

ANA GABRIELA OLIVEIRA FERREIRA

**EFEITO DE COMPOSTOS MESOIÔNICOS SOBRE A
VIABILIDADE DE CÉLULAS DE LEUCEMIA**



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
2019**

CIP - Catalogação na Publicação

0368e Oliveira Ferreira, Ana Gabriela
EFEITO DE COMPOSTOS MESOIÔNICOS SOBRE A
VIABILIDADE DE CÉLULAS DE LEUCEMIA / Ana Gabriela
Oliveira Ferreira. -- Rio de Janeiro, 2019.
32 f.

Orientadora: Juliana Echevarria Neves de Lima.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2019.

1. HTLV-I. 2. CANCER. 3. LEUCEMIA. 4. COMPOSTOS
MESOIONICOS. I. Echevarria Neves de Lima, Juliana,
orient. II. Título.

Trabalho realizado no Departamento de Imunologia e Inflamação, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Juliana Echevarria Neves de Lima.

Dedico minha monografia à minha mãe (*In Memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus e ao messias Meishu-Sama pela oportunidade de voltar a Terra e cumprir esta missão. O que antes eu chamava a UFRJ de caixa de concreto, agora poder enxergar o belo em toda a minha volta e ver que aqui há mais do que paredes cinzas e alunos “robôs”. Há pessoas transbordando sentimento a fim de instruir, incentivar e desenvolver um futuro melhor através da pesquisa, estudo e qualidade, e foram muitas dessas pessoas que me incentivaram a jamais desistir de algo tão importante em prol da sociedade e não de nós mesmos. Portanto, este estudo e todos esses anos como aluna da UFRJ eu dedico e agradeço a vocês que acompanharam a minha trajetória e estiveram ao meu lado nos momentos bons e principalmente os difíceis.

Agradeço principalmente à minha mãe, que faleceu de câncer no ano anterior ao início da minha graduação, ela que sempre me incentivou a seguir os meus sonhos e jamais desistir independentemente do tamanho do fardo ou da opinião das pessoas. Me ensinou a ser uma pessoa melhor e cativar sempre os bons sentimentos, pois todos nós como seres humanos temos dias difíceis, mas também temos coração. Me mostrou, incansavelmente, o quanto as palavras têm poder e como fazer o bom uso delas, seja ensinando, apresentando ou conversando com alguém. E como o silêncio é essencial na maioria das vezes. Não por mostrar submissão, mas por ser capaz de absorver aquela informação e responder sem reação, com calma e coerência, sem perder nossa essência, caráter e personalidade.

Gostaria de agradecer principalmente a Professora Juliana Echevarria, e meus mais sinceros agradecimentos ao Professor Walter Martin Roland Oelemann, que me ajudou, orientou e apostou todas as fichas para que eu pudesse conquistar meu diploma. Obrigada por sempre se mostrarem tão atenciosos e preocupados. Obrigada principalmente por terem confiado, acreditado no meu potencial e não desistido de mim, quando eu mesma já não tinha esperanças. Deus os colocou em meu caminho quando eu mais precisei e não tenho palavras para agradecer ou demonstrar tal sentimento, pois foram eles que me mostraram e me fizeram enxergar o real motivo de eu ter cursado Microbiologia e Imunologia e o seu propósito, que além de serem brilhantes profissionais, são pessoas maravilhosas que se tornaram minha família dentro da UFRJ.

Agradeço a Coordenadora do Instituto de Microbiologia, Lígia Peçanha por toda a ajuda e paciência durante esse tempo da graduação. Agradeço ao secretário André Mandula, que não só me incentivaram todos os momentos possíveis a estudar, me dedicar e principalmente a não desistir. Agradeço à toda a equipe do Laboratório de Imunologia Básica e Aplicada que fizeram parte da minha vida por todo esse tempo, principalmente à minhas amigas de laboratório Thais Oliveira e Sabrina Maciel que tiveram toda a paciência do mundo comigo em minhas crises. Não tenho palavras que descrevam tal sentimento. Agradeço também aos órgãos financiadores, FAPERJ e CNPQ.

“Alegrem-se que virão coisas alegres.”
Messias Meishu Sama.

RESUMO**ANA GABRIELA OLIVEIRA FERREIRA****EFEITO DE COMPOSTOS MESOIÔNICOS SOBRE A VIABILIDADE DE
CÉLULAS DE LEUCEMIA****Orientadora: Juliana Echevarria Neves Lima.**

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

A importância do estudo de novos compostos a serem usados na quimioterapia é essencial, como a capacidade dos compostos mesoiônicos em induzir a morte de células infectadas por HTLV-1. Esses compostos que por sua vez são capazes de interagir com moléculas de carácter ácido nucleicas (DNA, RNA) e proteínas, segundo estudos realizados por Cardoso *et al* (2004) permite a fácil entrada e saídas destes das membranas celulares devido sua estrutura lipossolúvel. O presente trabalho teve como objetivo analisar a atuação de compostos mesoiônicos na viabilidade celular das diferentes linhagens de leucemia. Foram utilizadas 3 linhagens celulares, sendo elas: Jukart, MT2 e K562, sob tratamento de 5 diferentes compostos mesoiônicos. Sendo assim, pode-se dizer que os compostos mesoiônicos abordados possuem um grande potencial como agente terapêutico para casos de infecção por HTLV-1, assim como outras leucemias.

Palavras-chave: HTLV-1; Câncer; Leucemia.

ABSTRACT**ANAGABRIELA OLIVEIRA FERREIRA****EFFECT OF MESOIONIC COMPOUNDS ON THE VIAIBILITY OF LEUKEMIA CELLS****Orientadora: Juliana Echevarria Neves Lima.**

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

The importance of studying new compounds to be used in chemotherapy is essential, such as the ability of mesoionic compounds to induce death of HTLV-1-infected cells. These compounds, which are capable of interacting with nucleic acid molecules (DNA, RNA) and proteins, according to studies carried out by *Cardoso et al.* (2004), allow easy entry and exit of these membranes from the cell membranes due to their liposoluble structure. The present work had as objective to analyze the performance of mesoionic compounds in the cellular viability of the different leukemia strains. Three cell lines were used: Jukart, MT2 and K562, under treatment of 5 different mesoionic compounds. Thus, it can be said that the mesoionic compounds discussed have a great potential as a therapeutic agent for cases of HTLV-1 infection, as well as other leukemias.

Keywords: HTLV-1; Cancer; Leukemia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Seção transversal esquemática através de uma partícula retroviral com

Figura 2: Classificação de Baltimore em classes de I a VI.

Figura 3: Mapa geográfico estadual do Brasil e taxa de prevalência do HTLV-I e II dos anos de 1995 a 2000.

Figura 4: Distribuição geográfica mundial do HTLV, destacada em cor. Fonte: Adaptado de Proietti et al (2005).

Figura 5: Processo de carcinogênese e seus estágios.

Figura 6: Classificação do Exame Físico realizado para ATLL, adaptado de HEMORIO.

Figura 7: Metabolização do MTT, adaptado de ROCHE, 2008.

Figura 8. Efeito das substâncias MID 1 e MID 2 em linhagem celular Jurkat.

Figura 9: Efeito das substâncias MID 1 e MID 2 sobre as células da linhagem celular MT2.

Figura 10: Efeito das substâncias MID 1 e MID 5 sobre as células da linhagem celular K562.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação do efeito do composto MID1 sobre as diferentes linhagens.

