



Universidade de Brasília

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIRETROVIRAL DE
PLANTAS AMAZÔNICAS UTILIZANDO COMO
MODELO O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA SÍMIA**

ÉLIDA CLEYSE GOMES DA MATA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA-DF

MARÇO/ 2011



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIRETROVIRAL DE
PLANTAS AMAZÔNICAS UTILIZANDO COMO
MODELO O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA SÍMIA**

ÉLIDA CLEYSE GOMES DA MATA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA-DF

MARÇO/ 2011



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIRETROVIRAL DE
PLANTAS AMAZÔNICAS UTILIZANDO COMO
MODELO O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA SÍMIA**

ÉLIDA CLEYSE GOMES DA MATA

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIS ISAMU BARROS KANZAKI

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: 031/2011

**BRASÍLIA-DF
MARÇO/ 2011**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

DA MATA, E.C.G. **Avaliação de Atividade Antiretroviral de Plantas Amazônicas Utilizando Como Modelo o Vírus da Imunodeficiência Símia.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2011, 90 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor a Universidade de Brasília e acha-se arquivado na secretaria do programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citadas a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Da Mata, Élide Cleyse Gomes

Avaliação de Atividade Antiretroviral de Plantas Amazônicas Utilizando como Modelo o Vírus da Imunodeficiência Símia./ Élide Cleyse Gomes da Mata - Brasília, 2011. 90 p.: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2011.

1. Plantas medicinais 2. SIV 3. Antiretroviral 4. Amapá.

I. DA MATA, E.C.G. II. Título.

CDD ou CDU
Agris / FAO



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIRETROVIRAL DE PLANTAS AMAZÔNICAS
UTILIZANDO COMO MODELO O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA SÍMIA**

ÉLIDA CLEYSE GOMES DA MATA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE
ANIMAL, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM SAÚDE ANIMAL.

APROVADO POR:

Simone Perecmanis, Prof^a. Dr^a. (Universidade de Brasília)

Tatsuya Nagata, Prof. Dr. (Universidade de Brasília)

Sérgio P. S. Souza Diniz, Prof.Dr. (Universidade Estadual de Maringá)

Brasília- DF, 28 de março de 2011.

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado a minha mãe, Lindanor (in memorian) que foi a primeira incentivadora que tive e que não mediu esforços para eu e meus irmãos estudarmos, e que me mostrou na prática que devemos sempre lutar pelo que queremos e que as dificuldades existem para serem superadas. E também dedico ao meu pai, Agostinho (in memorian), meu outro anjo, que me protege. Saudades imensas de vocês...!

AGRADECIMENTOS

A Deus, que está sempre presente em minha vida.

A meus tesouros, Memê e Yoyo, que na medida do possível compreenderam minha ausência, e no final tudo deu certo. Mamãe ama muito vocês!

A minha fonte de inspiração, Prof. Kanzaki, que por sua determinação e esforço tornou este trabalho possível. Serei sempre grata por tudo!

As minhas irmãs-amigas que me deram apoio Alana, Darlen, Débora e Josy. Amo vocês, e obrigada por estarem presentes na minha vida.

Ao meu cunhado Ramon, pela força que me deu na formatação do trabalho e ajuda nos gráficos. Obrigada de coração!

A toda família que estava na torcida: Teodolina, Sarah, Ricardo, Hans, Guto, Fredson, Denison, dona Vilma, Cris, Masaro, Beth, Tereza, Yoji, May, Nara, Yuji, Bela e Vini.

A Prof.^a Simone, que sempre me incentivou e que teve papel importante neste trabalho, e que pude contar em todas horas... Obrigada pela orientação, apoio e amizade!

Ao Prof. Sérgio, pela amizade e por toda sua contribuição para a finalização desta dissertação, suas sugestões foram preciosas e nunca esquecerei de suas palavras de apoio e incentivo.

Ao Prof. Tatsuya, que corrigiu a dissertação, e deu dicas importantes para melhorar o trabalho.

A Pós- graduação em Saúde Animal que me deu essa oportunidade e a todos os professores que fazem parte do colegiado, e a secretária Kely que me auxiliou nos processos burocráticos e estava sempre disposta a me ajudar.

Ao Prof. Vanner, por me direcionar para o mestrado, sendo meu orientador inicial e que deu sugestões importantes para o desenvolvimento da pesquisa.

A meus companheiros de laboratório: Danusa, Maísa, Suzana, Yoji e Eli. Não esquecerei da contribuição de cada um de vocês. Com certeza, os momentos de dificuldades e descontrações que nós vivenciamos foram aprendizados únicos para cada um de nós.

A equipe do laboratório de microbiologia da medicina veterinária: Hudson, Rafael e Vinícius. Que deram apoio técnico que necessitava para terminar o trabalho.

Ao prof. Teixeira, Mariana e Marol, que permitiram que eu utilizasse os equipamentos do laboratório de Chagas.

Ao seu Geraldo, do departamento de importações da UnB, que fez o possível para que as células chegassem a tempo para nossa pesquisa.

A CAPES, pelo auxílio da bolsa de mestrado.

Ao Banco da Amazônia pelo financiamento do trabalho.

A Universidade de Brasília, por todos os anos que estudei, tanto na graduação como na pós-graduação, e que pude perceber que é um ambiente que inspira a se fazer ciência.

Aos pesquisadores do Amapá: Messias, Magda Segóvia. Os quais participaram das coletas botânicas no Estado do Amapá.

E a todas as pessoas, cujo os nomes podem não estar nesta lista, não por falta de merecimento, mas sim por esquecimento, e que de alguma forma contribuíram para a realização do trabalho.

OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO	18
2. JUSTIFICATIVA.....	20
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. Gerais.....	20
3.2. Específicos	20
4. REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
4.1. Plantas medicinais	21
4.2. Descoberta de novos agentes antirretrovirais	28
4.3. Resistência do vírus às drogas	30
4.4. Biologia geral dos retrovírus.....	31
4.4.1. Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV).....	33
4.4.1.1. Aspectos gerais	33
4.4.1.2. Estrutura retroviral.....	34
4.4.1.3. Origem e evolução	35
4.4.1.4. Similaridade entre SIV e HIV.....	36
4.4.1.5. Imunopatogenia.....	37
4.4.1.6. Modelo de estudo.....	39
5. MATERIAIS E MÉTODOS	39
5.1. Coleta das amostras botânicas	39
5.2. Espécimes botânicas	40
5.3. Produção dos extratos.....	42
5.4. Linhas celulares	42
5.5. Cepas virais utilizadas.....	43

5.6. Cultivo celular	43
5.6.1. Preparação de meio de cultura	43
5.6.2. Manutenção das células.....	43
5.6.3. Infecção Viral.....	44
5.6.4. Viabilidade Celular (VC)	44
5.6.5. Curva de crescimento de células não infectadas e infectadas com SIV	44
5.6.6. Teste de citotoxicidade celular dos extratos vegetais	45
5.6.7. Detecção de atividade antiretroviral	46
6. RESULTADOS.....	48
6.1. Curva de crescimento	48
6.2. Ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular	49
6.3. Ensaio de atividade antiretroviral	50
6.4. Diferentes concentrações de extratos brutos vegetais.....	54
6.5. Efeito citopático observado	54
7. DISCUSSÃO	55
98. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	59
8. REFERÊNCIAS.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Características de alguns grupos de princípios ativos em plantas medicinais.....	22
Tabela 2 Levantamento bibliográfico das principais atividades biológicas das famílias botânicas utilizadas neste trabalho.....	28
Tabela 3 Gêneros da família Retroviridae.....	32
Tabela 4 Família de plantas com respectivos extratos obtidos por infusão e seu rendimento final.....	41
Tabela 5 Concentração ótima de trabalho dos extratos aquosos.....	46
Tabela 6 Concentração de SIV p27 de células H9 tratadas com extratos e densidade celular contadas em diferentes intervalos de tempo.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Organização genômica clássica de cepas de SIV.....	35
Figura 2 Macaco aranha (<i>Ateles paniscus</i>) em goiabeira (<i>Psidium guajava</i>) no Amapá.....	40
Figura 3 Controle positivo do ensaio de ELISA.....	48
Figura 4 Curva de crescimento de Hut-78 não infectada e infectada por SIVagm.....	49
Figura 5 Curva de crescimento de células H9 não infectadas e infectadas com SIVmac.....	49
Figura 6 Células H9-SIV tratadas com altas concentrações de extratos botânicos.....	50
Figura 7 Células H9-SIV tratadas com baixas concentrações de extratos botânicos.....	50
Figura 8 Valores de densidade óptica/concentração de p27 no ensaio de ELISA de sobrenadantes de células H9 tratadas com extratos botânicos.....	52
Figura 9 Interpolação de valores de concentração de p27 de sobrenadantes de células H9 tratadas com extratos botânicos e controle positivo (CP).....	53
Figura 10 Micrografia de células Hut-78 infectadas com SIVagm.....	54
Figura 11 Micrografia de células H9 não infectadas.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SIV: Vírus da Imunodeficiência Símia

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

HAART: terapia antiretroviral potente

AIEV: Vírus da Anemia Infecciosa Equina

CAEV: Vírus da Artrite Encefalite Caprina

MVV: Vírus Maedi-Visna

BIV: Vírus da Imunodeficiência Bovina

FIV: Vírus da Imunodeficiência Felina

MHC: Complexo Maior de Histocompatibilidade

WST: tetrazólio solúvel em água

AZT: azidotimidina

ELISA: ensaio imunoenzimático

SHIV: híbrido molecular de SIV e HIV

LAV/HTLV-III: Vírus Linfotrópico Humano Tipo III associado a Linfadenopatia.

PBS: tampão fosfato salino

Anti-gp41: anticorpo monoclonal anti-gp41 (SIVmac 251)

TMB: tetrametil benzidina

p27: proteína viral de SIV

ECP: efeito citopático

SIVcpz: cepa de SIV de chimpanzés

SIVgor: cepa de SIV de gorilas

SIVmac: cepa de SIV de macaco rhesus

ORFs(open reading frame): fase aberta de leitura

HIV1/2: cepa de HIV tipo 1 e tipo 2

NIHAIDS: Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos

RPMI (Roswell Park Memorial Institute): meio de cultivo para células em suspensão

SBF: soro bovino fetal

RPM: rotação por minuto

DMSO: dimetil sulfóxido

CCR5: co-receptor para SIV

CXCR4: co-receptor para SIV

gp: glicoproteína

IDV: idinavir

3TC: lamivudina

nm: nanômetro

mm: milímetro

pg: picograma

m/L: mililitro

µg: micrograma

µL: microlitro

PAGAA (panel on antirretroviral guidelines for adults and adolescents): painel de orientação de antirretrovirais para adultos e adolescentes

LTR: repetições longas terminais

FDA (Food and Drug administracion): órgão de controle de medicamentos e alimentos dos Estados Unidos

