumento de apoptose induzido pelo composto **48** na linhagem MT-2 não resultou em diferença estatística (média \pm desvio-padrão: $41,80 \pm 8,93$ vs. $13,99 \pm 1,62$, composto **48** e controle DMSO, respectivamente).

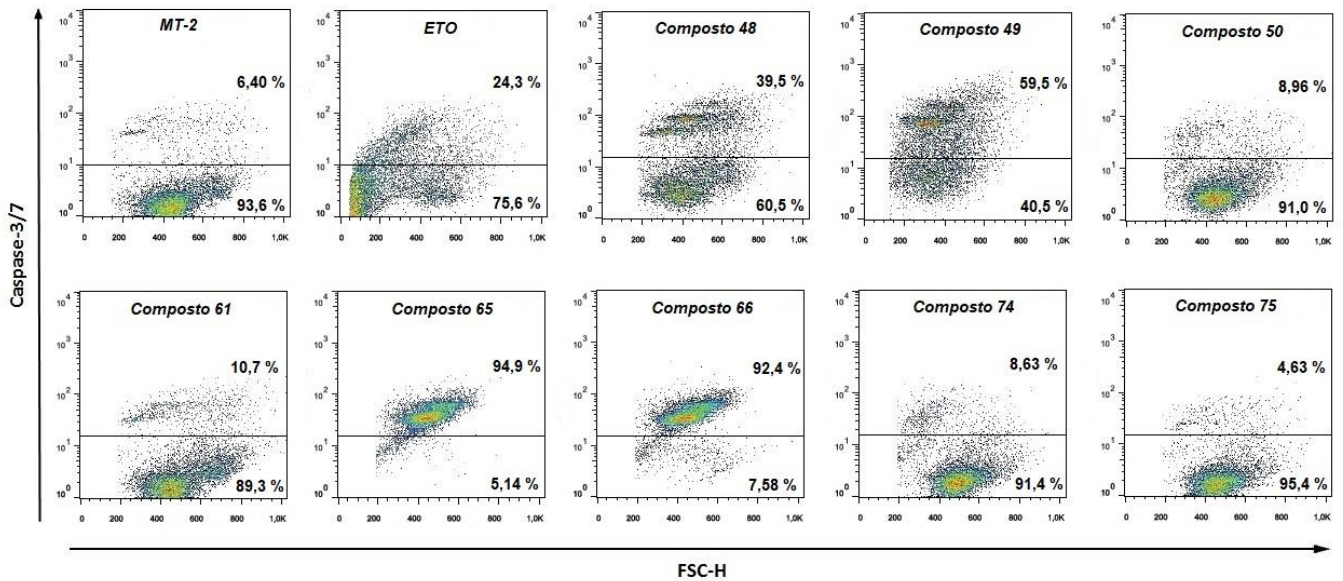
Figura 36. Efeito de diferentes derivados 1,2,3-triazólicos (compostos FCFRP) sobre a apoptose da linhagem MT-2



Compostos na concentração de $50 \mu\text{M}$ foram incubados com 3×10^5 células (MT-2) por 72 h. Após esse período, as células foram incubadas com o reagente *CellEvent Caspase-3/7 Green* durante 45 minutos para avaliar a porcentagem de células com caspase-3/7 ativa por citometria de fluxo (A). Em seguida, foi realizada a marcação com Anexina-V Cy5 para análise da externalização da fosfatidilserina (apoptose inicial e tardia) (B). Os gráficos exibem a porcentagem de células como média \pm desvio-padrão da média. Teste estatístico: *One-way ANOVA* com pós-teste Tukey; *** $p < 0,001$ em relação aos valores obtidos com o controle DMSO.

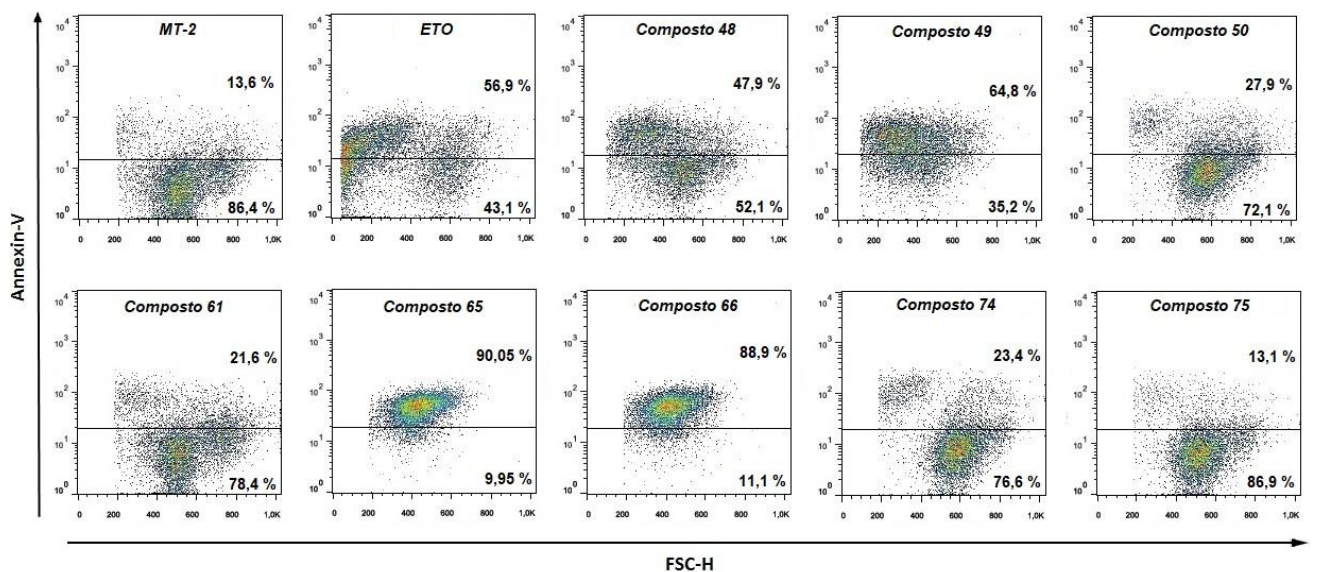
As análises de citometria de fluxo foram realizadas através do software *FlowJo v10*. Os gráficos de *dot plot* representativos de um experimento de caspase 3/7 e anexina-V estão exibidos nas **figuras 37 e 38**, respectivamente. Em ambas, é possível observar nos *dot plots* as populações de células apoptóticas decorrentes do cultivo com os compostos **48, 49, 65** ou **66**.

Figura 37. Análise de ativação de caspase-3/7 na linhagem MT-2 após incubação com diferentes derivados 1,2,3-triazólicos (compostos FCFRP) por citometria de fluxo



Um total de 10.000 eventos foi adquirido por citometria de fluxo (BD FACSCalibur™). Para análise, através do *software FlowJo v10*, foi realizado um *gate* de acordo com tamanho (FSC) e complexidade interna (SSC) da população, seguida pela determinação da porcentagem de células positivas para caspase-3/7 a partir de *dot plot*. Nessa figura, estão exibidas as análises representativas de um experimento.

Figura 38. Análise de marcação de anexina-V na linhagem MT-2 após incubação com diferentes derivados 1,2,3-triazólicos (compostos FCFRP) por citometria de fluxo



Um total de 10.000 eventos foi adquirido por citometria de fluxo (BD FACSCalibur™). Para análise, através do *software FlowJo v10*, um *gate* de acordo com tamanho (FSC) e

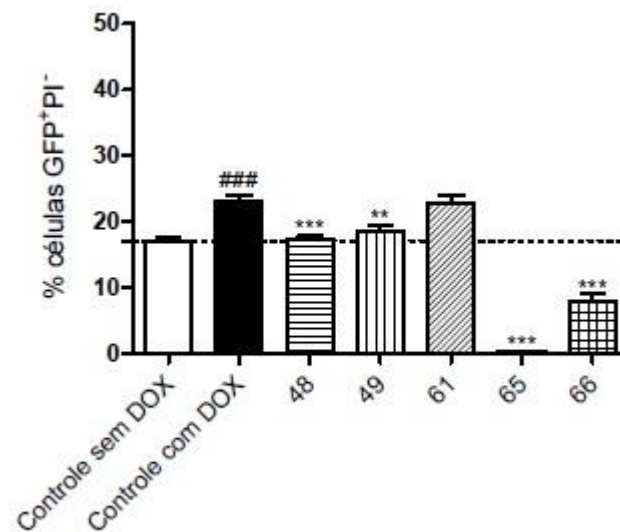
complexidade interna (SSC) da população foi realizado, seguida pela determinação da porcentagem de células positivas para anexina-V Cy5 (apoptose inicial e tardia). Nessa figura, estão exibidas as análises representativas de um experimento.

4.11.3 Identificação de compostos inibidores de expressão de *tax* e/ou transativação viral

Após a identificação de compostos que interferem na proliferação celular e apoptose da linhagem celular MT-2, a próxima etapa foi avaliar se também há algum composto com potencial atividade inibidora sobre a expressão de *tax* e/ou transativação do LTR, uma vez que *Tax* está envolvida no crescimento celular e apoptose durante a infecção pelo HTLV-1. Para isso, foi avaliado o efeito dos compostos **48**, **49**, **61**, **65** e **66** sobre a expressão de GFP na linhagem Jurkat LTR-GFP *inducible-tax*. Na presença dos compostos **48** e **49**, detectou-se uma menor porcentagem de células viáveis expressando GFP quando comparado ao controle com DOX (Jurkat LTR-GFP *inducible-tax* + DOX) (**Figuras 39 e 40**). Essa quantidade relativa de células GFP⁺ foi similar ao controle sem DOX.