INDICE

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	VIII
INDICE	IX
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Vírus	1
1.2 Retrovírus	1
1.3 HTLV-1.....	3
1.3.1 Origem do HTLV-I.....	3
1.3.2 Epidemiologia.....	3
1.3.3 Transmissão.....	6
1.3.4 Propriedades Gerais e Processo de Carcinogênese.....	7
1.4. ATLL.....	8
1.5 Tipos de Tratamento Convencionais.....	9
1.5.1 Quimioterapia para Tratamento da Leucemia T do Adulto (ATLL)	9
1.5.2 Compostos Mesoioônicos com Atividade Tumoral.....	10
2 JUSTIFICATIVA	11
3 OBJETIVOS	11
3.1. Objetivo geral.....	11
3.2. Objetivos específicos.....	11
4 METODOLOGIA	12
4.1. Cultura de Células	12
4.2. Ensaio de Citotoxicidade (MTT)	12
5 RESULTADOS	14
6 DISCUSSÃO	18
7 CONCLUSÃO	20
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vírus

A descoberta dos vírus ocorreu a partir dos estudos dos biólogos Dmitri Iwanowski em 1892 e Martinus Beijerinck em 1898, enfatizando que o agente causador da doença do fumo ou mais conhecida como doença do mosaico do tabaco, prevalente na época, tinha como agente causador um microrganismo microscópico e diferente das bactérias, anteriormente já conhecidas. Através de experimentos com filtros de porcelana, foi visto que a partir dos extratos das plantas doentes era possível uma transmissão da doença para os vegetais sadios, evidenciando que estes conseguiam ultrapassar os filtros. No decorrer dos estudos, em 1935 foram isolados cristais de vírus e observados ao microscópio, foi descrito então que a composição viral era principalmente proteica e com pequena quantidade de um único tipo de ácido nucleico, sendo DNA ou RNA. Com dimensões menores de 200nm de diâmetro, os vírus só podem ser observados por meio de microscópios eletrônicos e, uma das características mais importantes é que por serem acelulares, eles necessitam do metabolismo de outra célula para se replicarem (BRANDÃO, 2015).

1.2 Retrovírus

Os vírus, parasitas intracelulares obrigatórios, são fundamentalmente responsáveis por inúmeras infecções virais e, destas, aproximadamente 20% dos tumores malignos no mundo. Com isso, pode-se dizer que até 10% dos tumores malignos são causados pelos retrovírus (BLATTNER, WA, 1999).

De acordo com o Ministério da Saúde, o aparecimento e evolução dos tumores relacionados diretamente com os vírus têm tido maior atenção e dedicação por parte dos pesquisadores estimulando e ampliando estudos através de experimentos e isolamentos de vírus com animais oncogênicos, em especial retrovírus. Trabalhando o conceito e interação destes com o hospedeiro, a integração e evolução dos ácidos nucleicos, transmissão vertical, persistência e latência viral, assim como a indução de neoplasias.

Os retrovírus são caracterizados por sua capacidade de autorreplicação com exclusiva necessidade da maquinaria celular do hospedeiro, que segundo *Lodish et al*, (2000) este que pode ser ou não constituído por um capsídeo proteico envolvendo o material genético de origem desoxirribonucleica (DNA) ou ribonucleica (RNA) e de estrutura

formada por uma camada de lipídeos associada a diferentes proteínas e glicoproteínas (Figura 1).

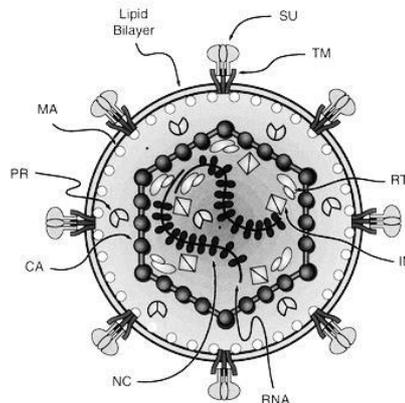


Figura 1: Seção transversal esquemática através de uma partícula retroviral com apresentação da formação de um envelope viral a partir de uma bicamada lipídica, presença de componentes de transmembrana (TM) e de superfície (SU) por ligações dissulfureto. Composta pelas proteínas estruturais não glicosiladas: de matriz (MA), do capsídeo (CA) e nucleocapsídeo (NC) presentes no interior da partícula. Presença das principais enzimas transcriptase reversa (RT) e integrase (IN), como produtos da região de codificação polimerase. Fonte: Adaptado Lodish *et al.*, 2000.

Conhecidos por sua capacidade de sintetizar uma fita de DNA a partir de uma fita molde de RNA, devido à presença da enzima transcriptase reversa, os retrovírus fazem parte do grupo VI segundo Baltimore (1971) (Figura 2). A classificação, criada por David Baltimore, trata de forma ordenada a partir de características do genoma e de transcrição do RNA mensageiro. Acrescenta-se que estes de fita simples RNA foram definidos e denominados de forma taxonômica a partir de sua estrutura, composição e propriedades replicativas (COFFIN, 1992a,b, 1996).

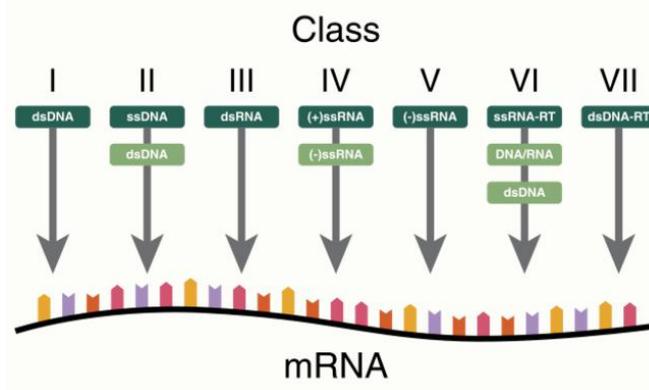


Figura 2: Classificação de Baltimore em classes de I a VI. I: DNA de fita dupla (Herpesvírus, Adenovírus); II: DNA de fita simples (Parvovírus); III: RNA de fita dupla e segmentado (Reovírus); IV: RNA de fita simples sentido positivo – RNA+ (Picovírus e Coronavírus); V: RNA de fita simples sentido negativo – RNA- (Rhabdovírus, Paramyxovírus); Classe VI: RNA com transcrição reversa (Retrovírus ou HIV).

1.3 HTLV-1

1.3.1 Origem do HTLV-I

A descoberta do (HTLV-I) se deu no início dos anos 80, pertence à família Retroviridae por ser composto por um genoma de fita simples de RNA e genes do tipo gag, pol, env e pX, similares aos demais retrovírus. Na época foi associado a doenças como leucemia ou linfoma de células-T (ATLL) e paraparesia espástica tropical (PET), pois segundo estudos, os indivíduos sintomáticos desenvolviam PET ou ATLL de maneira que a fisiopatogenia não fosse alterada, com isso a maioria dos infectados pelo HTLV-I, aproximadamente 95%, permaneceu de forma assintomática ao longo da vida (POIESZ, B. J. *et al.*, 1980). Dessa forma, há aproximadamente 30 anos atrás, no Japão, foi considerada a descrição do termo leucemia a partir da ATLL. Pouco tempo depois, o retrovírus foi isolado, descrito e considerado como HTLV-I o causador principal da doença (Watanabe T., 1997).

A infecção causada pelo vírus da leucemia de células T humanas 1 (HTLV-I) pode associar-se a diversas doenças causadas em seres humanos, na qual estas dividem-se em dois grandes grupos: neoplásicas, podendo incluir o linfoma de células adultas (ATLL) e as não-neoplásicas, no caso as doenças inflamatórias (Watanabe T., 1997). Foi visto também que essa associação do HTLV-I com ATLL e PET eram bem estabelecidas e com isso foi necessária uma maior atenção do governo e de pesquisadores, intensificando estudos com outras possíveis associações a outras doenças do tipo reumatológicas, do trato respiratório, urinário e aquelas com maior susceptibilidade a doenças do tipo infecciosas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Assim, o Ministério da Saúde (2013) descreveu então que os principais meios de transmissão do vírus eram a partir do sexo, sangue e transfusão de hemocomponentes infectados. Embora ainda não tivesse conhecimento específico de fatores que pudessem promover ou inibir qualquer via de transmissão.