RESUMO

Plantas amazônicas das famílias Apocynaceae, Rubiaceae, Fabaceae, Caesalpiniaceae, Ochnaceae, Clusiaceae, Arecaceae, Chrysobalanaceae e Olacaceae coletadas em solo amapaense foram testadas quanto à atividade antiviral utilizando como modelo o Vírus da Imundeficiência Símia/SIV. Das 20 amostras analisadas, o extrato aquoso de apenas uma planta, da família Fabaceae, exibiu forte inibição da replicação viral sem contudo alterar a cinética da divisão celular de linha linfoblástica estabelecida, H9. Além da atividade antiretroviral detectada, observou-se que, dependendo da concentração do extrato da planta ensaiada, potencial atividade antineoplásica exercem determinadas plantas neste estudo, visto que as linhagens celulares utilizadas para a replicação do SIV, foram estabelecidas a partir de linfoblastos transformados de pacientes humanos com diagnóstico de leucemia/linfoma. Estes resultados preliminares fundamentam estudos que conduzam ao desenvolvimento de fármacos ou mesmo fitoterápicos com ação antiretroviral e antineoplásica.

Palavras Chaves: Plantas medicinais, SIV, antiretroviral, Amapá.

ABSTRACT

Antiretroviral activity was assayed among 20 samples of amazonian plants belonging to the families Apocynaceae, Rubiaceae, Fabaceae, Caesalpinaceae, Ochnaceae, Clusiaceae, Arecaceae, Chrysobalanaceae and Olacaceae. All plants were collected in northern Brazil, in the Amapa state. Just one of the aqueous plant extract of the Fabaceae family here investigated strongly inhibited the replication of the Simian Immunodeficiency Virus in cell culture. Besides antiretroviral activity, some plants depending on the extract concentration interfered in the cell division pointing out to some possible and potential antineoplastic activity as the cell lines utilized in these assays were established from transformed lymphoblasts obtained of human patients diagnosed with leukemia and lymphoma. These preliminary results are promising as a fundamental basis for the development of antiretroviral and anti-cancer new drugs and as new phytotherapies concerning retrovirus infection and neoplasia.

Keywords: Medicinal plants, SIV, antiretroviral, Amapa.

1. INTRODUÇÃO

A Amazônia alberga 1/3 da biodiversidade do globo terrestre. Do total estimado de 500.000 espécies de plantas de todo o planeta, estima-se que 1/4 ocupe as florestas tropicais, nas quais se inclui a Amazônia com 50.000 espécies. Apenas 20 % das plantas medicinais em todo o mundo têm sido submetidas a ensaios farmacológicos ou biológicos (Feeley & Silman, 2009; Cragg *et al.*, 1997).

O conhecimento sobre o valor terapêutico das plantas sempre tem acompanhado a evolução do homem através dos tempos. As primitivas civilizações cedo se aperceberam da existência, ao lado de plantas comestíveis, de outras plantas dotadas de maiores ou menores efeitos sobre o organismo, desde efeitos tóxicos até a intervenção sobre a doença, revelando muitas vezes, embora empiricamente, o seu potencial curativo (Albuquerque & Hanazaki, 2006). Existe grande variedade de plantas ainda não estudadas, tanto no sentido de utilização direta, como na obtenção de novos constituintes ativos ou de novas moléculas que possam servir para preparar compostos farmacologicamente ativos (Da Cunha *et al.*, 2007).

Convém salientar que o uso de plantas como fontes medicinais não é um fato isolado e único em humanos. Outros animais, principalmente primatas não humanos, em ambiente natural, utilizam não casualmente, partes de plantas e até terra por suas características medicinais. Muitas espécies de primatas não humanos têm sido descritas utilizando material natural para fins terapêuticos (Huffman, 2001). Entre chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) é bem descrito o uso de até 20,4 % de plantas em sua dieta com conhecidas propriedades medicinais (Krief *et al.*, 2005).

Orangotangos (*Pongo pygmaeus*) utilizam as folhas mascadas e misturadas com saliva, de planta do gênero *Commelina* para esfregar partes do corpo, embora essa planta não componha a dieta destes antropóides. Também é usada pelos nativos de Bornéu como anti-inflamatório em afecções musculoesqueléticas. As propriedades antiflogísticas da planta parecem ser conhecidas e aproveitadas pelos orangotangos (Huffman, 2001). Entre primatas neotropicais, o gênero *Alouatta* (bugios) tem sido descrito como utilizando geofagia para a eliminação de compostos tóxicos das plantas, principalmente em casos de folhas ricas em taninos (Auricchio, 1995). Outros gêneros de platirrinos como *Ateles* também ingerem terra aparentemente com o mesmo propósito (Ferrari *et al.*, 2008).

Em prossímios, uma das grandes superfamílias de primatas, foi descrito o uso de compostos vegetais com substancial maior concentração de taninos, por fêmeas de sifakas (*Propithecus verreauxi*) na época prévia à parição e durante a lactação dos filhotes. Essa maior ingestão de composto que se liga à proteínas (potencialmente reduzindo a absorção de aminoácidos), em animais em fase reprodutiva, pode ser explicada pelas propriedades medicinais de taninos tais como anti-parasitário, adstringente, anti-abortivo e anti-hemorrágico (Carrai *et al.*, 2003). A observação por humanos dos efeitos medicinais de produtos naturais, de forma científica ou de forma tradicional, tem levado a descoberta de compostos com importantes propriedades medicinais, praticamente em todo o campo da farmacognosia (Huffman, 2001; Albuquerque & Hanazaki, 2006).