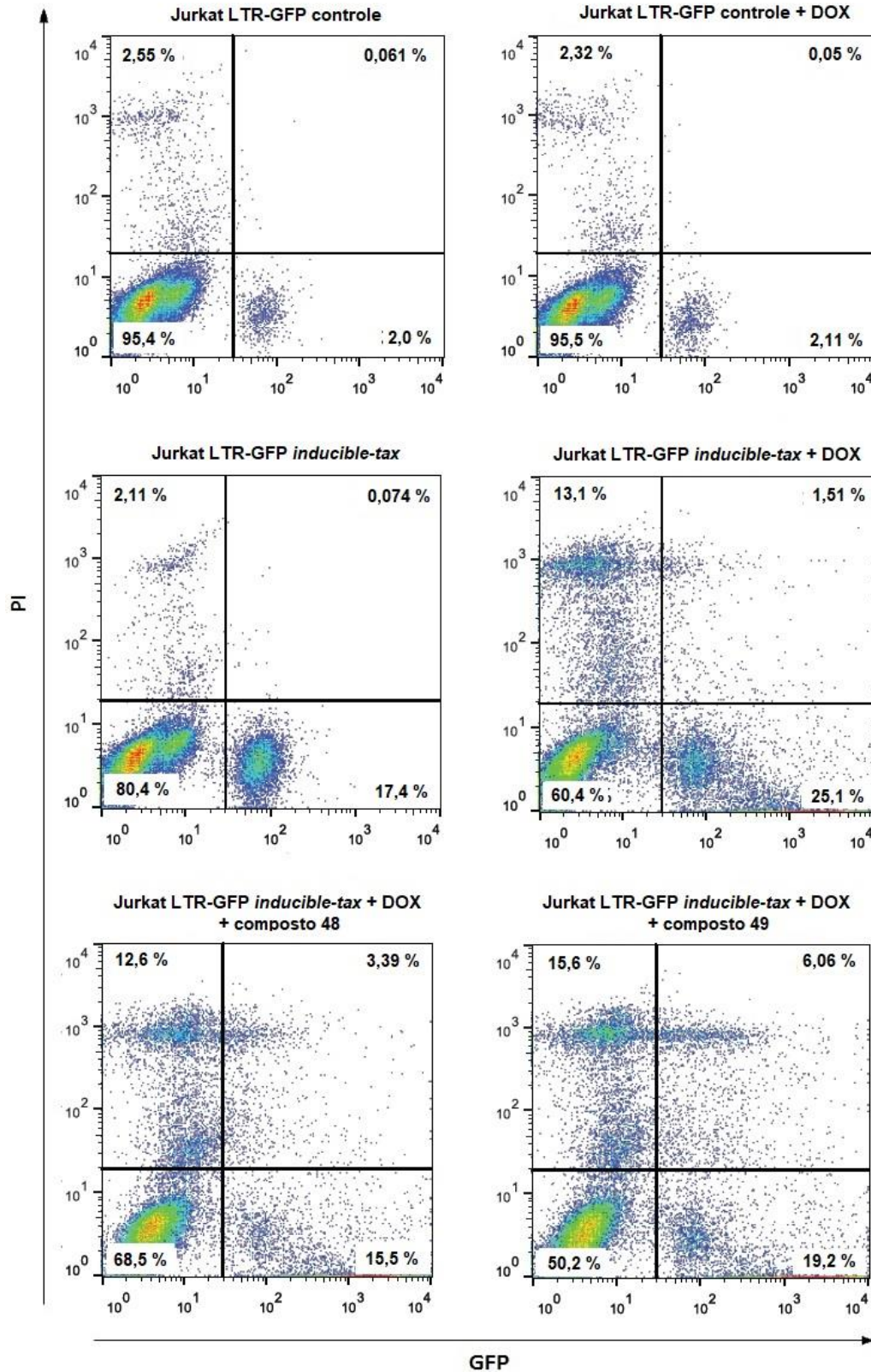
Por outro lado, o composto 61 não alterou a expressão de GFP nos ensaios. Em relação aos outros compostos 65 e 66, houve uma diminuição na porcentagem de células viáveis expressando GFP (**Figura 39**). No entanto, também houve um grande número de células mortas GFP⁺IP⁺ (composto 65: 90,98 ± 1,36 % e composto 66: 44,88 ± 12,14 %, em comparação ao controle com DOX: 16,82 ± 3,37 %).

Figura 39. Efeito dos derivados 1,2,3-triazólicos (compostos FCFRP) selecionados sobre a expressão de GFP na linhagem Jurkat LTR-GFP *inducible-tax*



Compostos na concentração de 50 μM foram incubados com 3×10^5 células por 72 h. Como controles: Jurkat LTR-GFP *inducible-tax* com 0,5 % DMSO (controle sem DOX) e Jurkat LTR-GFP *inducible-tax* com 0,5 % DMSO e DOX (controle com DOX). Após o período de incubação, as células foram coletadas e IP foi adicionado às amostras. A expressão de GFP na população de células viáveis (IP⁻) foi analisada por citometria de fluxo (BD FACSCalibur™). O gráfico exibe a porcentagem de células como média \pm desvio-padrão da média. Teste estatístico: *One-way* ANOVA com pós-teste Tukey; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle com DOX; ### $p < 0,001$ em relação ao controle sem DOX.

Figura 40. Análise representativa da redução da expressão de GFP na linhagem Jurkat LTR-GFP *inducible-tax* após incubação com os compostos 48 e 49



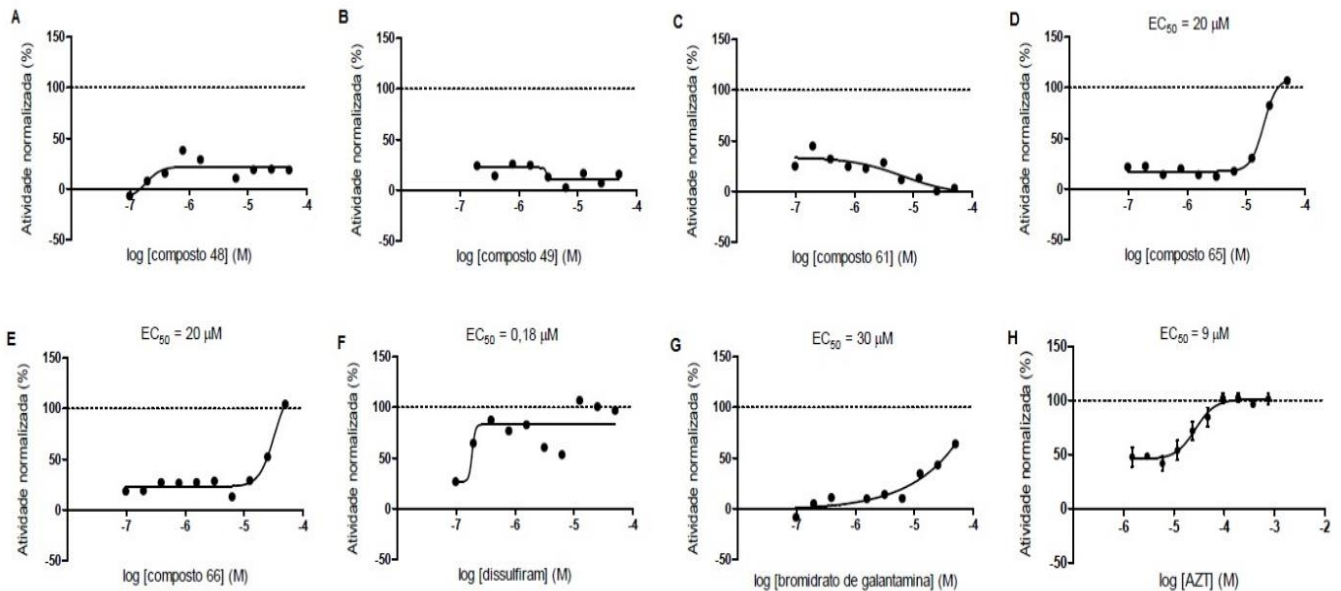
Como controles: Jurkat LTR-GFP Tet3G controle e Jurkat LTR-GFP *inducible-tax*, nas quais ambas foram incubadas com ou sem DOX. Um total de 30.000 eventos foi adquirido por

citometria de fluxo (BD FACSCalibur™). Para análise por meio do *software FlowJo v10*, foi realizado um *gate* de acordo com tamanho (FSC) e complexidade interna (SSC) da população, e com isso, foi determinada a porcentagem de células positivas para GFP e IP através de *dot plot*.