1.3.2 Epidemiologia

A infecção pelo HTLV-I é considerada endêmica em várias regiões do globo, desde o Japão, América do Sul, Caribe e alguns países da África (SANTOS *et al.*, 2005). No Brasil, pode-se dizer que a cidade com maior prevalência é Salvador. Segundo dados, aproximadamente 1,7% da população possui o vírus. Apesar do conhecimento e boa definição da distribuição geográfica, ainda não se sabe o motivo de áreas de alta prevalência

estarem próximas ou juntas das áreas de menor prevalência no mesmo país, fazendo com que a real prevalência seja conhecida, assim como ainda não há estudo concreto da epidemiologia com base em metodologias adequadas e referência populacional sobre a infecção (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

As características epidemiológicas no Brasil são avaliadas de acordo com a idade, visto que a soropositividade aumenta, assim como aqueles indivíduos com comportamento de risco ou maior exposição a doenças sexualmente transmissíveis, indivíduos transplantados e usuários de drogas, principalmente as injetáveis. O HTLV-I no país está presente em todas as regiões, sendo menor prevalência no norte e sul, porém maior nas regiões sudeste e estado da Bahia. O Brasil, de acordo com sua densidade geográfica e populacional, tem a capacidade de abrigar um número considerável de indivíduos soropositivos por HTLV-I/II. Dessa forma, a triagem sorológica para candidatos à doação ao banco de sangue é obrigatória no país e a responsabilidade pela coleta é a rede de hemocentros, de aproximadamente 80% do sangue doado. Foi realizado um estudo na cidade do Rio de Janeiro, onde aproximadamente 4,8% das pessoas infectadas para cada 1000 doadores de sangue (Catalan-Soares *et al.*, 2005) (Figura 3).

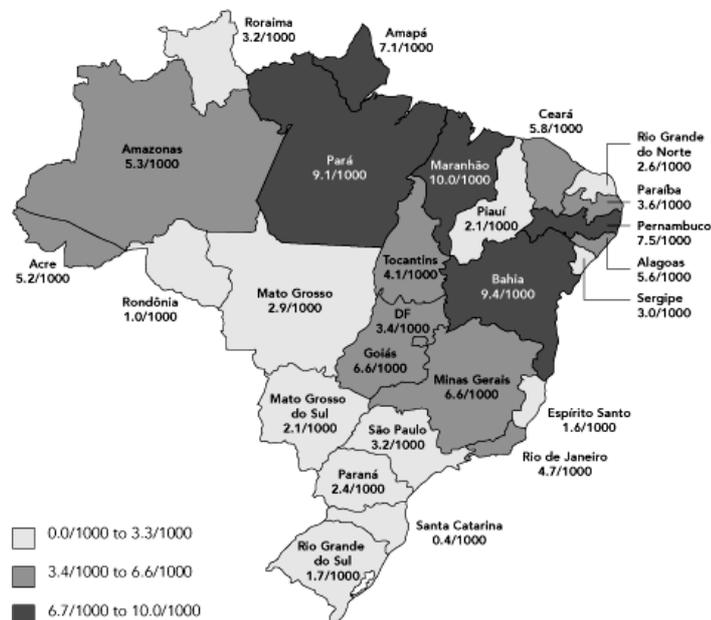


Figura 3: Mapa geográfico estadual do Brasil e taxa de prevalência do HTLV-I e II dos anos de 1995 a 2000. Relação de indivíduos doadores do banco de sangue e indivíduos infectados. Fonte: Adaptado de Catalan-Soares *et al.*, 2005.

Dessa forma é possível notar características diferentes sobre a distribuição geográfica da infecção pelo HTLV-I, sendo estas apresentadas em bolsões, sendo áreas de maiores prevalências contornadas por áreas de prevalências menores do vírus. Estudos afirmam que dados epidemiológicos de maior volume são provenientes de casos clínicos associados ao HTLV-I no Japão, Ilhas Caribenhas, África e Américas Central e Sul. Que podem ser consideradas regiões de alta prevalência aquelas com mais de 5% de soropositividade para o vírus, média prevalência seria de 5% a 1% e baixa prevalência para menor de 1%.

A primeira área conhecida como endêmica para o HTLV-I é o Japão, no país, a soro prevalência atinge 37% da soropositividade. No norte da região de Hokkaido as estatísticas já são outras, consta que 45% da população é infectada pelo HTLV-I, mesmo que parte da região tenha baixa prevalência, assim como em outros países da Ásia. Já o Caribe, é classificado como a segunda área mais endêmica e na Jamaica, dados mostram que a soro prevalência é de 5%.

Um estudo realizado em sete países da África apresentou uma disposição de crescimento da taxa de soroprevalência do Norte até o Sul, alternando de 17% na Tanzânia à 0,6% no Marrocos. Essa taxa manifesta-se baixa na Europa exclusivas a determinados grupos, que se transferem de áreas endêmicas. A soroprevalência também se mostrou baixa na América do Norte. Outro estudo produzido com amostras de sangue de oito hemocentros distintos dos EUA, totalizando 39.898 doadores analisados, a soro prevalência se deu em 0,025%. Posteriormente, um estudo feito na América do Sul, mais precisamente na Venezuela, foi considerado um soro prevalência de 6,8% em uma amostra geral dos habitantes, porém, na Colômbia, apresentou-se variação de soro prevalência entre pessoas que moravam em área costeira, na qual a taxa mostrou-se ser de 4,3%, e em área montanhosa, de 0,6%. Já no Chile, foi possível observar a dominância de 0,73% entre 954 doadores de sangue, e na Argentina, de 0,07% em 12.891 doadores.

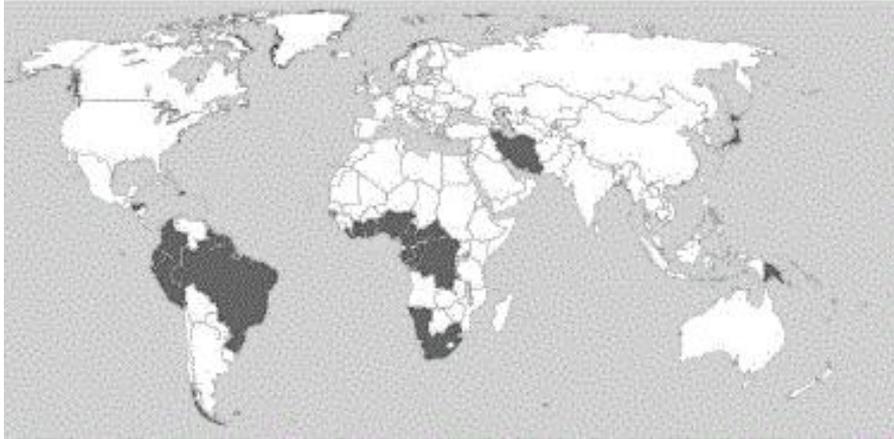


Figura 4: Distribuição geográfica mundial do HTLV, apresentada em cor. Fonte: Adaptado de *Proietti et al* (2005).

Foi realizado também um estudo no Brasil a partir de uma metodologia única de coleta, transporte e testes com 5.842 amostras para o vírus HTLV-I/II e o resultado da positividade nas capitais foi de aproximadamente: Florianópolis com 0,08%; Manaus com 0,08%; Recife com 0,33%; São Paulo com 0,30%; Minas Gerais com 0,32%; Rio de Janeiro com 0,33%; Salvador com 1,35% e a taxa de 0,41% foi classificada como a prevalência média do vírus. O Ministério da Saúde (2013) julga importante ressaltar que apesar dos dados apresentados, a soro prevalência média dos doadores de sangue aptos no país é de 20 a 100 vezes maior que em outras partes do globo.

1.3.3 Transmissão

O HTLV-1 pode ser transmitido, especialmente por três modos. O primeiro, e considerado o menos eficiente, é nomeado de sexual ou via horizontal, entretanto a transmissão que provém do homem para a mulher acontece em torno de quatro vezes mais quando comparado à transmissão da mulher para o homem. No segundo modo acontece o deslocamento de linfócitos maternos infectados para o neonato, principalmente durante o processo de amamentação e pelo canal de parto, é nomeado de perinatal ou via vertical e é apontado como o modo mais frequente. Finalmente, o terceiro modo, chamado de sanguínea, corresponde à forma mais eficaz de contaminação do vírus, acontecendo por meio do uso de fômites, transplantes de órgãos ou transfusões sanguíneas (Bittencourt, 2008) (Glória *et al.*, 2015).

1.3.4 Propriedades Gerais e Processo de Carcinogênese

Segundo *Ferreira et al.* (2010), não é possível a integração direta do vírus de RNA no genoma hospedeiro devido seu genoma ser composto por ácidos nucleicos do tipo RNA. Com isso, há a conversão do RNA viral em uma cópia de DNA por meio da enzima transcriptase reversa, por sua vez codificada pelo vírus e utilizando o RNA como modelo. Assim, chega-se ao resultado no próviro. Então o genoma hospedeiro integra-se ao próviro e, juntos, são replicados. Os vírus de RNA que têm o potencial carcinógeno são nomeados de oncomavírus e tem a capacidade de causar leucemia em diversas espécies de animais, inclusive mamíferos.