Na atualidade, há enorme interesse científico, biotecnológico e redundantemente comercial, em se encontrar produtos naturais apresentando atividade antiretroviral (Seidl, 1999; Jassim & Naji, 2003; Bodeker *et al.*, 2006). Sabe-se que as enfermidades causadas por retrovírus, entre as quais a imunodeficiência e leucemia felina (Kanzaki & Looney, 2004; Levy *et al.*, 2008), a anemia infecciosa equina (Lerous *et al.*, 2004), a síndrome da imunodeficiência humana (Kallings, 2008), a artrite-encefalite caprina e a enfermidade de Maedi Visna de carneiros (Pisoni *et al.*, 2007) dentre outras, representam importante foco de estudos quer seja em busca de vacinas (Jennings & Bachmann, 2008) ou novas drogas antiretrovirais (Naithani *et al.*, 2008). Particularmente no Brasil, é contraditório que, apesar do tamanho continental do país, possuindo a mais rica e diversificada flora do planeta e por conseguinte de plantas com propriedades medicinais (Melo *et al.*, 2008), seus pacientes aidéticos sejam dependentes de fármacos antiretrovirais comercializados por indústrias farmacêuticas estrangeiras ditas multinacionais (Ford *et al.*, 2007).

Similaridades na fisiologia, incluindo o metabolismo de drogas, placentação, desenvolvimento fetal e infantil, e resposta imunológica, permitem confiável extrapolação dos resultados obtidos nos modelos de primatas não humanos para aplicações clínicas em populações humanas (Friedman *et al.*, 2006).

O vírus da imunodeficiência símia (SIV) é modelo interessante para estudo, visto que é o ancestral do vírus da imunodeficiência humana (HIV), compartilhando organização genômica, além de outras propriedades biológicas, como tropismo

celular e tecidual (Johnson, 1996). Desta forma, neste trabalho utiliza-se o SIV como modelo de retrovírus para testar a atividade biológica de extratos de plantas amazônicas medicinais.

2. JUSTIFICATIVA

A proximidade filogenética entre o ser humano e os primatas não humanos propicia a realização de estudos comparados entre as espécies. Deste modo, os primatas não humanos, são importantes modelos para a investigação biomédica. No presente trabalho buscou-se compreender o mecanismo de interação entre o SIV com o ambiente celular, testando em células infectadas com SIV extratos brutos de plantas amazônicas, buscando analisar a existência de atividade antiretroviral entre os compostos químicos presentes nesses espécimes botânicos, que pelo conhecimento etnofarmacobotânico revelaram propriedades curativas e reguladoras das funções imunológicas. A possibilidade de detecção de produtos naturais exibindo ou comprovando atividade medicinal, seria de importância ao armamentário medicinal de produtos a serem explorados no tratamento de enfermidades animais e também de interesse médico humano. Ademais, as espécies vegetais medicinais potencialmente com aplicações antiretrovirais, poderiam ser indicadas para cultivos, mais bem protegidas em bancos de germoplasmas, abrindo novos leques de importância científica e socioeconômica.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar atividade antiretroviral entre plantas medicinais amazônicas utilizando o vírus da imunodeficiência símia como modelo.

3.2 Específicos

3.2.1. Coletar e identificar as espécies vegetais medicinais amazônicas já documentadas na tradição popular das etnias amazônicas.

3.2.2. Revisar na literatura científica informações acerca das espécies vegetais amazônicas medicinais documentadas e identificadas.

3.2.3. Submeter diferentes partes das plantas coletadas à extração utilizando solventes em diferentes polaridades.

3.2.4. Avaliar atividade citotóxica e antiretroviral dos extratos obtidos.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Plantas Medicinais

Desde o início da civilização as plantas têm sido utilizadas no combate de doenças, atuando como recurso terapêutico popular. A planta dita medicinal é aquela que contém um ou mais princípios ativos que conferem atividade terapêutica (Martins, 1995). A literatura etnobotânica tem descrito, por séculos, o uso de extratos de plantas e infusões com atividade medicinal para doenças de origem viral (Vijayan *et al.*, 2004). As plantas, como todos os organismos vivos, apresentam diversos constituintes (Tabela 1), presentes tanto no metabolismo primário e secundário das plantas, as quais podem ser consideradas medicinais quando apresentam estes constituintes farmacologicamente ativos (Simões *et al.*, 2000) utilizando-os no tratamento ou prevenção de determinada enfermidade.

Além dos constituintes ativos, ocorrem nas plantas medicinais outros compostos que podem influenciar na ação destes (Da cunha *et al.*, 2007). Estes compostos em muitos casos, protegem os constituintes ativos de alterações, ao inibirem sistemas enzimáticos, ou podem permitir melhor absorção pelo organismo, ao facilitarem a passagem através de membranas biológicas (Simões *et al.*, 2000).

Tabela 1. Características de alguns grupos de princípios ativos em plantas medicinais.

Princípio ativo	Grau de propriedades medicinais e/ou tóxicas
Alcalóides	Atuam no sistema nervoso central (calmante, sedativo, estimulante, anestésico e analgésico). Alguns podem ser cancerígenos e outros antineoplásicos.
Mucilagens	Cicatrizante, antiinflamatório, laxativo, expectorante e antiespasmódico.
Flavonóides	Antiinflamatório, fortalece os vasos capilares, antiesclerótico, antiedematoso, dilatador de coronárias, espasmolítico, antihepatotóxico, colerético e antimicrobiano.
Taninos	Adstringentes e antimicrobianos (antidiarréico). Precipitam proteínas.
Óleos essenciais	Bactericida, antivirótico, cicatrizante, analgésico, relaxante, expectorante, Antiespasmódico e antimicótica (Diniz, <i>et al.</i> 2008)

Fonte: modificado de Martins (1995).