4.11.4 Atividade dos compostos em outras linhagens celulares

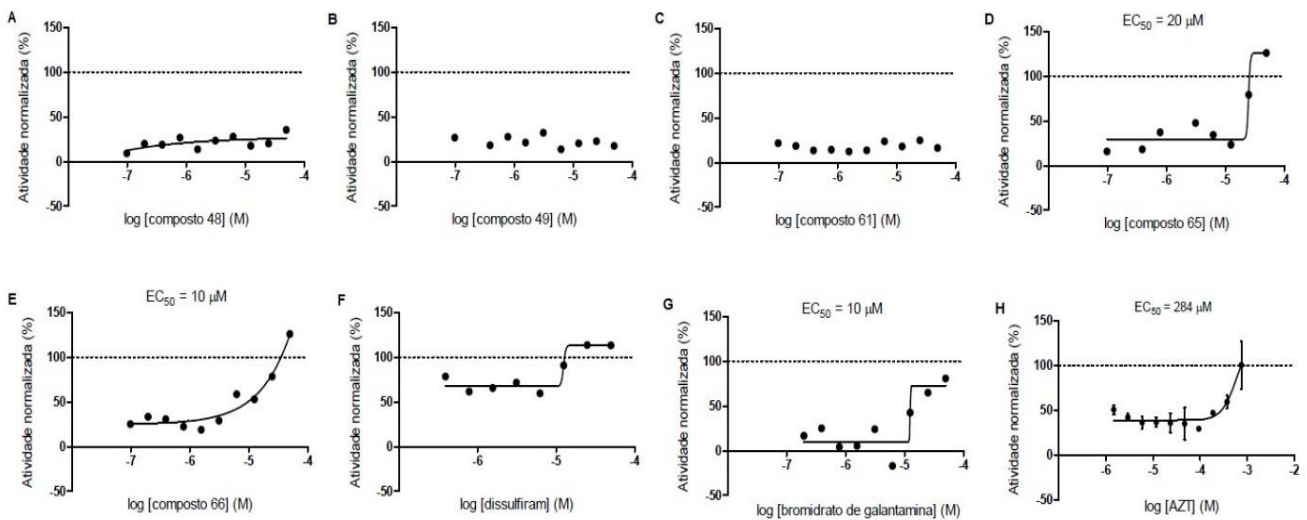
A última etapa desse estudo foi avaliar o efeito dos compostos selecionados na triagem sobre outras linhagens celulares. Primeiramente, ao realizar um ensaio de DRC com os compostos selecionados (FCFRP e NIH), verificou-se que apenas os compostos **65**, **66**, dissulfiram e bromidrato de galantamina exerceram um efeito sobre a atividade metabólica das linhagens infectadas pelo HTLV-1: MT-4 (**Figura 41**) e C8166 (**Figura 42**). Os demais compostos não reduziram o crescimento das linhagens celulares independente da concentração testada (**Figuras 41 e 42**).

Figura 41. Curvas de dose-resposta (DRC) dos compostos 48 (A), 49 (B), 61 (C), 65 (D), 66 (E), dissulfiram (F) e bromidrato de galantamina (G) na linhagem MT-4



A DRC do composto AZT está representada no gráfico H. A normalização é referente aos valores de MT-4 incubada com ETO. O eixo x indica o *log* da concentração do composto e o eixo y indica a porcentagem de atividade normalizada.

Figura 42. Curvas de dose-resposta (DRC) dos compostos 48 (A), 49 (B), 61 (C), 65 (D), 66 (E), dissulfiram (F) e bromidrato de galantamina (G) na linhagem C8166

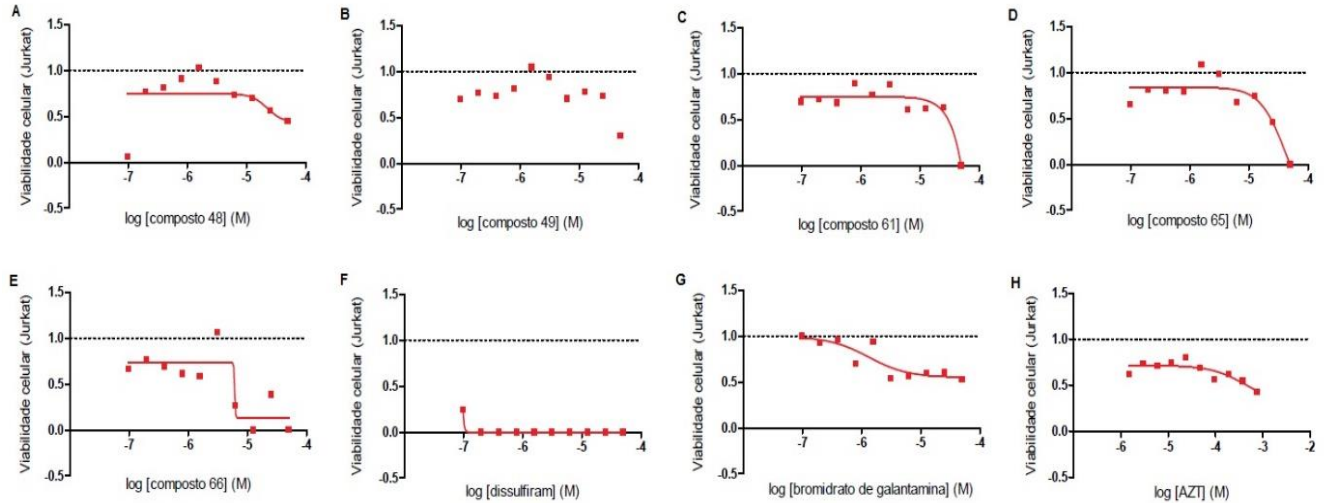


A DRC do composto AZT está representada no gráfico H. A normalização é referente aos valores de C8166 incubada com ETO. O eixo x indica o \log da concentração do composto e o eixo y indica a porcentagem de atividade normalizada.

Em seguida, a viabilidade de linhagens celulares não infectadas pelo HTLV-1 foi calculada de acordo com a fórmula do item 3.4.3. Na linhagem celular Jurkat, os compostos **48 (Figura 43A)** e **49 (Figura 43B)** reduziram a viabilidade de maneira similar ao composto de referência AZT (**Figura 43H**). Para esses compostos, mesmo na concentração máxima, a viabilidade celular não foi muito inferior a 0,5, considerando uma taxa de viabilidade com valor máximo de 1,0. Enquanto o composto bromidrato de galantamina promoveu uma ligeira redução na viabilidade da Jurkat, com uma tendência a manter essa viabilidade a 0,5 mesmo em maiores concentrações (**Figura 43G**). Os demais compostos interferiram de maneira considerável na viabilidade da Jurkat, principalmente o composto dissulfiram (**Figura 43**).

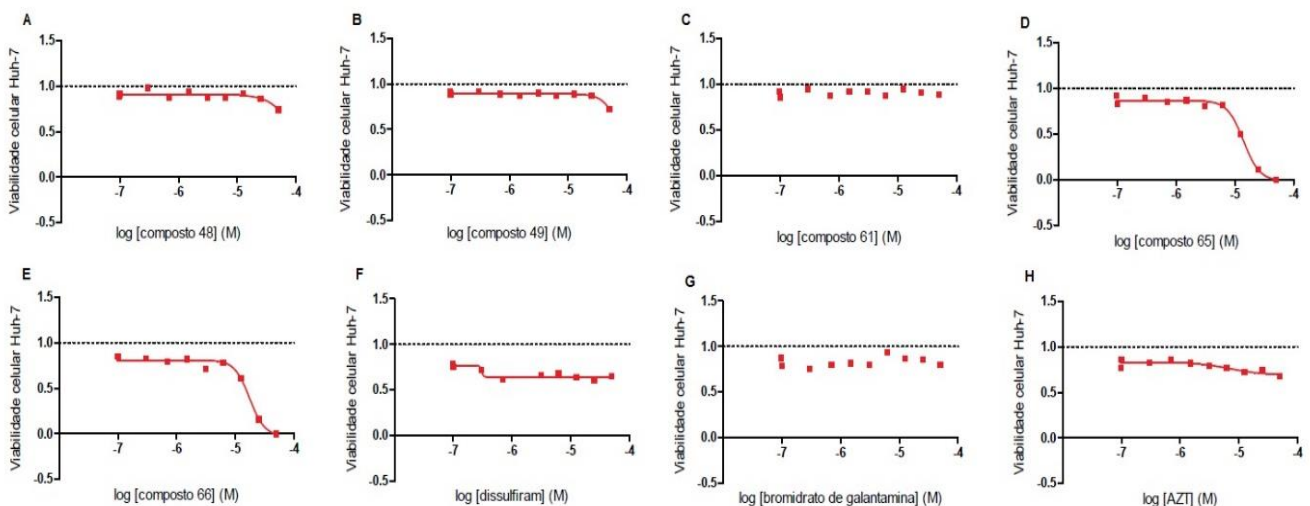
Ao analisar a viabilidade da linhagem celular Huh-7, que é uma linhagem de origem hepática não infectada pelo HTLV-1, observou-se que apenas os compostos **65 (Figura 44D)** e **66 (Figura 44E)** reduziram drasticamente a viabilidade celular conforme o aumento de suas concentrações. Ao contrário desses dados, os demais compostos, **48, 49, 61**, dissulfiram e bromidrato de galantamina, não afetaram a viabilidade da linhagem hepática Huh-7 em nenhuma das concentrações testadas (**Figura 44**).

Figura 43. Viabilidade da linhagem celular Jurkat após incubação com as diferentes concentrações dos compostos 48 (A), 49 (B), 61 (C), 65 (D), 66 (E), dissulfiram (F) e bromidrato de galantamina (G)



No gráfico H, está exibida a curva de viabilidade celular na presença de AZT. O cálculo da viabilidade celular foi realizado de acordo com a fórmula do item 3.4.3. O eixo x indica o \log da concentração do composto e o eixo y indica a viabilidade celular.

Figura 44. Viabilidade da linhagem celular Huh-7 após incubação com as diferentes concentrações dos compostos 48 (A), 49 (B), 61 (C), 65 (D), 66 (E), dissulfiram (F) e bromidrato de galantamina (G)



No gráfico H, está exibida a curva de viabilidade celular na presença de AZT. O cálculo da viabilidade celular foi realizado de acordo com a fórmula do item 3.4.3. O eixo x indica o \log da concentração do composto e o eixo y indica a viabilidade celular.