Por ser um retrovírus, com a presença e ativação da enzima transcriptase reversa (TR), é possível deixar uma cópia do seu material genético na célula hospedeira e que este seja disseminado a partir da multiplicação celular e o processo de carcinogênese.

Para a oncogênese são necessários que alguns eventos celulares aconteçam, para que as células sejam capazes de: ser auto-suficiente a fatores de crescimento, evadam a apoptose, ter potencial replicativo ilimitado, ser capaz de invasão e metastização (Jeang, 2010). Outros oncovírus possuem em seu genoma oncogenes v-onc que são derivados de c-onc encontrados no genoma animal, sendo as proteínas expressas por estes genes as responsáveis pela transformação celular. Porém, ao contrário do que acontece com os outros retrovírus oncogênicos, no HTLV-1 não foi encontrado gene v-onc (Matsuoka & Jeang, 2011). No caso da infecção pelo HTLV-I proteína viral Tax é importante na propagação da infecção viral e no processo de transformação celular. A Tax é responsável por melhorar a transcrição de genes virais e celulares, promovendo a proliferação celular através da estimulação de vários fatores de crescimento. Além disso, essa proteína induz a desregulação de genes supressores de tumor.

Após um longo período latência, a leucemia de células-T adultas (ATL) ocorre em 1 por 1000 portadores a cada ano, resultando em 2500-3000 casos por ano em todo o mundo e, conseqüentemente mais da metade das malignidades linfoides adultas em áreas endêmicas. Sendo assim, aproximadamente 5% daqueles que apresentam infecção por HTLV-I conseguem desenvolver algum tipo de doença ou sintomas relacionados ao vírus. Por outro lado, a maioria dos indivíduos infectados permanecem assintomáticos e com capacidade de transmissão do vírus (Fundação Hemominas, 2007).

Os retrovírus oncogênicos na maioria das vezes atuam como carcinógenos naturais, ou seja, induzem uma modificação genética celular que posteriormente afeta todas as outras

no decorrer das divisões celulares. Os estudos e pesquisas de retrovírus tem se aprofundado e os estudados são: o vírus do sarcoma de Rous (RSV), Tumor de mama de ratinho e vírus de leucemia murina (MMTV e MLV) e o vírus da leucemia de células-T humanas 1 (HTLV) (Coffin JM *et al.*, 1997). O INCA (1996) descreve que o processo de carcinogênese se dá lentamente e ocorre em 3 estágios, sendo eles: estágio de iniciação, promoção e progressão, estes apresentados na figura 5.



Figura 5: Processo de carcinogênese e seus estágios. Fonte: Adaptado de MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. COORDENAÇÃO NACIONAL DE CONTROLE DE TABAGISMO - CONTAPP. "Falando Sobre Câncer e Seus Fatores de Risco". Rio de Janeiro, 1996.

1.4. ATLL

A leucemia de células T do adulto foi primeiramente descrita em Kyoto no Japão, no ano de 1977 (UCHIYAMA *et al.*, 1977). Além da presença de anticorpos contra o HTLV-I nos pacientes, todas as células leucêmicas possuem o genoma pró-viral integrado ao seu DNA. A Leucemia de células-T do adulto (ATLL) tem prevalência de 1% a 5% dos portadores da infecção são classificados na idade adulta, já aqueles infectados durante a infância ou através de uma transmissão materno-infantil, são capazes de apresentar maior risco e desenvolvimento de ATLL. Segundo estudos realizados pelo HEMORIO, são poucos os indivíduos infectados pelo HTLV-I que apresentam através de predisposição genética, o desenvolvimento da doença a partir de um crescimento celular desordenado, mesmo ainda afirmando que existem várias formas de ATLL, das brandas e assintomáticas até as mais graves. As principais classificações encontradas em exames físicos estão relacionadas na figura 6.

Os indivíduos infectados pelo HTLV-I podem desenvolver linfomas. O termo linfoma se dá principalmente na caracterização de um grupo de doenças de origem em células do sistema linfático, composto principalmente por vasos linfáticos, gânglios linfáticos (linfonodos), linfócitos e órgãos de importância como timo, baço e as tonsilas

(amígdalas). Sua principal função é o transporte de substâncias e células do sistema imune por todo o organismo. Os sintomas encontrados são lesões na pele com aparecimento de placas avermelhadas, seguido de coceiras e descamações. Há também variação devido ao aumento dos gânglios linfáticos na região do pescoço, assim como axila e virilhas e surgimento de barriga inchada devido ao tamanho/aumento do baço e do fígado, e casos de anemia, febre, pneumonia e tosse.

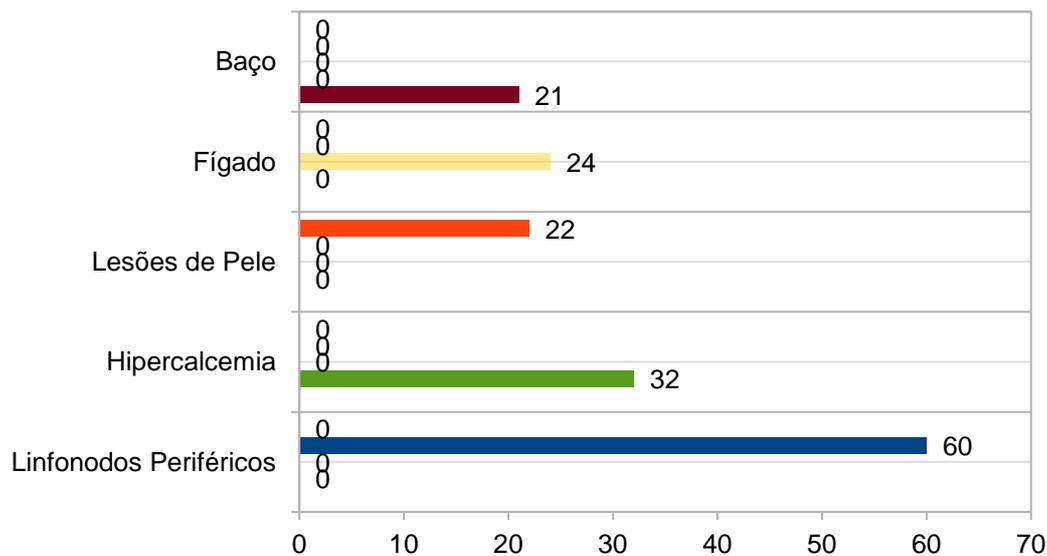


Figura 6: Classificação do Exame Físico realizado para ATLL, adaptado de HEMORIO.

1.5 Tipos de Tratamento Convencionais

1.5.1 Quimioterapia para Tratamento da Leucemia T do Adulto (ATLL)

O tratamento dos indivíduos portadores de leucemias baseia-se na tentativa de eliminar todas as células tumorais no corpo. Tumores sólidos podem ser removidos cirurgicamente, mas as leucemias encontram-se dispersas na circulação e na medula óssea, o que torna mais difícil a eliminação de todas estas células. Em geral, a terapia contra essas neoplasias é uma poli quimioterapia agressiva até que as células leucêmicas não são mais detectadas (Hemorio/Protocolos Clínicos Das Doenças Hematológicas, 2011).

No Brasil, o tratamento da ATLL baseia-se no uso de interferon e zidovudine (AZT), em combinação com o protocolo CHOP [Ciclofosfamida, Hidroxidoxorubicina (doxorubicina), Vincristina (Oncovin), Prednisona] (Hemorio/ Protocolos Clínicos Das Doenças Hematológicas). Os principais problemas que dificultam os tratamentos das ATLL

são o status de imunossupressão no qual se encontra o paciente antes e depois do desenvolvimento da doença, o que acaba por contribuir para aparecimento de infecções oportunistas. Além disso, as células apresentam um fenótipo de resistência intrínseco, que é conferido através da expressão de diferentes mecanismos de resistência aos quimioterápicos convencionais (Ishitsuka & Tamura, 2008). Assim, o protocolo de quimioterapia baseia-se na inibição da infecção de novas células e indução a morte das células tumorais.