A nível mundial, muitas espécies ainda não foram investigadas química e farmacologicamente, no entanto, pertencem ao arsenal da fitoterapia que o homem tem utilizado empiricamente, muitas vezes com bons resultados. Tais medicamentos de uso popular variam, de acordo com a flora existente em determinada região climática e cujo estudo é possível fazer-se ainda hoje. Nas sociedades contemporâneas, mais ou menos primitivas, ainda que, com o processo de ocidentalização de muitas destas populações há o risco iminente da perda total de conhecimentos ditos empíricos em diversas regiões do globo, onde a rápida mudança do modo de vida de sociedades primitivas está fazendo desaparecer sua medicina popular que se apóia quase sempre em biomas muito importantes. Países como China, Índia, Coréia do Norte, Coréia do Sul, Japão e outros, têm dedicado

esforços significativos na investigação de fármacos de uso tradicional, o que tem conduzido a resultados de alto interesse sob o ponto de vista terapêutico e evitado a perda dessa informação (Da Cunha *et al.*, 2007).

Dentre diversificadas atividades biológicas exibidas por plantas, descrevemos as principais dentre as famílias botânicas avaliadas neste estudo.

Entre membros da família rubiaceae há relatos na literatura reportando atividade antioxidante de lignanas, chimarrhinina, da espécie *Chimarrhis turbinata* (Cardoso *et al.*, 2011), herbicida e letal para bactérias do solo por peptídeos ciclotídeos (Ovesen *et al.*, 2011), antineoplásica por ciclohexapeptídeos obtidos das espécies *Rubia cordifolia* e *R. Akane* e ácido ursólico isolado de *Hedyotis diffusa* (Hasuda *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011), anti-inflamatória por alcalóides indol, neolamarckinas, obtidos da espécie *Neolamarckia cadamba* e extrato aquoso de *Uncaria rhynchophylla* (Qureshi *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2010) e antimicrobiana por óleos essenciais de *Anthospermum emirnense* e *Anthospermum perrieri* (Rasoarivelo *et al.*, 2011).

Compostos obtidos de diversas espécies da família Ochnaceae apresentaram atividade citotóxica (biocida) frente a larvas de *Artemia salina* por extratos etanólicos da planta *Campylospermum flavum* (Ndongo *et al.*, 2010); atividade antioxidante por *Ochna natalitia* e *Ouratea parviflora* (Suleiman *et al.*, 2010; Carbonari *et al.*, 2006) e antimicrobiana por extratos de *Ochna natalitia*, *Campylospermum glaucum* e biflavonóides de *Ouratea sulcata* (Suleiman *et al.*, 2009; Abouem *et al.*, 2008; Pegnyemb *et al.*, 2005); antiretroviral (HIV), inibindo a ação da transcriptase reversa por glicosídeos flavonóides e antimalárica por biflavonóides de *Ochna integerrima* (Reutrakul *et al.*, 2007; Ichino *et al.*, 2006); atividade antioxidante por isoflavonas e biflavonas isoladas de *Godoya antioquiensis* (Benedek *et al.*, 2006); propriedades antiviral, antibacteriana e antiproliferativa/antineoplásica por extrato etanólico de *Brackenridgea zanguibarica* (Moller *et al.*, 2006); atividade analgésica e anti-inflamatória por extrato fracionado de *Ochna squarrosa* (Anuradha *et al.*, 2006); e atividade antineoplásica exercida por chalconas de *Lophira alata*.

Das várias famílias investigadas relata-se na literatura compostos isolados de representantes da Clusiaceae, tais como benzofenonas poliisopreniladas (nemorosona e gutiferona A) exercendo atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Plasmodium falciparum* (Monzote *et al.*, 2011). Ainda entre membros da família Clusiaceae reporta-se atividade anti-inflamatória por compostos polifenólicos obtidos de *Hypericum perforatum* (Paterniti *et al.*, 2010); atividade antioxidante por benzofenonas e biflavonóides obtidos de *Rheedia edulis* e xantonas de *Garcinia mangostana* (Acuña *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010); atividade inibitória na síntese de exopolímeros e biofilme por *Streptococcus mutans* exercida por 7-Epiclusianona obtida de *Rheedia brasiliensis* (Murata *et al.*, 2010); efeito neuroprotetor por extratos de *Hypericum perforatum*, com consequente atividade terapêutica nos transtornos de déficit de atenção e hiperatividade (Schmidt *et al.*, 2010); atividade inibitória na replicação do vírus da Influenza exercida por isoquercetina obtida de *Hypericum thasium* (Kim *et al.*, 2010); atividade antimalárica de variantes resistentes à cloroquina por extrato de acetato etílico de *Symphonia globulifera* (Marti *et al.*, 2010); atividade imunoestimulante por extrato etanólico de *Calophyllum brasiliense* (Philippi *et al.*, 2010); atividade inibitória na proliferação *in vitro* de células leucêmicas humanas HL-60 por triterpenóides isolados de *Calophyllum inophyllum* (Li *et al.*, 2010); efeito protetor por biflavonóides (kolaviron) de *Garcinia kola* em cérebros de ratos Wistar expostos à radiação gama (Adaramoye, 2010).

Descreve-se na literatura atividade biológica das espécies botânicas da família Arecaceae, exemplificando-se, efeitos vasorelaxantes e anti-hipertensivos em anéis aórticos isolados de ratos por extrato etanólico do endocarpo de *Cocos nucifera* (Bankar *et al.*, 2011); atividade anti-inflamatória exercida por extratos de *Serenoa repens*, *Areca catechu* e derivados fenilpropanóides de *Calamus quiquesetinervius* e óleo de *Cocos nucifera* (Bonvissuto *et al.*, 2011; Bandhare *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2010; Intahphuac *et al.*, 2010); ação antioxidante e analgésica por derivados fenilpropanóides de *Calamus quiquesetinervius* (Chang *et al.*, 2010); efeito cicatrizante por extrato etanólico de *Elaeis guineensis* (Sasidharan *et al.*, 2010); atividade carcinogênica e autofágica entre células cancerosas por extrato de *Areca nut* (Lu *et al.*, 2010).