5. DISCUSSÃO

Diante da inexistência de ações terapêuticas específicas e eficazes para o tratamento da infecção pelo HTLV-1 e as principais doenças associadas (HAM/TSP e ATL), é relevante a descoberta de novos compostos, bem como a proposta de novo uso para drogas já existentes (do inglês *drug repurposing*). Neste contexto, este estudo realizou uma triagem para identificar compostos com atividade sobre linhagem celular infectada pelo HTLV-1 (MT-2). Para tanto, foi proposta a identificação de compostos inibidores de proliferação celular, indutores de apoptose e/ou inibidores da atividade de Tax.

Primeiramente, iniciamos a geração dos bancos “mãe” e “de trabalho” das linhagens infectadas pelo HTLV-1 (MT-2, MT-4 e C8166) e Jurkat. Durante o processo de expansão das linhagens, o sobrenadante de cada cultura foi coletado e testado quanto à presença ou não de *Mycoplasma* spp., um contaminante das culturas celulares (OLARERIN-GEORGE; HOGENESCH, 2015). Não houve a detecção de *Mycoplasma* spp. nas amostras avaliadas, o que garantiu o congelamento de todas as linhagens celulares e a confiabilidade durante sua utilização nos experimentos.

Em paralelo à geração dos bancos celulares, realizamos a caracterização imunofenotípica de cada linhagem celular juntamente com a análise de viabilidade por citometria de fluxo. A linhagem Jurkat, não infectada pelo HTLV-1, é uma linhagem derivada de leucemia aguda de células T, cujo fenótipo é característico de linfócito T auxiliar (CD45⁺, CD3⁺, CD7⁺, CD4⁺, CD8⁻). Enquanto as linhagens MT-2 e MT-4 são provenientes do co-cultivo de leucócitos de ATL com linfócitos do cordão umbilical, sendo que a MT-4 possui baixa produção das proteínas p24 e Tax, além de liberar poucas partículas virais. Já a linhagem C8166 é oriunda da fusão de células de cordão umbilical com linhagem produtora de HTLV-1 de paciente com ATL, e também, possui o genoma do HTLV-1 modificado (SALAHUDDIN et al., 1983). Quanto ao fenótipo, verificou-se uma expressão atípica de marcadores de superfície para linfócitos T (CD3⁻, CD4⁺, CD8⁻, CD25⁺) em todas as linhagens infectadas pelo HTLV-1. A baixa expressão de CD3 ou a ausência desse antígeno na superfície do linfócito já é bem descrita em pacientes com ATL e células infectadas pelo HTLV-1 (AKL et al., 2007; MAEDA et al., 1994). Além disso, todas as linhagens apresentaram uma viabilidade superior a 80% e uma morfologia típica de linfoblasto. No entanto, para os ensaios de triagem de compostos foi utilizada apenas a linhagem MT-2, e as demais foram

empregadas na etapa de validação, a qual envolveu um número restrito de compostos.

Neste estudo, foi estabelecida uma linhagem repórter baseada no sistema de expressão gênica controlada - *Tet-On® Clontech*, com expressão de *tax* induzida por um derivado de tetraciclina (DOX). A linhagem Jurkat LTR-GFP, cuja expressão de GFP é dependente da ativação da sequência LTR por Tax, foi primeiramente desenvolvida por Alais e cols., 2015 (ALAIS; MAHIEUX; DUTARTRE, 2015). Para evitar uma transativação constitutiva mediada por Tax que culminaria na morte celular, essa linhagem foi transduzida com os vetores lentivirais para gerar a linhagem repórter Jurkat LTR-GFP *inducible-tax*, a qual foi caracterizada. Nesse sentido, confirmamos a expressão de *tax* induzida por DOX através da análise de expressão de GFP e da proteína Tax.

A porcentagem de células GFP⁺ (Jurkat LTR-GFP *inducible-tax*) não foi superior a 50 %, e ao aumentar a concentração de DOX para 10 µg/mL e 50 µg/mL, não houve um aumento expressivo de células GFP⁺. Além disso, foram detectadas células mortas após o cultivo com concentrações maiores de DOX. Uma vez que a expressão de *tax* em células infectadas pelo HTLV-1 é intermitente e nem todas expressam este gene viral durante a infecção como forma de evasão do sistema imunológico (MIYAZATO et al., 2016), a linhagem repórter Jurkat LTR-GFP *inducible-tax* estabelecida nesse estudo foi considerada apropriada para os ensaios de identificação de compostos com efeito sobre Tax.

A fim de acelerar o desenvolvimento e descoberta de novas drogas com eficácia terapêutica, ensaios baseados em células (do inglês *cell-based assays*) vêm sendo amplamente empregados, os quais podem ser ensaios de viabilidade/proliferação celular e com gene repórter (ADAN; BARAN, 2016; ASSAYS et al., 2016; KEPP et al., 2011; MICHELINI et al., 2010; ZANG et al., 2012). Em relação aos testes de viabilidade ou proliferação celular, alguns estudos têm adotado ensaios baseados em células usando o método de redução da resazurina, o qual é simples, rápido e de baixo custo (CRUZ et al., 2013a; LIM et al., 2016).

Antes de realizar a triagem de compostos a partir de ensaios baseados em células, uma série de parâmetros foi estabelecida. Neste estudo, microplacas contendo 384 poços foram empregadas nos ensaios de triagem de compostos. Desta forma, a quantidade de células adicionada em cada poço e a concentração máxima de DMSO que não é capaz de interferir no crescimento e na viabilidade celular foram

definidos. Primeiramente, foi avaliada a confluência das linhagens Jurkat, MT-2, MT-4 e C8166 após 72 h de cultivo, sendo que o número de células plaqueadas por poço variou de 1.000 a 10.000 células. Considerando a proliferação celular durante as 72 h de cultivo, o número de células/poço para uma confluência ideal nos ensaios foi 4.000. Além disso, 10.000 a 40.000 células são necessárias para ensaios no formato de placa-384 poços (ZHANG et al., 2012).

O solvente dos compostos mais comum utilizado nos ensaios é o DMSO, um reagente capaz de dissolver uma ampla variedade de compostos químicos. É importante ressaltar que o DMSO é tóxico para as células e, por isso, sua concentração deve ser padronizada para um nível tolerante às mesmas (WAYBRIGHT; BRITT; CLOUD, 2009; ZHANG et al., 2012). No presente estudo, as concentrações de DMSO avaliadas foram de 5 a 0,1%, sendo que a concentração de 0,5% mostrou-se ideal para todas as linhagens, uma vez que não interferiu na proliferação celular e nem na viabilidade celular (> 80%). Além disso, tal concentração já foi estabelecida em vários estudos envolvendo a triagem de compostos (CRUZ et al., 2013a, 2013b; DE WILDE et al., 2014).

Outro parâmetro definido para a triagem de drogas foi a seleção do composto de referência. Primeiramente, um ensaio com a linhagem MT-2 foi realizado, no qual as células foram incubadas com diferentes concentrações de ETO (10, 15 e 20 μ M), um inibidor da proliferação celular e/ou indutor de apoptose, para análise da proliferação/viabilidade celular pelo método de redução da resazurina. A partir deste teste inicial, definimos a concentração de 20 μ M de ETO, a qual reduziu de modo significativo o crescimento da MT-2 após 72 h de cultivo. Além disso, o tempo de incubação adotado para a redução da resazurina foi 4 h, uma vez que as células cultivadas por mais tempo com a resazurina (8 h) apresentaram o mesmo perfil de crescimento reduzido.

Em seguida, alguns ensaios de curva dose-resposta (DRC) com o AA, IFN- α e o AZT foram realizados com o intuito de definir o composto de referência para a inibição da proliferação/viabilidade celular. No presente estudo, o AA em concentrações de até 200 μ g/mL promoveu uma diminuição na proliferação celular. No entanto, o aumento da sua concentração culminou em um efeito oposto. Diante disto, não foi possível obter valores reprodutíveis do EC₅₀ para o AA. Isso pode ser devido a sua capacidade em reduzir a resazurina para formação do composto fluorescente resorufina (WANG et al., 2010). Além disso, a própria resazurina pode

interferir na viabilidade de alguns tipos celulares (RISS et al., 2013), embora não observamos uma alteração no crescimento da linhagem MT-2 cultivada na ausência de ETO.

Um estudo verificou que o AA induziu a apoptose de células mononucleares do sangue periférico provenientes de pacientes com HAM/TSP e de linhagens infectadas, MT-2 e MT-4 (MOENS et al., 2012a). Ainda neste estudo, concentrações não citotóxicas de AA promoveram a apoptose e inibiram a proliferação de linhagens de ATL (HuT-102 e C91PL) (HARAKEH et al., 2007). No entanto, no nosso estudo não foi possível adotar esse composto como referência nos ensaios de triagem de compostos envolvendo o método de redução da resazurina.

Em relação ao IFN- α , não houve nenhuma atividade muito significativa sobre a linhagem MT-2 dentre as diferentes concentrações testadas, o que também impossibilitou o cálculo de EC₅₀. Apesar dessa citocina ser descrita como antiviral, Moens e cols. (2012) demonstraram que o IFN- α não teve nenhuma atividade pró-apoptótica ou antiproliferativa nas células infectadas pelo HTLV-1 (MT-2, MT-4 e C8166) nos tempos de 24, 48 ou 72 h, ao contrário do efeito antiviral observado sobre o HIV-1 (MOENS et al., 2012b). Diante disso, o IFN- α também não foi selecionado como composto de referência.