Foi realizado um estudo pela Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (2002), no qual é descrito que medicamentos utilizados no tratamento de espasticidade são derivados de GABA, sendo benzodiazepínicos com ação ansiolítica e sedativa induzindo um relaxamento muscular, ministrados por doses individualizadas. Visto que, outros medicamentos como antidepressivos, analgésicos e derivados imidazólicos também são utilizados. Apesar de a dor neuropática ser um sintoma crônico não se sabe ainda quais os mecanismos envolvidos, fugindo ainda para uma terapia singular com anti-álgicos e antidepressivos no intuito de amenizar a dor.

1.5.2 Compostos Mesoiónicos com Atividade Tumoral

Os compostos mesoiônicos possuem características estruturais muito especiais e de interesse para os pesquisadores no campo da química medicinal. A estrutura dotada de cargas positivas e negativas bem separadas possibilita a interação com várias biomoléculas, entre as quais os ácidos nucleicos e proteínas, fator importante que contribui ao grande potencial desses compostos como agentes medicinais (VILPO *et al.*, 1997). A característica básica dos compostos mesoiônicos é o fato de não poderem ser representados por apenas uma estrutura totalmente covalente ou iônica, possuem estruturas moleculares planas e com grande separação da carga positiva e negativa.

Estudos realizados com derivados das classes 1,3,4-tiadiazólio-2-aminidas, 1,3,4-triazólio-5-tiolatos e 1,2,3-oxadiazólio-5-olatos se mostraram muito promissores, sendo observada a inibição do crescimento dos tumores e o aumento significativo da sobrevivência dos animais tratados. Esses ensaios foram realizados utilizando os modelos de carcinoma de Ehrlich, sarcoma 180, leucemia L1210, leucemia K562, linfoma Daudi, tumor B10MC, melanoma murino B16-F10 e os melanomas humanos MEL-85, SK-MEL, A2058 e ME-WO, extremamente agressivos (GRYNBERG *et al.*, 1997; CADENA *et al.*, 1998; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2003; SENF-RIBEIRO *et al.*, 2004a; SENF-RIBEIRO *et al.*, 2004b, MENDES-SANCHES *et al.*, 2009; ROMÃO *et al.*, 2009; REIS *et al.*, 2011).

2 JUSTIFICATIVA

Estudos descritos por Paiva e Casseb (2015), relatam que a infecção por HTLV-1, apesar de ser uma doença negligenciada no Brasil, ainda não pode ser considerada como um problema de saúde pública. A Leucemia em células T de adulto é bem caracterizada pela presença de proliferação de células tumorais, caracterizando a doença em meio aos poucos estudos e mecanismos relacionados a fins terapêuticos. Estudos que visam identificar uma nova substância que seja capaz de inibir significativamente a viabilidade de células tumorais pode significar um novo tratamento.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O projeto tem como objetivo analisar a atuação de compostos mesoiônicos na viabilidade de células das linhagens de leucemia.

3.2. Objetivos específicos

- 1º.** Analisar a viabilidade em células da linhagem permanentemente infectada pelo HTLV-1, MT-2, cultivada na presença de compostos mesoiônicos;
- 2º.** Avaliar a viabilidade em células da linhagem de leucemia T, Jurkat, cultivada na presença de compostos mesoiônicos;
- 3º.** Avaliar a viabilidade em células da linhagem de eritroleucemia, K562, cultivada na presença de compostos mesoiônicos.

4 METODOLOGIA

4.1. Cultura de Células

Este trabalho utilizou como modelo as linhagens celulares K562, Jurkat e MT-2. A linhagem celular JURKAT, segundo *Schneider et. al.* (1977) proveniente de leucemia linfocítica aguda, isolada de sangue periférico de adolescente do sexo masculino. As células Jurkat foram gentilmente cedidas pela Dra. Ana Lúcia Giannini do Departamento de Genética do Instituto de Biologia da UFRJ. A linhagem MT-2, segundo *Miyoshi et al.*, (1981) é derivada de co-cultivo de células provenientes de cordão umbilical de bebê do sexo masculino com linfócitos T provenientes de paciente do sexo feminino diagnosticada com leucemia T do adulto. Essa linhagem foi gentilmente cedida pelo Dr. Otávio Espindola do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ - RJ). A linhagem K562 é caracterizada por conferir multirresistência a fármacos devido a expressão da glicoproteína P, segundo *Rumjanek* (2000). As células K562 foram gentilmente cedidas pela Dra. Vivian M. Rumjanek do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis da UFRJ.

O cultivo das linhagens celulares foi realizado em meio RPMI 1640 (Lonza ou LGC Biotechnology) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Cultilab), inativado penicilina (1000 UI/mL, LGC Biotechnology) e estreptomicina (1000 UI/mL, LGC Biotechnology), pH 7,4. As células foram mantidas em atmosfera úmida à 37°C com 5% CO₂. Foram realizadas passagens das células em intervalos de 3 a 4 dias.

4.2. Ensaio de Citotoxicidade (MTT)

A citotoxicidade das células foi determinada a partir do teste MTT (3-{4,5-dimetiltiazol-2-il} -2,5-difeniltetrazolio brometo) (Sigma-Aldrich). O MTT (sal de tetrazólio) é convertido em sal de formazana, em células vivas através da atividade da succinato desidrogenase mitocondrial. A enzima induz a formação de cristais de coloração azulada (sal de formazana) nas células viáveis, que ao serem dissolvidos, permite sua quantificação por espectrofotometria, permitindo avaliar a capacidade redutora da célula (MOSMANN, 1983), representado pela figura 7, a metabolização do MTT.

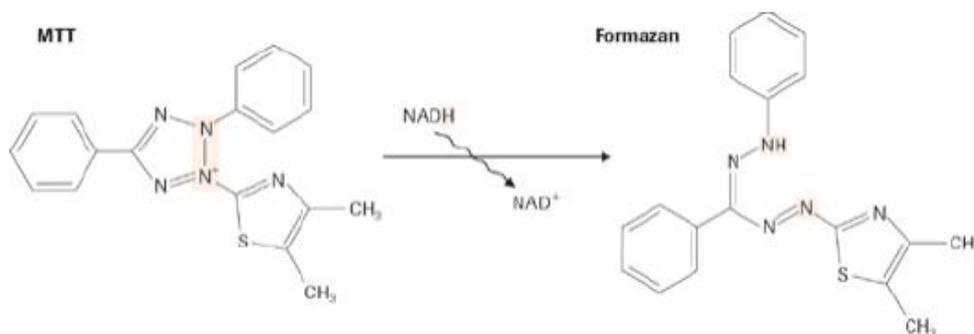


Figura 7: Metabolização do MTT, adaptado de ROCHE, 2008.

Os ensaios foram realizados em triplicata em experimentos independentes para cada linhagem. As células foram semeadas em placas de 96 poços, sendo 10^4 células/poço e incubadas em meio RPMI + 10% de SFB na presença ou ausência de diferentes concentrações das substâncias avaliadas, sendo elas: 50 μM ; 25 μM ; 12,5 μM ; 6,25 μM ; 3,125 μM e 1,56 μM .

As placas foram incubadas por 72 horas em atmosfera úmida a 37°C com CO₂ 5%. Posteriormente, as placas contendo as culturas celulares centrifugada a 200 x g por 7 minutos. O meio com MTT foi retirado e os cristais de formazana formados foram dissolvidos em 200 μL de DMSO (solvente dos mesoiônicos). O valor de absorbância foi medido a um comprimento de onda de 490 nm (SpectraMax® Paradigm®) e a viabilidade das células comparadas ao controle sem as substâncias teste foi calculada de acordo com a equação:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \left(\frac{\text{Absorbância da Amostra}}{\text{Absorbância do controle negativo}} \right) * 100$$

5 RESULTADOS

Para investigar a capacidade dos compostos mesoiônicos em induzir a morte de células *in vitro*, utilizamos as linhagens celulares de leucemia humanas: Jurkat (leucemia linfocítica aguda), MT2 (leucemia T do adulto) e K562 (eritroleucemia humana). As células foram incubadas com diferentes concentrações de compostos mesoiônicos por 72h. Usando um ensaio MTT, observamos que os compostos MID1 e MID2 induziram a morte celular em células Jurkat. Na figura 8 observamos que o aumento da concentração da substância MID1 inoculada não é capaz de interferir na susceptibilidade à morte induzida pela substância se mantendo em torno de 60%. Entretanto, em comparação com a substância MID2, não observamos diferença significativa na concentração de 1,56 μM , havendo um discreto efeito citotóxico.