Lista-se atividades de espécies da família Chrysobalanaceae como hipoglicemiante por flavonóides de *Exellodendron coriaceum* e extrato aquoso de *Parinari excelsa* (Carrasco *et al.*, 2009; Ndiaye *et al.*, 2008); atividade antineoplásica e antiviral para Herpes por triterpenos pentacíclicos e extratos respectivamente de *Licania tomentosa* (Fernandes *et al.*, 2003; Miranda *et al.*, 2002); ação antioxidante por flavonóides de *Licania licaniaeflora* (Braça *et al.*, 2002) e atividade moluscida (*Biomphalaria glabrata*) por espécies do gênero *Licania* (Bilia *et al.*, 2000).

Membros da família Olacaceae, *Ptychopetalum olacoides* (marapuama) exhibe atividade inibidora da acetilcolinesterase com potencial efeito terapêutico em distúrbios neurodegenerativos, estimulante de crescimento neuronal assim como anti-estressante e cosmético no tratamento da hiperpigmentação periorbital (Figueiró *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2009; Piato *et al.*, 2010; Eberlin *et al.*, 2009); efeito inibitório na produção de óxido nítrico em envenenamento por ciguatoxinas do peixe *Gambierdicus* spp e analgésico exercido por extrato aquoso de *Ximenia americana* (Kumar-Roiné *et al.*, 2009; Soro *et al.*, 2009); efeito toxigênico com potencial atividade herbicida de malanina isolada de *Malaria oleifera* (Yuan *et al.*, 2009); atividade antineoplásica *in vitro* em células de adenocarcinoma de mama (MCF-7) por espécies da família em enfoque (Suffredini *et al.*, 2007).

Os membros da família Apocynaceae, representados por *Catharanthus roseus* é reportado exibindo atividade detoxificante e antineoplásica (Zhong *et al.*, 2010); a fração protéica do látex de *Calotropis procera* exerce potente ação anti-inflamatória e analgésica (Kumar *et al.*, 2011); o látex de *Parahancornia Amapa* apresenta atividade inseticida (Mendonça *et al.*, 2011); cardenólídeos monoglicosídicos de *Nerium oleander* e extratos de *Vallaris glabra* e *Calotropis gigantea* bloquearam *in vitro* o ciclo celular de linhagens neoplásicas humanas assim como saponinas de *Plumeria acuminata* induziram apoptose em carcinoma de células de epitélio escamoso da cavidade oral (Reshan *et al.*, 2011; Susanto *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2011); extratos em solventes de diferentes polaridades de *Thevetia peruviana* apresentaram atividade tóxica/letal sobre peixes da espécie *Catla catla* (Singh *et al.*, 2010); extrato hidroalcoólico de *Nerium oleander* atuam como cardioprotetores provavelmente por implementar o sistema antioxidante de defesa (Gayathri *et al.*, 2011); efeitos neuroprotetores ocorrem com o uso de extrato

de *Apocynum venetum* (Zheng *et al.*, 2010); o acetato de lupeol do látex de *Himatanthus drasticus* apresentou atividade anti-inflamatória (Lucetti *et al.*, 2010); extrato aquoso de *Tabernanthe iboga* contém compostos insulinoatrópicos (Souza *et al.*, 2011); a fração diclorometano de *Hedranthera barteri* agiu protegendo a mucosa estomacal e inibindo a secreção ácida (Onasanwo *et al.*, 2010); óleo essencial e o 2-hidroxi-4-metoxibenzaldeído representam potenciais substâncias com atividade antibacteriana e antioxidante (Wang *et al.*, 2010); alcalóides iboga (18-metoxicoronaridina) isolados de *Peschiera affinis* inibiu moderadamente a atividade da transcriptase reversa do HIV-1 (Silva *et al.*, 2004); proantocianidinas de *Ecdysanthera utilis* apresentaram atividade imunomodulatória frente a células mononucleares humanas (Lin *et al.*, 2002); extrato etanólico de *Catharanthus roseus* exibiu potencial efeito cicatrizante (Nayak *et al.*, 2007); essências de flores da família Apocynaceae tem sido utilizadas na cosmetologia (Joulain, 2008).

Espécies botânicas da família Fabaceae exibem diversificadas ações biológicas dentre as quais, atividade antibacteriana por glucosídeo lactona sesquiterpeno de *Bauhinia retusa* (Semwal & Sharma, 2011); ação antioxidante e anti-ulcerogênica de extrato licoroso de *Glycyrrhiza glabra* (Mukherjee *et al.*, 2010); efeito antineoplásico de óleos essenciais de *Genista sessilifolia* e *Genista tinctoria* (Rigano *et al.*, 2010); propriedade inseticida de óleos essenciais de *Hymenaea courbaril* sobre larvas de *Aedes aegypti* (Aguiar *et al.*, 2010); efeitos antivirais das espécies de *Glycyrrhiza* spp. (Fiore *et al.*, 2008); ação imunomodulatória sobre linfócitos mediados pela lectina cramol 1,4 de *Cratylia mollis* (de Melo *et al.*, 2010); ação neurocitoprotetora exercida por compostos daidzeina e genisteína isolados de *Pueraria thomsonii* (Lin *et al.*, 2010); ação anti-diabetogênica por *Trigonella foenum graecum* (Moorthy *et al.*, 2010); ação protetora no sistema cardiovascular por extrato aquoso de *Aspalathus linearis* (Marnewick *et al.*, 2011); propriedade cicatrizante por derivados catechinos de *Parapiptadenia rígida* (Schmidit *et al.*, 2010); uso cosmético de *Acacia arabica* (Pradeep *et al.*, 2010); atividade antiviral, incluindo HIV-1, exercida por Secomet-V obtido de espécies do gênero *Trifolium* (Kotwal *et al.*, 2005).