Outro composto avaliado foi o AZT, um inibidor de transcriptase reversa análogo de nucleosídeo. Esse agente antirretroviral é utilizado no tratamento da infecção pelo HIV-1 (FISCHL et al., 1987). Por também ser um retrovírus, alguns estudos vêm avaliando o efeito do AZT sobre o HTLV-1. Em modelo experimental *in vitro*, o AZT foi capaz de inibir a transmissão do HTLV-1 proveniente de linhagens infectadas MT-2 para células mononucleares. No entanto, essa droga não apresentou atividade antiviral nas células já infectadas (MACCHI et al., 1997). Além disso, a combinação de IFN- α com AZT tem contribuído para uma melhora parcial no prognóstico de ATL (HERMINE et al., 1995). Em linfócitos T infectados provenientes de pacientes com ATL, essa combinação induziu a apoptose (KINPARA et al., 2013).

Ao realizar o ensaio de DRC com o AZT, verificamos que esse composto foi o único a reduzir gradualmente a atividade metabólica da linhagem MT-2 de maneira significativa conforme o aumento da sua concentração. Portanto, o AZT exibiu uma resposta dose-dependente em comparação aos compostos AA e IFN- α , sendo assim, definido como composto de referência para os ensaios de triagem de drogas. Além disso, a atividade normalizada foi obtida a partir da normalização dos dados de URF.

A princípio, foram utilizados os dados de URF da linhagem Jurkat, porém, a DRC ultrapassou o valor de 100 % de atividade normalizada (dados não mostrados). Desta forma, concluímos que a linhagem Jurkat não seria um controle ideal de célula não infectada, uma vez que a mesma é um tipo celular diferente da linhagem infectada pelo HTLV-1 (MT-2). Alguns estudos utilizam fórmulas de normalização dos dados similares a esta adotada, porém os controles empregados nos ensaios são as mesmas células sem o patógeno (CRUZ et al., 2013a, 2013b; MORAES et al., 2014). Portanto, a linhagem Jurkat não foi adotada como controle não infectado, porém a normalização dos dados para gerar os gráficos de DRC foi realizada com a linhagem infectada pelo HTLV-1 incubada com ETO.

Após a caracterização das linhagens celulares empregadas nesse estudo e o estabelecimento de ensaio baseado em célula no formato de microplaca-384 poços, a próxima etapa foi a triagem de compostos. A triagem primária consistiu em ensaios de análise de atividade metabólica (proliferação/viabilidade celular) pelo método de redução da resazurina e a linhagem celular utilizada foi a MT-2. Duas bibliotecas de compostos foram disponibilizadas para triagem: 26 derivados 1,2,3-triazólicos (compostos FCFRP) e 707 drogas já aprovadas para uso clínico pelo FDA (compostos NIH).

Derivados 1,2,3-triazólicos são compostos heterocíclicos orgânicos que desempenham um importante papel na área de Química Medicinal devido as suas várias atividades biológicas já descritas, incluindo antimicrobiana (AZIZ ALI et al., 2017), antineoplásica (PRACHAYASITTIKUL et al., 2015) e antiviral (KHARB; SHAHAR YAR; CHANDER SHARMA, 2011). Os derivados 1,2,3-triazólicos desse estudo foram obtidos por síntese orgânica, cuja caracterização permitiu enquadrá-los segundo os critérios de *Lipinski* (LEESON, 2012). Segundo as regras de *Lipinski* (Regra dos 5), tais compostos apresentam maior permeabilidade à membrana celular de acordo com suas propriedades físico-químicas: massa molecular ≤ 500 daltons, número de átomos doadores de ligação de hidrogênio ≤ 5 , número de átomos receptores de ligação de hidrogênio ≤ 10 , e coeficiente de partição octanol/água ≤ 5 . Portanto, os derivados 1,2,3-triazólicos sintetizados para esse estudo podem ser potenciais candidatos a fármacos.

A triagem com os 26 derivados 1,2,3-triazólicos (compostos FCFRP) foi realizada por meio de ensaio de DRC. Em relação aos ensaios realizados em três dias distintos, todos apresentaram um CV baixo e um *Z-factor* satisfatório, os quais

garantem a qualidade dos ensaios de triagem. A partir dos 26 compostos analisados, verificamos que a maioria apresentou uma atividade inibidora sobre o crescimento da MT-2, sendo que oito foram mais efetivos: **48, 49, 50, 61, 65, 66, 74 e 75**. Na concentração máxima de 50 μM , tais compostos apresentaram atividade $\geq 70\%$ e exibiram valores baixos de EC_{50} (valor mínimo: 9,11 μM , e valor máximo 23,33 μM). Portanto, foi possível identificar compostos que inibiram a proliferação da MT-2 (atividade metabólica) em concentrações inferiores àquela promovida pelo composto de referência AZT (média do valor de EC_{50} : 740 μM). Tal droga é um inibidor da transcrição reversa, mas também é capaz de interferir no crescimento celular (FANG; BELAND, 2009).

Apesar de apresentar uma série de atividades biológicas descritas, incluindo atividade antiviral, esse estudo é o primeiro a demonstrar o efeito de novos derivados 1,2,3-triazólicos sobre a linhagem celular infectada por HTLV-1 (MT-2). A síntese e a atividade antiviral de compostos baseados em triazólicos foi avaliada em um estudo no qual tais compostos foram capazes de inibir a replicação do HIV-1 em células humanas (HILIMIRE et al., 2017). Por também ser um retrovírus, acreditamos que os derivados 1,2,3-triazólicos também sejam potenciais drogas a serem investigadas na infecção pelo HTLV-1. Adicionalmente, esses compostos têm propriedades físico-químicas de potenciais fármacos. Portanto, os oito compostos **48, 49, 50, 61, 65, 66, 74 e 75** foram selecionados para os ensaios de validação.

Ensaio baseado no método de redução da resazurina vêm sendo empregados em alguns estudos de triagem de compostos para tratamento de ATL. Nesse caso, vários extratos de origem natural foram testados quanto ao efeito anti-proliferativo nas linhagens celulares MT-1 e MT-2, sendo que os componentes que exibiram potente atividade inibidora foram isolados para análises posteriores (NAKANO et al., 2011, 2015). Um composto denominado YM155 com atividade anti-proliferativa também vêm sendo testado em várias linhagens tumorais humanas, incluindo na leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL) (SALES et al., 2017). Portanto, o ensaio baseado em células no formato 384-poços estabelecido nesse estudo deveria ser aplicado na triagem de drogas usando linhagem infectada pelo HTLV-1, uma vez que os ensaios com o método de redução da resazurina são testes rápidos, com baixo custo para execução e são adequados para análise de proliferação/viabilidade celular.

Além da triagem dos 26 derivados 1,2,3-triazólicos (compostos FCFRP), 707 compostos NIH também foram testados quanto ao efeito inibidor da atividade metabólica da linhagem celular MT-2. A triagem primária consistiu em teste de concentração única (5 μ M) devido à maior quantidade de compostos desta biblioteca. Em seguida, os compostos com atividade acima de 50% (34 *hits*) foram selecionados para a triagem secundária baseada em ensaios de DRC, nos quais 5 *hits* foram confirmados. Verificamos ainda que a triagem dos compostos NIH foi eficiente, uma vez que os cálculos de CV e *Z-factor* permitiram confirmar a qualidade dos ensaios. Considerando a quantidade de placas utilizadas nessa triagem, o coeficiente de correlação de Pearson entre os ensaios também foi calculado e considerado satisfatório, uma vez que os valores obtidos foram acima de 0,8.

A biblioteca de compostos do NIH consiste em drogas já aprovadas para uso clínico pelo FDA, e por isso, pode ser adotada na proposta que visa dar um novo uso para drogas já existentes (do inglês *drug repurposing*). Considerando que apenas 12 novas drogas antivirais foram aprovadas pelo FDA nos Estados Unidos no período de 2012 a 2017, essa estratégia é uma abordagem relevante no processo de descoberta e desenvolvimento de novas drogas, uma vez que permite reduzir os custos, riscos e o tempo desse processo (MERCORELLI; PALÙ; LOREGIAN, 2018). A partir do emprego de uma biblioteca de 725 drogas, um estudo identificou cinco compostos com atividade antiviral sobre o vírus Zika. Esses compostos já são drogas aprovadas pelo FDA e empregadas em distintos tratamentos (PASCOALINO et al., 2016). Para avaliar novas formas de tratamento da ATL, um estudo também empregou a estratégia de *drug repurposing*. Nesse contexto, a droga telmisartan, que é um antagonista do receptor II de angiotensina utilizado no tratamento de doenças cardiovasculares, reduziu a viabilidade celular e induziu a apoptose de PBMC isolados de portadores do HTLV-1 e pacientes com ATL, bem como exerceu tais efeitos em linhagens celulares (KOZAKO et al., 2016).

Portanto, a triagem dos compostos NIH permitiu identificar 05 *hits*, os quais são drogas já utilizadas no tratamento de outras doenças. Essas drogas incluem: dissulfiram, citarabina, clorambucil, cladribina e bromidrato de galantamina. A droga dissulfiram foi aprovada para o tratamento de etilismo crônico em 1948 pelo FDA. Esse medicamento inibe a atividade da enzima aldeído desidrogenase, o que resulta no acúmulo de acetaldeído no organismo do paciente, e conseqüentemente, em efeitos colaterais. Isso conduz o paciente à perda do prazer em consumir álcool (JIAO;

HANNAFON; DING, 2016). Além disso, a droga dissulfiram vem sendo avaliada em outros contextos, como por exemplo, na terapia para tumores. Na leucemia mielóide aguda, o tratamento com dissulfiram em combinação com o cobre apresentou atividades *in vitro* e *in vivo* sobre células-tronco leucêmicas, incluindo a supressão da proliferação celular e indução de apoptose (XU et al., 2017). Enquanto no contexto de terapia antiviral, um estudo demonstrou o efeito do dissulfiram na reativação do HIV-1 latente em células de pacientes, o que pode contribuir para as estratégias de erradicação viral (XING et al., 2011).