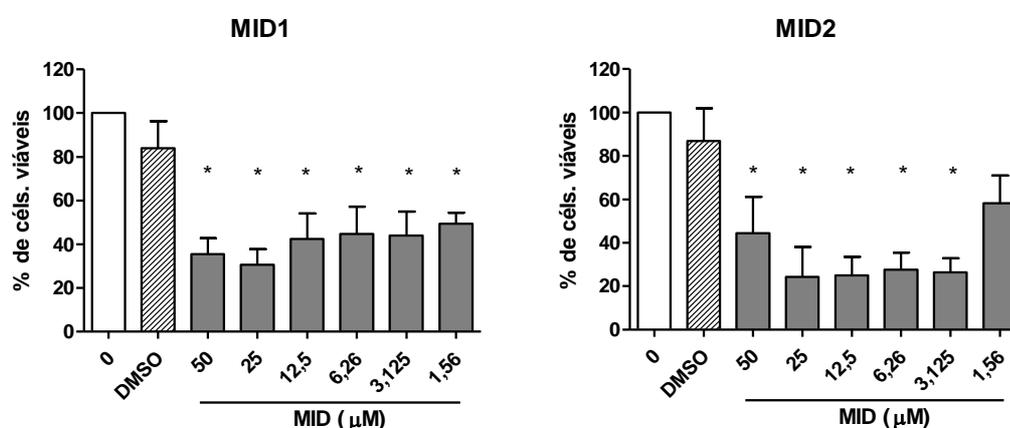


Figura 8. Efeito das substâncias MID 1 e MID 2 em linhagem celular Jurkat. 10^4 células/mL foram incubadas na presença ou ausência das substâncias MID1 e 2 (1,56 – 50 μM), ou do veículo DMSO (1%; v/v) por 72h a 37 °C com 5% de CO_2 . Após este período foi adicionado MTT às células, incubando-as por mais 3 horas sob as mesmas condições. As células foram centrifugadas por 7 minutos a 200g e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foi adicionado DMSO para dissolver os cristais formados como resultado da redução do MTT. A densidade óptica foi obtida a partir da leitura no comprimento de onda de 490 nm. Os valores dos gráficos são a média \pm desvio padrão de 2 experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$ em relação ao DMSO e ao 0 (células apenas cultivadas com meio).

Ainda comparando as substâncias MID1 e MID2, a figura 9 representa os resultados com a linhagem celular MT2 infectada pelo vírus HTLV-1. Os resultados sugerem que as células MT2 são mais resistentes a esses compostos do que as células Jurkat. Apenas as concentrações de 50, 25 e 12,5 μM de MID1 foram capazes de reduzir o percentual de células viáveis. Além disso, a concentração de 50 μM de MID1 teve melhor atuação do que a mesma concentração em MID2.

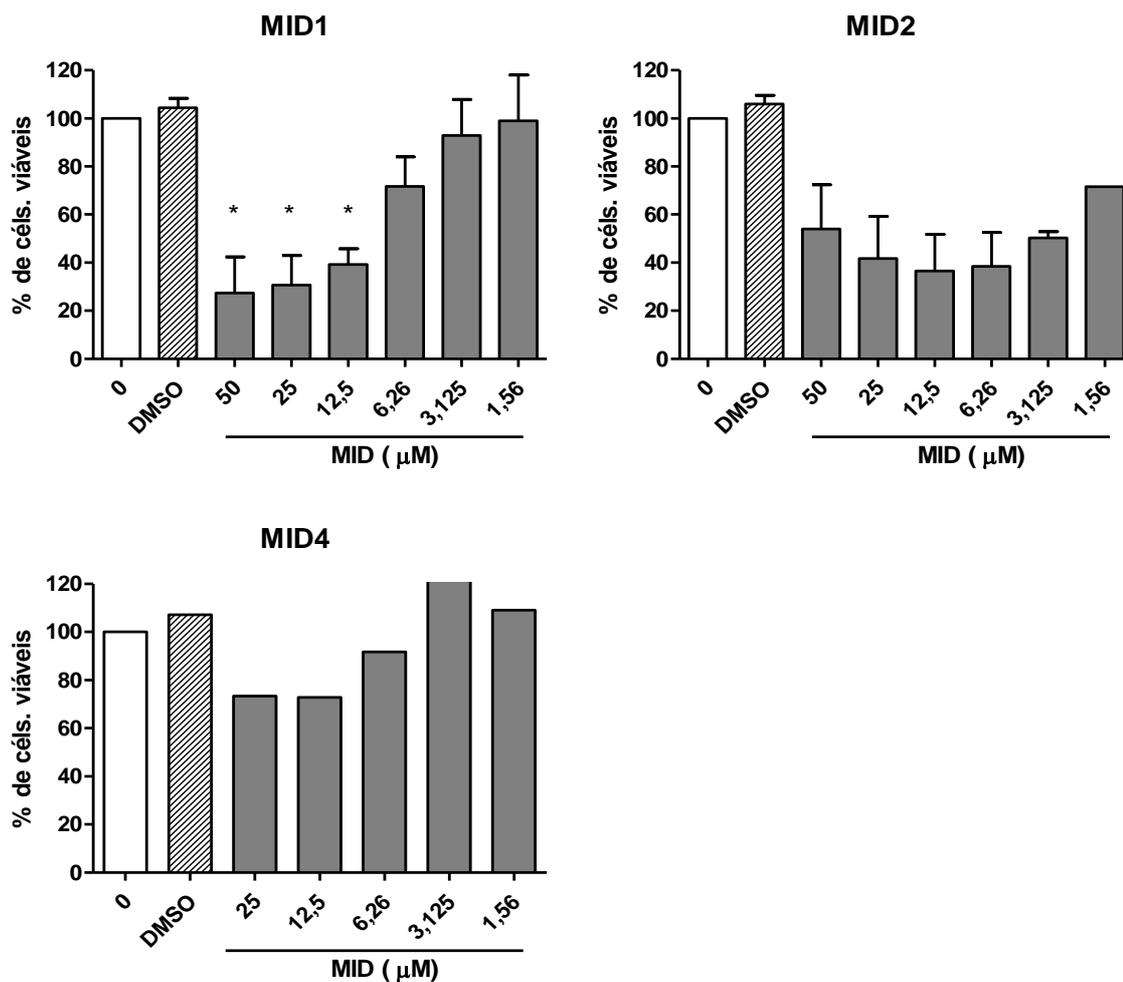


Figura 9: Efeito das substâncias MID 1 e MID 2 sobre as células da linhagem celular MT2. 10^4 células/mL foram incubadas na presença ou ausência das substâncias MID1 e 2 (1,56 – 50 μM), ou do veículo DMSO (1%; v/v) por 72h a 37 °C com 5% de CO_2 . Após este período foi adicionado MTT às células, incubando-as por mais 3 horas sob as mesmas condições. As células foram centrifugadas por 7 minutos a 200g e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foi adicionado DMSO para dissolver os cristais formados como resultado da redução do MTT. A densidade óptica foi obtida a partir da leitura no comprimento de onda de 490 nm. Os valores dos gráficos são a média \pm desvio padrão de 3 experimentos realizados em triplicata (MID1); média de 2 experimentos realizados em triplicata (MID2); e média de 1 experimento realizado em triplicata (MID5 e MID4). * $p < 0,05$ em relação ao DMSO e ao 0 (células apenas cultivadas com meio).

Outra linhagem celular utilizada nos experimentos foi a K562, que diferente das demais, pois trata-se de uma célula de origem mielóide. Notamos que a substância MID1 induz a morte celular de forma concentração dependente (Figura 10), pois as concentrações de 50, 25 e 12,5 μM (entre 95% a 91% de morte) foram induziram significativamente maior redução de viabilidade em comparação às concentrações de 6,25, 3.125 e 1,56 μM (entre 70% a 15% de morte). Já com a substância MID5, com apenas uma análise realizada como resultado preliminar, observamos que a atividade da substância se comporta de forma diferente, as concentrações de 6,26 e 12 μM foram as que apresentaram maior capacidade de indução de morte nas células K562 cerca de 85% (Figura 10).