Plantas da família Caesalpiniaceae exibem variedade de atividades, tais como antimicrobiana por peltophorumyl-beta-D-glucuropyranoside obtido de

Peltophorum vogelianum (Parveen *et al.*, 2010); inseticida e antimicrobiana por diferentes compostos isolados de *Tessmannia densiflora* (Kihampa *et al.*, 2009); atividade analgésica, antipirética e anti-inflamatória por extrato aquoso de *Mezoneuron benthamianum* e óleo de *Caesalpinia bonducella*, que ainda apresentou atividade imunomodulatória, antineoplásica e antioxidante (Mbagwu *et al.*, 2007; Shukla *et al.*, 2010; Shukla *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2004); atividade antioxidante e antimicrobiana por extrato metanólico de *Bauhinia racemosa* (Kumar *et al.*, 2005); ação quimiopreventiva do câncer de pele por fração flavonóide de *Saraca asoka* (Cibin *et al.*, 2010); atividade adaptogênica, frente ao estresse por extratos de semente de *Caesalpinia bonduc* (Kannur *et al.*, 2006) e ação antidiarréica por extrato aquoso de *Mezoneuron benthamianum* (Mbagwo&Adeyemi, 2008); atividade constritora da musculatura lisa e antinociceptiva de extrato metanolico de *Cassia tora* (Chidume *et al.*, 2002).

Na tabela 2 estão resumidas as principais atividades biológicas das famílias das plantas aqui estudadas, distribuídas por todo o mundo, encontradas na literatura.

Tabela 2: Principais atividades biológicas das famílias botânicas utilizadas no trabalho

ATIVIDADE BIOLÓGICA	FAMÍLIA DE PLANTAS								
	RUB. ^a	OCHN. ^b	CLUS. ^c	AREC. ^d	CHRYS. ^e	OLAC. ^f	APOC. ^g	FAB. ^h	CAES. ⁱ
ANTIMICROBIANO	X	X	X		X		X	X	X
ANTI-INFLAMATÓRIO	X	X	X	X		X	X	X	X
ANTINEOPLÁSICO	X	X	X	X	X	X	X	X	X
ANTIOXIDANTE	X	X	X	X	X	X		X	X
BIOCIDA	X	X			X	X	X	X	X
ANTIRETROVIRAL		X					X	X	
IMUNOMODULADOR			X	X			X	X	X
NEUROPROTETOR			X	X		X	X	X	X
CARDIOVASCULAR				X			X	X	X
CICATRIZANTE				X			X	X	
ANTIDIABÉTICO					X		X	X	
COSMÉTICO						X	X	X	
GASTROINTESTINAL							X	X	X

^aRubiaceae, ^bOchnaceae, ^cClusiaceae, ^dArecaceae, ^eChrysobalanaceae, ^fOlacaceae, ^gApocynaceae, ^hFabaceae, ⁱCaesalpiniaceae.

4.2. Descoberta de Novos Agentes Antiretrovirais

Na atualidade, cada vez mais, é dada atenção aos esforços em pesquisas de desenvolvimento de estratégias de imunidade baseadas na terapia e prevenção da AIDS. Apesar dos benefícios clínicos, tratamentos antiretrovirais são limitados pela toxicidade e custo da administração ao longo da vida. Entre as consequências clínicas derivadas da toxicidade hepática por tratamento com antiretrovirais altamente ativos (HAART/highly active antiretroviral therapy), reconhece-se reações de hipersensibilidade e acidose láctica que podem evoluir potencialmente para casos fatais, e ainda outras síndromes ainda não bem caracterizadas (Nuñez, 2010). Em modelo experimental de infecção de macacos cinomolgo (*Macaca fascicularis*) utilizando SIV patogênico (SIVmac251) observou-se que o HAART (AZT/3TC/IDV)

previamente à infecção teve forte impacto na replicação do SIV e disseminação em todos os tecidos, mas não preveniu a infecção. Quando o tratamento foi iniciado após o pique de viremia (14 dias pós-infecção) ou durante o início da infecção crônica (150 dias pós-infecção), a replicação viral persistiu significativamente nos linfonodos periféricos e no baço dos animais tratados apesar de forte efeito na redução da viremia e no tecido linfóide associado ao intestino. Desta forma, a difusão limitada da droga antiviral em tecidos linfóides secundários pôde permitir a replicação viral persistente nestes tecidos e representaria obstáculo à prevenção da enfermidade e erradicação do SIV/HIV (Bourry *et al.*, 2010).

Crescente arsenal de medicamentos antiretrovirais está sendo prescrito atualmente, e muitos novos candidatos estão sendo continuamente desenvolvidos. Há mais de 20 drogas antiretrovirais aprovadas pelo órgão de controle de medicamentos e alimentos dos Estados Unidos (FDA) em 6 classes mecanísticas, em regimes combinados de uso. As seis classes incluem inibidores nucleosídicos/nucleotídicos da transcriptase reversa (NRTIs), inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa (NNRTIs), inibidores da protease (PIs), inibidores de fusão (FIs), antagonistas de CCR5 e inibidores de transferência de cadeia nucleotídica via integrase (INSTIs) (PAGAA, 2010).