Em relação às drogas citarabina, clorambucil e cladribina, todas são agentes antineoplásicos empregados no tratamento de alguns tipos de leucemia e linfoma. Citarabina é um antimetabólito capaz de bloquear a síntese de DNA, uma vez que seu derivado trifosfato é incorporado na cadeia de DNA para interrupção dessa síntese. Essa droga é capaz de induzir a apoptose de células leucêmicas, além de ser uma droga já empregada na quimioterapia convencional para ATL (XIE et al., 2010; YARED; KIMBALL, 2015). Já o clorambucil, um agente alquilante com ação em todas as fases do ciclo celular, é um fármaco utilizado na quimioterapia da leucemia linfocítica crônica e linfomas malignos, incluindo ATL (MONE et al., 2005). Por fim, a cladribina também é um agente antimetabólito inibidor da síntese de DNA e empregada no tratamento de doenças linfoproliferativas. No entanto, um estudo de fase II concluiu que a administração de cladribina não deveria ser mais investigada em pacientes com ATL refratários ao tratamento ou com recidiva nessa condição clínica, uma vez que não houve melhora ou impedimento da progressão da doença na maioria dos pacientes tratados (TOBINAI et al., 2003). Diante desse contexto, as drogas citarabina, clorambucil e cladribina não foram exploradas nesse estudo.

Outro composto identificado como *hit* é o bromidrato de galantamina. Essa droga é um inibidor reversível da enzima acetilcolinesterase e também é capaz de intensificar a ação da acetilcolina, o que resulta no aumento da neurotransmissão colinérgica no SNC. Por isso, o bromidrato de galantamina é uma droga utilizada no tratamento da doença de Alzheimer (RAZAY; WILCOCK, 2008). Além da avaliação do uso dessa droga no tratamento de outras doenças com dano cognitivo, não há outras abordagens terapêuticas sendo investigadas. Portanto, as drogas identificadas como *hits* nesse estudo (dissulfiram e bromidrato de galantamina) deverão ser avaliadas por outros ensaios a fim de confirmar o efeito sobre a linhagem celular MT-2, uma vez que

até o momento não há nenhuma atividade descrita para HTLV-1 mediada por tais compostos.

A última etapa desse estudo consistiu na validação da atividade dos compostos ativos por meio de ensaios de ciclo celular e apoptose através de citometria de fluxo. Até o momento, apenas os derivados 1,2,3-triazólicos puderam ser avaliados. Quanto ao ciclo celular, confirmamos o efeito do composto **61** sobre o crescimento da linhagem MT-2, uma vez que tal composto na concentração de 50 µM promoveu um acúmulo de células na fase S. Já os demais não alteraram a proliferação celular de forma significativa. Sabe-se que o ciclo celular envolve a replicação do DNA e a subsequente divisão celular, além de ser um processo regulado por ciclinas e quinases dependentes de ciclinas, CDKs (OTTO; SICINSKI, 2017). Nesse sentido, Hamasaki T. e cols. (2011) mostraram que um derivado de tetrametilnaftaleno inibiu a proliferação de células infectadas pelo HTLV-1 (HAMASAKI et al., 2011). Porém, ao contrário do observado no nosso estudo, o composto induziu a parada das células na fase G0/G1, e tal efeito foi decorrente da diminuição da expressão da CDK4 (HAMASAKI et al., 2011). Além disso, um inibidor seletivo de CDK9 demonstrou ser uma droga promissora no tratamento de ATL (NARITA et al., 2017). Ainda outro estudo verificou o efeito de outros dois compostos (BMS-345541 and purvalanol A) sobre o ciclo celular (AGBOTTAH et al., 2008).

O desenvolvimento de drogas com ação sobre as proteínas reguladoras do ciclo celular é bastante promissor na terapia contra o câncer (DI GIOVANNI et al., 2016; GALI-MUHTASIB; BAKKAR, 2002; OTTO; SICINSKI, 2017). Na infecção pelo HTLV-1, a proteína viral Tax é responsável por desregular a progressão do ciclo celular, o que contribui para a proliferação das células infectadas e inibição da apoptose (CURRER et al., 2012; MARRIOTT; SEMMES, 2005). Portanto, a modulação do ciclo celular para inibição da proliferação das células infectadas constitui uma abordagem interessante e promissora. Contudo, os resultados obtidos até o momento são preliminares, uma vez que não foi investigado como o composto **61** está interferindo no ciclo celular.

Também foi investigada a apoptose da MT-2 mediante o tratamento *in vitro* com os oito derivados 1,2,3-triazólicos (compostos FCFRP). Verificamos que os compostos **48**, **49**, **65** e **66** foram capazes de induzir a ativação das caspases efetoras 3/7 e a externalização da fosfatidilserina, contribuindo assim, para a apoptose da célula infectada. Similarmente, alguns estudos demonstraram o efeito de drogas sobre

a apoptose de células leucêmicas (ATL). Nicot e cols. sugeriram que o emprego de inibidores de helicase com alvo na replicação de DNA e maquinaria de reparo é uma estratégia promissora para induzir apoptose em células de ATL. Os inibidores de helicase (NSC 19630 e NSC 617145) promoveram uma expressão reduzida do fator anti-apoptótico Bcl-2 e uma ativação da apoptose dependente de caspase nas células ATL (MOLES et al., 2016). Durante a infecção pelo HTLV-1, a proteína viral Tax é relacionada com a inibição de apoptose das células infectadas, uma vez que sua expressão é responsável pelo aumento de expressão de Bcl-2, um fator anti-apoptótico, e supressão de Bim e Bid, fatores pró-apoptóticos (MÜHLEISEN et al., 2014). Portanto, compostos com ação sobre a expressão ou atividade de Tax poderiam ser promissores no tratamento da infecção pelo HTLV-1 e doenças associadas. Diante disso, uma linhagem repórter com expressão de Tax induzida por DOX (Jurkat LTR-GFP *inducible-tax*) foi estabelecida no nosso estudo.

Nesse sentido, investigamos se os derivados 1,2,3-triazólicos selecionados (**48**, **49**, **61**, **65** e **66**), com ação na proliferação e apoptose da linhagem MT-2, poderiam interferir na atividade de Tax. Através da linhagem Jurkat LTR-GFP *inducible-tax*, nosso estudo demonstrou que somente os compostos **48** e **49** reduziram a expressão de GFP, o que indica um efeito sobre a expressão ou atividade de Tax. Embora a presença dos compostos **65** e **66** demonstrasse uma diminuição na porcentagem de células GFP⁺, tal resultado foi devido ao maior número de células mortas. Além disso, o composto **61** não interferiu na expressão de GFP em nossos ensaios, provavelmente por ter apresentado efeito somente na proliferação da MT-2 devido a uma interferência nos reguladores de ciclo celular, tais como ciclinas e CDKs. No entanto, o mecanismo exato necessita ser elucidado por estudos posteriores.

Por fim, outras linhagens celulares foram utilizadas com o intuito de avaliar o efeito dos derivados 1,2,3-triazólicos selecionados (**48**, **49**, **61**, **65** e **66**) e dos compostos NIH (dissulfiram e bromidrato de galantamina). Em relação às linhagens celulares infectadas pelo HTLV-1, MT-4 e C8166, apenas os compostos **65**, **66**, dissulfiram e bromidrato de galantamina foram capazes de reduzir o crescimento celular. Já os compostos **48**, **49** e **61** não apresentaram nenhum efeito. Sabe-se que as linhagens MT-4 e C8166 possuem alteração no genoma viral, a qual poderia ser responsável por essa diferença das atividades dos compostos. Também foi utilizada uma linhagem celular derivada de leucemia não relacionada ao HTLV-1 (Jurkat). Na

linhagem Jurkat, os compostos **61**, **65**, **66** e dissulfiram reduziram a viabilidade celular, ao contrário dos compostos **48**, **49** e bromidrato de galantamina.

Uma forma de investigar a citotoxicidade mediada por esses compostos foi através do cultivo de linhagem celular de origem hepática (hepatoma, Huh-7) com as diferentes concentrações dos compostos ativos selecionados. Exceto os compostos **65** e **66**, que reduziram a viabilidade da linhagem Huh-7, os demais compostos não foram citotóxicos, uma vez que não alteraram de modo significativo a viabilidade celular.

Portanto, os derivados 1,2,3-triazólicos **48** e **49** deveriam ser investigados como inibidores da transativação viral mediada por Tax, uma vez que foram capazes de induzir a apoptose da linhagem celular MT-2 e interferiram na atividade da proteína Tax devido à redução da expressão de GFP na linhagem Jurkat LTR-GFP *inducible-tax*. Uma inibição de Tax poderia contribuir para a alteração da expressão de fatores anti-apoptóticos e pró-apoptóticos, o que explicaria a capacidade de indução de apoptose dos compostos **48** e **49**. No entanto, outros estudos devem ser realizados a fim de esclarecer os mecanismos de ação. Além disso, eles não alteraram a viabilidade da linhagem hepática Huh-7 o que demonstra não serem citotóxicos em outro tipo celular não relacionado ao HTLV-1. Já o composto **61** provocou um acúmulo de células MT-2 na fase S e alterou a viabilidade de outra linhagem leucemia não infectada pelo HTLV-1. Como este composto não apresentou efeito sobre a atividade de Tax na linhagem Jurkat LTR-GFP *inducible-tax*, acreditamos que sua atividade seja na regulação do ciclo celular, além de não ser citotóxico para a linhagem hepática Huh-7. Sendo assim, seus mecanismos de ação e confirmação da atividade devem ser explorados com mais estudos.