Outro resultado preliminar consiste nas análises realizadas com a substância referida MID4. Quando incubada nas células da linhagem K562, o resultado obtido foi semelhante ao obtido com o composto MID5. As concentrações de 6,26 e 12 μM apresentaram maior capacidade de indução de morte nas células K562 aproximadamente 70 e 60% respectivamente.

Ao comparar o efeito do composto MID1 sobre as diferentes linhagens através dos valores obtidos de IC_{50} podemos sugerir que as células K562 sejam mais sensíveis ao efeito desse composto em comparação às células Jurkat e MT2 (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação do efeito do composto MID1 sobre as diferentes linhagens.

Composto	Linhagens celulares		
	Jurkat – IC_{50}	MT2 – IC_{50}	K562 – IC_{50}
MID1	5,18 μM	7,26 μM	4,38 μM

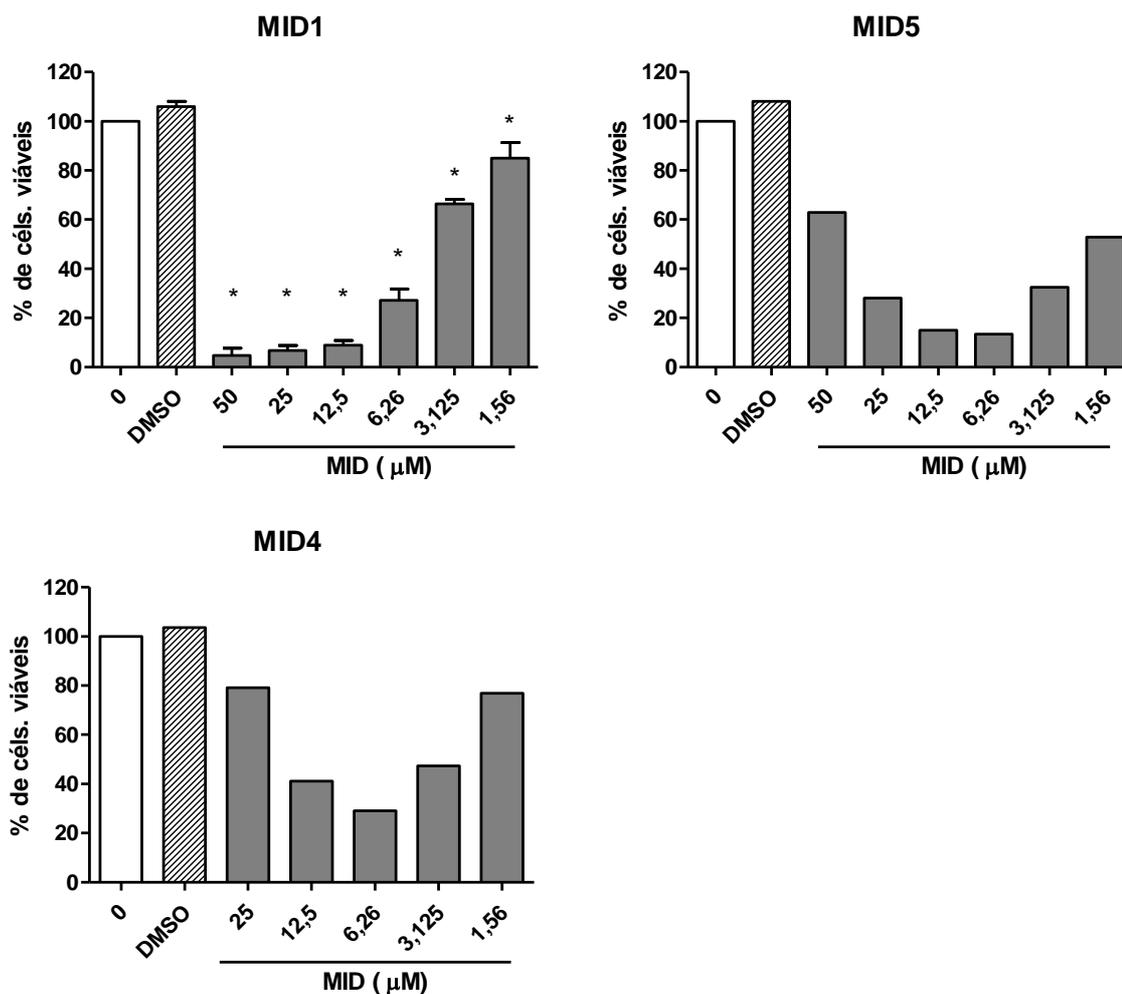


Figura 10: Efeito das substâncias MID 1 e MID 5 sobre as células da linhagem celular K562. 10^4 células/mL foram incubadas na presença ou ausência das substâncias MID1 e 2 (1,56 – 50 μM), ou do veículo DMSO (1%; v/v) por 72h a 37 °C com 5% de CO_2 . Após este período foi adicionado MTT às células, incubando-as por mais 3 horas sob as mesmas condições. As células foram centrifugadas por 7 minutos a 200g e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foi adicionado DMSO para dissolver os cristais formados como resultado da redução do MTT. A densidade óptica foi obtida a partir da leitura no comprimento de onda de 490 nm. Os valores dos gráficos são a média \pm desvio padrão de 3 experimentos realizados em triplicata (MID1); e média de 1 experimento realizado em triplicata (MID5 e MID4).

6 DISCUSSÃO

Segundo o Instituto Oncoguia (2018), foi descrito o tratamento quimioterápico como agente agressor não só das células infectadas como toda a composição celular do sistema imune do indivíduo, este sendo administrado via oral ou intravenoso, combinado ou não com outros tipos de medicamentos. Dessa forma, a importância do estudo de novos compostos a serem utilizados na quimioterapia é essencial, assim como a capacidade dos compostos mesoiônicos em induzir a morte de células infectadas por HTLV-1. Esses compostos que por sua vez são capazes de interagir com moléculas de carácter ácido nucleicas (DNA, RNA) e proteínas, segundo estudos realizados por Cardoso *et al* (2004) permite a fácil entrada e saída destes das membranas celulares devido sua estrutura lipossolúvel.

Nossos dados demonstraram que a substância MID1 e MID2 quando inoculada na célula controle (Jukart), sofreu maior morte celular quando comparada a célula MT2 infectada, que por sua vez, apresentou resistência a droga e maior viabilidade celular (figura 8). Visto que um indivíduo normal é considerado saudável por não ter entrado em contato com o antígeno, doses maiores da droga devem ser administradas para induzir a morte celular da minha célula infectada. E estes resultados preliminares não são diferentes dos demais tipos de câncer, estudos mostram que em casos de melanoma por exemplo, a resistência terapêutica é alta em decorrência do grau de agressividade da doença (Tucker, 2008; Greinert, 2009) porém, os tratamentos com compostos mesoiônicos são promissores.

Observamos que ao tratar a célula MT2 com as substâncias MID1, MID2 e MID4 (figura 9), a morte celular apresentou característica dose-dependente, ou seja, quando aumentamos a concentração inoculada, houve mais morte celular. Um aspecto positivo pois os resultados mostraram que o composto promove uma atividade antitumoral respondendo a diminuição da viabilidade celular. Almeida *et al* (2005) explica que um tumor de aproximadamente 1g possui cerca de 10⁹ células, e que em cada ciclo de tratamento quimioterápico aproximadamente 99% das células sofrem morte celular. Um paciente infectado com HTLV-1 quando submetido a um tratamento com doses elevadas do composto pode-se observar a eficiência da droga e sua capacidade de matar as células infectadas pelos vírus. Dessa forma, é sugerido que quanto mais concentrada for a dose do

composto mesoiônico para tratamento, mais células apresentarão um efeito citotóxico induzindo a morte celular.

Na tabela 1, foi observada a sensibilidade celular frente a droga nas diferentes linhagens celulares. Fazendo uma comparação entre as linhagens MT2 e K562, o tratamento utilizado tem a mesma efetividade quando administrado em altas e baixas concentrações, ou seja, se a gravidade da infecção for alta ou baixa, ainda assim haverá um efeito positivo no tratamento com compostos mesoiônicos.

As pessoas denominam como verdadeira saúde aqueles com células viáveis, porém a verdadeira saúde se estabelece naqueles que mesmo com toxinas ou infectados pelo vírus, ainda estão saudáveis e conseguem manter suas atividades (Mokiti Okada, 1935). A questão é que, as células precisam estar viáveis para que um vírus consiga se estabelecer naquele organismo, naquela célula e dessa maneira iniciar sua replicação. Ou seja, a minha célula infectada é mais viável e conseqüentemente mais resistente por carregar o vírus, isso faz com que ela necessite de doses maiores da droga para levar a uma morte celular. Isso significa que células de diferentes linhagens, neste caso MT2 e K562, infectadas pelo vírus HTLV-I, apesar de terem alta ou baixa sensibilidade ao composto mesoiônico respectivamente, ao entrarem em contato com compostos mesoiônicos tem a perda de sua viabilidade celular e conseqüentemente sofre morte ou apoptose.

Sendo assim, os compostos mesoiônicos abordados possuem um grande potencial como agente terapêutico e desde os anos 80, sua atividade antitumoral vem sendo registrada na bibliografia (LIMA *et al*, 1986) para casos de infecção por HTLV-1 e entre outros tipos de leucemias.

7 CONCLUSÃO

As diversas atividades e interações biológicas dos compostos mesoiônicos, permitiu que desde a década de 1980, estudos fossem realizados para avaliar sua atividade antitumoral em casos de leucemia. Através de mecanismos e cascatas proteicas e enzimáticas de sinalização celular, compostos mesoiônicos poderiam atuar mais facilmente devido a sua estrutura planar. Mediante a urgência de tratamento para indivíduos infectados por HTLV-I, no presente estudo podemos claramente notar a eficiência dos diferentes compostos mesoiônicos atuando em diferentes linhagens celulares infectadas pelo vírus e levadas à morte celular. Desta forma, é de suma importância a continuidade da pesquisa a partir desses resultados preliminares com novos compostos mesoiônicos assim como a ampliação de pesquisas e estudo dos mecanismos de ação desses compostos, contribuindo para o bem-estar da população, avanço e melhoria no tratamento contra o câncer.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, Vera Lúcia de et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. Quím. Nova [online]. 2005, vol.28, n.1, pp.118-129. ISSN 0100-4042. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000100021>.

Bittencourt AL, Farré L. Leucemia/linfoma de células T do adulto. An Bras Dermatol. 2008;83(4):351-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962008000400011>.

BLATTNER WA. - Proc Assoc Am Physicians. 1999 Nov-Dec;111(6):563-72.

BRANDÃO, Raul. Vírus e Retrovírus Contributo para a Evolução das Espécies. 2015. Disponível em: <https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/5299/4/PPG_RaulBrand%C3%A3o.pdf>. Acesso em: 13/04/2017.

Cadena, S. M. S. C.; Carnieri, E. G. S.; Echevarria, A.; Oliveira, M. B. M.; FEBS Lett. 440, 1998, 46.

Cadena, S. M. S. C.; Carnieri, E. G. S.; Echevarria, A.; Oliveira, M. B. M.; Cell Biochem. Func. 20, 2002, 31.

Carneiro-Proietti AB, Ribas JG, Catalan-Soares BC, Martins ML, Brito-Melo GE, Martins-Filho OA, et al. Infection and disease caused by the human T cell lymphotropic viruses type I and II in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2002;35(5):499-508.

Catalan-Soares et al., Distribuição geográfica heterogênea dos vírus linfotrópicos humanos de célula T tipos I e II (HTLV-I/II): prevalência na triagem sorológica de doadores de sangue de grandes áreas urbanas no Brasil. 2005.

COFFIN JM 1992a. Estrutura e classificação de retrovírus em *The retroviridae* (ed. JA Levy), pp. 19-49. Plenum Press, Nova Iorque.

COFFIN JM Diversidade genética e evolução de retrovírus. Curr.Topo. Microbiol. Immunol. 1992B; 176: 143-164.

COFFIN JM 1996 Retroviridae e sua replicação Em *Virology* (ed. BN Fields et ai.), Pp. 1767-1848. Raven Press, Nova Iorque. Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. The Place of Retroviruses in Biology. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.

FERREIRA, Tulio. Vírus, elementos transponíveis e prions. 2010. Disponível em: <http://nead.uesc.br/arquivos/Biologia/modulo_7_bloco_3/uni_5_UPE_virus_prions_transp>

[osons elementos de insercao/material apoio/texto virus elementos transponiveis e priors.pdf](#)>. Acesso em 13/04/2018.

Fundação Hemominas, 2007. Disponível em: <<https://www.medicina.ufmg.br/nupad/seminario/slides.htm>>

Fundação Hemorio, 2010. Disponível em: http://www.hemorio.rj.gov.br/Html/pdf/manuais_2010/Infeccao_HTLV.pdf

Gilman AG, Rall TW, Taylor P. Goodman and Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics. Pergamon, New York, 1990.

Glória LM et al. Perfil clínico-epidemiológico de pacientes infectados pelo HTLV-1 em Grynberg, N.; Santos, A. C. S.; Echevarria, A.; Anti-Cancer Drugs 1997, 8, 88. Belém/Pará. 2015.

Greinert R. Skin cancer: new markers for better prevention. Pathobiology. 2009;76(2):64–81.

LIMA, Aurea Echeverria A N; MILLER, Joseph. Síntese e mecanismo de compostos mesoionicos aril-triazolios. 1986.Universidade de São Paulo, São Paulo, 1986.

Mendez-Sanches, S. C.; Martinez, G. R.; Romão, S.; Echevarria, A.; Silva, E. F.; Rocha, M. E. M.; Chemico-Biological Interact. 2009, 179, 125.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. COORDENAÇÃO NACIONAL DE CONTROLE DE TABAGISMO - CONTAPP. "Falando Sobre Câncer e Seus Fatores de Risco". Rio de Janeiro, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. GUIA DE MANEJO CLÍNICO DA INFECÇÃO PELO HTLV. 2013. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2014/56099/htlv_manual_final_pdf_25082.pdf>. Acesso em:17/05/2017.

Mosmann, Tim (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". Journal Of Immunological Methods 65 (1–2): 55–63.

Osame M. Review of WHO Kagoshima meeting and diagnostic guidelines for HAM/TSP. In: Blattner W (ed) Human retrovirology: HTLV. Raven, New York, p.191-197, 1990

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. Proc Natl Acad Sci USA, v. 77, n. 12, p. 7415-9, 1980.

Proietti FA, Carneiro-Proietti ABF, Catalan-Soares B, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. Oncogene. 2005;24(39):6058-68.

Reis, Camilla Moretto dos, Miranda, Amanda Fraga, Echevarria, Aurea, & Echevarria-Lima, Juliana (2011). Improved synthesis of 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamines using microwave and ultrasound irradiation and investigation of their cytotoxic activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(8), 1505-1510.

Santos, F. L. N. et al. Epidemiologia, fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-I. 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v41n2/a08v41n2.pdf>>

Schinzato, T. O.; Grynberg, N. F.; Gomes, R. M.; Echevarria, A.; Miller, J.; *J. Med. Sci. Res.* 1989. 17, 865.

Senff-Ribeiro, A.; Echevarria, A.; Silva, E. F.; Veiga, S. S.; Oliveira, M. B. M.; *Melanoma Res.* 2003, 13, 465.

Senff-Ribeiro, A.; Echevarria, A.; Silva, E. F.; Franco, C. R.; Viegas, S. S.; Oliveira, M. B. M.; *Br. J. Cancer* 2004, 91, 297.

Silva P. *Farmacologia*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, 1998.

Tsujino A, Nakamura T, Nishiura Y, Shirabe S, Furuya T, Goto H, Kawakami A, Eguchi K, Nagataki S. Pentoxifylline down-regulates adhesion molecule expression and inflammatory cytokine production in cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with HTLV-I-associated myelopathy. *Journal of Neuroimmunology* 73: 191-196, 1997.

Tucker MA. Is sunlight important to melanoma causation? 2008;17(3):467–468.