Os compostos da biblioteca NIH, dissulfiram e bromidrato de galantamina, serão adquiridos para validação de suas atividades sobre a proliferação e apoptose da linhagem celular MT-2, bem como nos ensaios com a linhagem repórter. Até o presente estudo, verificamos que essas drogas reduziram o crescimento das linhagens celulares infectadas pelo HTLV-1: MT-2, MT-4 e C8166, além de não serem citotóxicas para a linhagem celular Huh-7. Uma vez que as drogas dissulfiram e bromidrato de galantamina já são utilizadas para terapia de outras doenças, elas podem ser consideradas promissoras na estratégia de *drug repurposing* para a investigação de novas terapias na infecção pelo HTLV-1 e doenças associadas.

6. CONCLUSÕES

Nosso estudo demonstrou que o ensaio baseado em célula utilizando o método de redução da resazurina pode ser adotado como ferramenta para identificar compostos com atividade em linhagens celulares infectadas pelo HTLV-1. Além disso, identificamos derivados 1,2,3-triazólicos capazes de induzir a apoptose da linhagem MT-2 e interferir na atividade de Tax viral (compostos **48** e **49**), bem como um composto com efeito na proliferação celular (composto **61**). Ainda, a biblioteca de compostos do NIH permitiu selecionar dois compostos já aprovados para uso clínico pelo FDA: dissulfiram e bromidrato de galantamina, os quais constituem uma estratégia promissora para uma nova abordagem terapêutica na infecção pelo HTLV-1. Portanto, os compostos identificados nesse estudo deveriam ser investigados como novas abordagens terapêuticas, uma vez que é necessária a descoberta e desenvolvimento de novas drogas específicas e efetivas no tratamento das doenças associadas ao HTLV-1.

7. REFERÊNCIAS

- ABDIZADEH, M. F.; MAKVANDI, M.; SAMARBAFZADEH, A. Examination of a Reporter Vector for HTLV-1 Infectivity Using MT2, a HTLV-1 Producer Cell Line. **Jundishapur J Microbiol**, v. 6, n. 10, p. 2–7, 2013.
- AKL, H. et al. Progressive loss of CD3 expression after HTLV-I infection results from chromatin remodeling affecting all the CD3 genes and persists despite early viral genes silencing. **Virology journal**, v. 4, p. 85, 2007.
- ALAIS, S.; MAHIEUX, R.; DUTARTRE, H. Viral Source-Independent High Susceptibility of Dendritic Cells to Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Infection Compared to That of T Lymphocytes. **Journal of Virology**, v. 89, n. 20, p. 10580–10590, 2015.
- ARAÚJO, A. Q.-C. et al. Progression of neurological disability in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Journal of the Neurological Sciences**, v. 129, n. 2, p. 147–151, 1995.
- BANGHAM, C. R. M. et al. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Nature Reviews Disease Primers**, p. 15012, 2015a.
- BANGHAM, C. R. M. et al. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 1–16, 2015b.
- BANGHAM, C. R.; RATNER, L. How does HTLV-1 cause adult T-cell leukaemia/lymphoma (ATL)? **Current Opinion in Virology**, v. 14, p. 93–100, 2015.
- BOXUS, M.; WILLEMS, L. Mechanisms of HTLV-1 persistence and transformation. **British journal of cancer**, v. 101, n. 9, p. 1497–1501, 2009.
- CARPENTIER, A. et al. Modes of Human T Cell Leukemia Virus Type 1 Transmission, Replication and Persistence. **Viruses**, v. 7, n. i, p. 3603–3624, 2015.
- CATALAN-SOARES, B. C. et al. HLA class i alleles in HTLV-1-associated myelopathy and asymptomatic carriers from the Brazilian cohort GIPH. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 198, n. 1, p. 1–3, 2009.
- CATALAN-SOARES, B.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F.; PROIETTI, F. A. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I / II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 21, n. 3, p. 926–931, 2005.
- CHALFIE, M. et al. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. **Science**, v. 263, n. 1988, p. 802–805, 1992.

- CRUZ, D. J. M. et al. High Content Screening of a Kinase-Focused Library Reveals Compounds Broadly-Active against Dengue Viruses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 2, p. 1–13, 2013a.
- CRUZ, D. J. M. et al. Identification of Novel Compounds Inhibiting Chikungunya Virus-Induced Cell Death by High Throughput Screening of a Kinase Inhibitor Library. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 10, 2013b.
- CURIS, C. et al. Human T-Lymphotropic Virus (HTLV)-1-Induced Overexpression of Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM) Facilitates Trafficking of Infected Lymphocytes through the Blood-Brain Barrier. **Journal of Virology**, n. June, p. JVI.00539-16, 2016.
- DAELEMANS, D.; DE CLERCQ, E.; VANDAMME, A. M. A quantitative GFP-based bioassay for the detection of HIV-1 Tat transactivation inhibitors. **Journal of Virological Methods**, v. 96, n. 2, p. 183–188, 2001.
- DAS, A. T. et al. Selecting the optimal Tet-On system for doxycycline-inducible gene expression in transiently transfected and stably transduced mammalian cells. **Biotechnology Journal**, v. 11, n. 1, p. 71–79, 2016.
- DE WILDE, A. H. et al. Screening of an FDA-approved compound library identifies four small-molecule inhibitors of Middle East respiratory syndrome coronavirus replication in cell culture. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4875–4884, 2014.
- FISCHL, M. A. et al. The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. **The New England journal of medicine**, v. 317, n. 4, p. 185–91, 1987.
- FRANCHINI, G.; NICOT, C.; JOHNSON, J. Seizing of T cells by human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1. **Adv Cancer Res**, v. 89, p. 69–132, 2003.
- GALLO, R. C. The discovery of the first human retrovirus: HTLV-1 and HTLV-2. **Retrovirology**, v. 2, p. 17, 2005.
- GERVAIX, A. et al. A new reporter cell line to monitor HIV infection and drug susceptibility in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. April, p. 4653–4658, 1997.
- GESSAIN, A.; CASSAR, O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. NOV, p. 1–23, 2012.
- GESSAIN, A. et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet**, v. 2, n. 8452, p. 407–410, 1985.

- GHEZ, D. et al. Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. **Journal of virology**, v. 80, n. 14, p. 6844–6854, 2006.
- GIULIANO, K. A.; HASKINS, J. R.; TAYLOR, D. L. Advances in high content screening for drug discovery. **Assay and drug development technologies**, v. 1, n. 4, p. 565–577, 2003.
- GOSSEN, M. et al. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. **Science**, v. 268, n. 5218, p. 1766–1769, 1995.
- GOTUZZO, E. et al. Clinical characteristics of patients in Peru with human T cell lymphotropic virus type 1-associated tropical spastic paraparesis. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 39, n. 7, p. 939–944, 2004.
- HARAKEH, S. et al. Ascorbic acid induces apoptosis in adult T-cell leukemia. **Anticancer research**, v. 27, n. 1A, p. 289–298, 2007.
- HARRINGTON, W. J. et al. Tropical Spastic Paraparesis / HTLV-1-Associated Myelopathy (TSP / HAM): Treatment with an anabolic steroid danazol. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 7, n. 12, p. 1031–1034, 1991.
- HERMINE, O. et al. Treatment of Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma with Zidovudine and Interferon Alfa. **New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 26, p. 1749–1751, 29 jun. 1995.
- HÖLLSBERG, P. Mechanisms of T-cell activation by human T-cell lymphotropic virus type I. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 63, n. 2, p. 308–333, 1999.
- ISHITSUKA, K.; TAMURA, K. Human T-cell leukaemia virus type I and adult T-cell leukaemia-lymphoma. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 11, p. e517–e526, 2014.
- IZUMO, S. et al. Interferon-alpha is effective in HTLV-I-associated myelopathy: A multicenter, randomized, double-blind, controlled trial. **Neurology**, v. 46, p. 1016–1021, 1996.
- JONES, K. S. et al. Heparan Sulfate Proteoglycans Mediate Attachment and Entry of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Virions into. **Journal of Virology**, v. 79, n. 20, p. 12692–12702, 2005.
- JORDAN, E. T. et al. Optimizing electroporation conditions in primary and other difficult-to-transfect cells. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 19, n. 5, p. 328–334, 2008.
- KAIN, S. R.; GANGULY, S. Overview of genetic reporter systems. **Current protocols**

in **molecular biology**, n. 1996, p. 1–12, 2004.

KANNIAN, P.; GREEN, P. L. Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): Molecular biology and oncogenesis. **Viruses**, v. 2, n. 9, p. 2037–2077, 2010.

KAUL, D. R. et al. Donor screening for human T-cell lymphotropic virus 1/2: Changing paradigms for changing testing capacity. **American Journal of Transplantation**, v. 10, n. 2, p. 207–213, 2010.

KEMPF, M.-C. et al. A high-throughput drug screening system for HIV-1 transcription inhibitors. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 11, n. 7, p. 807–815, 2006a.

KEMPF, M.-C. et al. A High-Throughput Drug Screening System for HIV-1 Transcription Inhibitors. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 11, n. 7, p. 807–815, 2006b.

KIM, T. H. et al. Identification of a Novel Sulfonamide Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor by a Phenotypic HIV-1 Full Replication Assay. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1–8, 2013.

KINPARA, S. et al. Interferon- α (IFN- α) suppresses HTLV-1 gene expression and cell cycling, while IFN- α combined with zidovudin induces p53 signaling and apoptosis in HTLV-1-infected cells. **Retrovirology**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2013.

KRESS, A. K.; GRASSMANN, R.; FLECKENSTEIN, B. Cell surface markers in HTLV-1 pathogenesis. **Viruses**, v. 3, n. 8, p. 1439–1459, 2011.

KURODA, Y.; FUJIYAMA, F.; NAGUMO, F. Analysis of factors of relevance to rapid clinical progression in HTLV-I-associated myelopathy. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 105, n. 1, p. 61–66, 1991.

LEESON, P. Chemical beauty contest. **Nature**, v. 481, n. January, p. 455–456, 2012.

LEHKY, T. J. et al. Reduction in HTLV-I proviral load and spontaneous lymphoproliferation in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients treated with humanized anti-Tac. **Annals of Neurology**, v. 44, n. 6, p. 942–947, 1998.

LEZIN, A. et al. Histone deacetylase mediated transcriptional activation reduces proviral loads in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients. **Blood**, v. 110, n. 10, p. 3722–3728, 2007.

LIM, K. T. et al. Development of resazurin-based assay in 384-well format for high throughput whole cell screening of *Trypanosoma brucei rhodesiense* strain STIB 900 for the identification of potential anti-trypanosomal agents. **Experimental Parasitology**, v. 162, p. 49–56, 2016.

- LIN, H.-C. et al. Activation of human T cell leukemia virus type 1 LTR promoter and cellular promoter elements by T cell receptor signaling and HTLV-1 Tax expression. **Virology**, v. 339, n. 1, p. 1–11, 2005.
- MACCHI, B. et al. AZT inhibits the transmission of human T cell leukaemia/lymphoma virus type I to adult peripheral blood mononuclear cells in vitro. **The Journal of General Virology**, v. 78 (Pt 5), n. 78, p. 1007–16, 1997.
- MAEDA, Y. et al. Down-regulation of CD3 antigen on adult T cell leukemia cells. **Leukemia & lymphoma**, v. 13, n. 3–4, p. 249–56, 1994.
- MANEL, N. et al. The Ubiquitous Glucose Transporter GLUT-1 Is a Receptor for HTLV. **Cell**, v. 115, n. 4, p. 449–459, 2003.
- MERTEN, O.-W.; HEBBEN, M.; BOVOLENTA, C. Production of lentiviral vectors. **Molecular therapy. Methods & clinical development**, v. 3, n. September 2015, p. 16017, 2016.
- MOENS, B. et al. Ascorbic Acid Has Superior Ex Vivo Antiproliferative, Cell Death-Inducing and Immunomodulatory Effects over IFN- α in HTLV-1-Associated Myelopathy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 7, p. 1–15, 2012.
- MORAES, C. B. et al. Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. **Scientific reports**, v. 4, p. 1–11, 2014.
- MORGAN, O. S. et al. HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. **The Lancet**, v. 334, n. 8673, p. 1184–1186, 1989.
- MORI, N. et al. Human T-Cell Leukemia Virus Type I Tax Induces Intracellular Adhesion Molecule-1 Expression in T Cells. **Blood**, v. 84, n. 1, p. 350–351, 1994.
- MURPHY, E. L. Infection with human T-lymphotropic virus types-1 and -2 (HTLV-1 and -2): Implications for blood transfusion safety. **Transfusion clinique et biologique**, v. 23, n. 1, p. 13–19, 2016.
- NAGAI, M. et al. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. **Journal of neurovirology**, v. 4, n. 6, p. 586–593, 1998.
- NAGATA, K. et al. Activation of endogenous c-fos proto-oncogene expression by human T-cell leukemia virus type I-encoded p40tax protein in the human T-cell line, Jurkat. **Journal of virology**, v. 63, n. 8, p. 3220–6, 1989.
- NAKAMURA, T. HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): The role of HTLV-I-infected Th1 cells in the pathogenesis, and therapeutic

- strategy. **Folia Neuropathologica**, v. 47, n. 2, p. 182–194, 2009.
- NAKAMURA, T. et al. Efficacy of prosultiamine treatment in patients with human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: Results from an open-label clinical trial. **BMC Medicine**, v. 11, n. 182, p. 1–9, 2013.
- NAMEN-LOPES, M. S. S. et al. Lookback study of HTLV-1 and 2 seropositive donors and their recipients in Belo Horizonte, Brazil. **Transfusion Medicine**, v. 19, n. 4, p. 180–188, 2009.
- NEJMEDDINE, M. et al. HTLV-1-Tax and ICAM-1 act on T-cell signal pathways to polarize the microtubule-organizing center at the virological synapse. **Blood**, v. 114, n. 5, p. 1016–1025, 2009.
- OCHSENBAUER-JAMBOR, C. et al. T-cell line for HIV drug screening using EGFP as a quantitative marker of HIV-1 replication. **BioTechniques**, v. 40, n. 1, p. 91–100, 2006.
- OLARERIN-GEORGE, A. O.; HOGENESCH, J. B. Assessing the prevalence of mycoplasma contamination in cell culture via a survey of NCBI 's RNA-seq archive. **Nucleic acids research**, v. 43, n. 5, p. 2535–2542, 2015.
- OSAME M, USUKU K, IZUMO S, IJICHI N, A. H. E. A. HTLV-1 associated myelopathy, a new clinical entity. **The Lancet**, v. 1, p. 1031–2, 1986.
- PASCOALINO, B. S. et al. Zika antiviral chemotherapy : identification of drugs and promising starting points for drug discovery from an FDA-approved library [version 1 ; referees : 2 approved] Referee Status : n. 0, p. 1–17, 2016.
- PERCHER, F. et al. Mother-to-Child Transmission of HTLV-1 Epidemiological Aspects, mechanisms and Determinants of Mother-to-Child Transmission. **Viruses**, v. 40, n. 8, p. 1–9, 2016.
- PIÑON, J. D. et al. Human T-cell leukemia virus type 1 envelope glycoprotein gp46 interacts with cell surface heparan sulfate proteoglycans. **Journal of virology**, v. 77, n. 18, p. 9922–30, 2003.
- PIQUE, C.; JONES, K. S. Pathways of cell – cell transmission of HTLV-1. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1–14, 2012.
- POIESZ, B. J. et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 12, p. 7415–7419, 1980.
- RISS, T. L. et al. Cell viability assays. **Assay Guidance Manual**, p. 1–23, 2013.

- ROCHA-JÚNIOR, M. C. et al. Interleukin-18 and interferon-gamma polymorphisms are implicated on proviral load and susceptibility to human T-lymphotropic virus type 1 infection. **Tissue Antigens**, v. 80, n. 2, p. 143–150, 2012.
- ROMANELLI, L. C. F.; CARAMELLI, P.; PROIETTI, A. B. F. C. Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 (Htlv-1): When To Suspect Infection? **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 3, p. 340–347, 2010.
- SAITO, M. et al. Decreased human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus load and alteration in T cell phenotype after interferon-alpha therapy for HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **The Journal of infectious diseases**, v. 189, n. 1, p. 29–40, 2004.
- SAKUMA, T.; BARRY, M. A.; IKEDA, Y. Lentiviral vectors: basic to translational. **Biochem J**, v. 443, n. 3, p. 603–618, 2012.
- SALAHUDDIN, S. Z. et al. Restricted expression of human T-cell leukemia-lymphoma virus (HTLV) in transformed human umbilical cord blood lymphocytes. **Virology**, v. 129, n. 1, p. 51–64, 1983.
- SHIRABE, S. et al. Successful application of pentoxifylline in the treatment of HTLV-I associated myelopathy. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 151, n. 1, p. 97–101, 1997.
- SITTAMPALAM, G. S. et al. Assay Guidance Manual. n. Md, 2017.
- TAKENOUCHI, N. et al. GLUT1 Is Not the Primary Binding Receptor but Is Associated with Cell-to-Cell Transmission of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1. **Journal of Virology**, v. 81, n. 3, p. 1506–1510, 2007.
- TALLEDO, M. et al. Evaluation of host genetic and viral factors as surrogate markers for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in peruvian HTLV-1-infected patients. **J Med Virol**, v. 82, p. 460–466, 2010.
- TAYLOR, G. P. et al. Zidovudine plus lamivudine in Human T-Lymphotropic Virus type-I-associated myelopathy: a randomised trial. **Retrovirology**, v. 3, p. 63, 2006.
- THE, G. D. E.; BOMFORD, R. An HTLV-I Vaccine : Why , How , for Whom? **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 9, n. 5, p. 381–386, 1993.
- VERDONCK, K. et al. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. 266–281, 2007.
- VERNANT, J. C. et al. Endemic tropical spastic paraparesis associated with human T-lymphotropic virus type I: a clinical and seroepidemiological study of 25 cases. **Ann Neurol**, v. 21, n. 2, p. 123–130, 1987.

- WANG, F. et al. A facile method for alkaline phosphatase activity detection based on the turn-on fluorescence of resorufin. **Analytical Methods**, v. 4, n. 8, p. 1–6, 2010.
- WAYBRIGHT, T. J.; BRITT, J. R.; CLOUD, T. G. M. Overcoming Problems of Compound Storage in DMSO: Solvent and Process Alternatives. **Journal of biomolecular screening**, v. 14, n. 6, p. 708–715, 2009.
- WILLEMS, L. et al. Cooperation between bovine leukaemia virus transactivator protein and Ha-ras oncogene product in cellular transformation. **Embo J**, v. 9, n. 5, p. 1577–1581, 1990.
- YAMANO, Y.; SATO, T. Clinical pathophysiology of human T-lymphotropic virus-type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 389, p. 1–10, 2012.
- YOSHIDA, M. Discovery of HTLV-1 , the first human retrovirus , its unique regulatory mechanisms , and insights into pathogenesis. **Oncogene**, v. 24, p. 5931–5937, 2005.
- ZHANG, Z. et al. Quality control of cell-based high-throughput drug screening. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 2, n. 5, p. 429–438, 2012.