Nos últimos anos, a terapia combinada destes compostos, chamada HAART, tem levado a grandes melhorias no manejo clínico de indivíduos infectados pelo HIV (Friedman *et al.*, 2006).

A busca de melhores medicamentos antivirais continua, visto que o antiretroviral “ideal” seria aquele capaz de induzir forte e persistente supressão da replicação do vírus, prolongando os benefícios imunológicos e clínicos com a menor toxicidade (Van Rompay *et al.*, 2002), e obviamente com custo acessível aos pacientes ou ao país, como ocorre no Brasil, que os medicamentos antiretrovirais são prescritos e distribuídos gratuitamente aos pacientes.

Apesar da elevada potencialidade terapêutica que os medicamentos antiretrovirais apresentam na atualidade, e o crescente interesse científico na busca de fármacos que combatam patologias causadas pelos retrovírus, em especial o HIV, ainda não se obteve resultado satisfatório, devido a alta mutagenicidade destes vírus. Por estas razões se faz necessária a identificação e busca de novas

substâncias antiretrovirais, que possam ser usadas em substituição ou em combinação com os antivirais já existentes. A investigação científica da atividade antiretroviral de extratos e substâncias isoladas de plantas é crescente, como podemos notar pelo grande número de publicações acerca do tema. Em muitos trabalhos realizados com produtos naturais, observa-se que algumas plantas apresentam atividade inibitória da replicação viral (Hardman *et al.*, 2005).

Nosso país com seu pluralismo étnico e cultural guarda imenso conhecimento sobre o uso de plantas medicinais, e muitas destas podem ser favoráveis ao combate de patologias retrovirais, sendo que a diversidade dos biomas, como a Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica fornecem grande potencial. Existem muitas plantas de uso popular, que demonstraram atividade imunomoduladora, antiinflamatória, antimutagênica e antineoplásica como a Aloé (*Aloe vera*) e unha-de-gato (*Uncaria guianensis* e *Uncaria tomentosa*) pertencentes a família Rubiaceae.

Triterpenos naturais e sintéticos são compostos capazes de atuar como inibidores de fusão, representando moderna estratégia no combate à replicação viral, impedindo que o vírus infecte as células (Gonçalves, 2006). Estes compostos são capazes de atuar nas diversas fases da replicação retroviral, como na maturação, na transcrição reversa e na fusão do envelope viral à membrana da célula alvo (Schulz *et al.*, 2002). Os primeiros triterpenos que apresentaram atividades antiretroviral foram os ácidos betulínicos e platânicos, que ocorrem em *Syzygium claviflorum* (Myrtaceae), exibindo atividade inibitória frente à replicação do HIV-1 em células linfocitárias H9 (Gonçalves, 2006).

Pequenos peptídeos têm sido sintetizados ou encontrados em natureza com atividade antirretroviral. Cita-se por exemplo a T20, que inibe o processo de fusão do envoltório viral à membrana da célula alvo ao interagir com a gp41 do envelope viral do HIV-1 (Cai&Jiang, 2010).

4.3 Resistência do Vírus às Drogas

O objetivo das estratégias correntes da HAART é idealmente inibir completamente a replicação viral utilizando a combinação de 3 ou mais drogas antiretrovirais. De fato, após a introdução da HAART houve drástica mudança na evolução clínica da síndrome associada etiologicamente ao HIV, com redução da

mortalidade e morbidade. No entanto, os efeitos colaterais de longo tempo e a potência sub ótima da droga e a emergência de resistência viral são as principais preocupações atuais para se obter controle sustentável da replicação viral (Vaerenbergh, 2001; Alcaro *et al.*, 2011). A falha no tratamento antirretroviral apresenta-se multifacetário. Inicialmente a interação entre a droga e seu alvo, atuando em determinada etapa do ciclo de replicação do vírus, bloqueando o antiviral em diversas estruturas peptídicas codificadas pelo vírus, desta forma, a pressão seletiva destes fármacos sobre os mecanismos replicativos do patógeno, terminam por selecionar progênie viral que por mutações são insensíveis a interação com as drogas em uso, o que denominamos resistência aos antirretrovirais. Sabe-se que, ainda que o antirretroviral consiga diminuir ou erradicar a carga viral plasmática, ao longo do tempo, cepas virais resistentes aos antirretrovirais emergirão (Wilkin *et al.*, 2010).

4.4 Biologia geral dos Retrovírus

Os retrovírus são membros da família Retroviridae, relatados como agentes etiológicos em várias doenças em vertebrados como neoplasias malignas, imunodeficiência e doenças neurológicas (Constantine, 1993). A característica biológica marcante deste grupo de vírus é a utilização da enzima transcriptase reversa para a síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA) tomando como molde seu ácido ribonucléico (RNA), requisito indispensável para integração do genoma viral ao DNA da célula hospedeira. A estrutura da partícula viral (virion) é comum aos demais retrovírus, possuindo genoma constituído de RNA de fita simples, com duas cópias idênticas interligadas por molécula de RNAt. O genoma está associado às enzimas transcriptase reversa, integrase e protease (Kalyanaraman *et al.*, 1982). Constituída de 7 gêneros (TABELA 2), a família Retroviridae apresenta agentes retrovirais de importância animal e humana, particularmente a subfamília lentivirinae, como os vírus da Anemia Infecciosa Equina (AIEV), da Artrite Encefalite Caprina (CAEV), de Maedi-Visna (MVV), da Doença de Jembrana e das Imunodeficiências Humana (HIV), Bovina (BIV), Felina (FIV) e Símia (SIV) dentre outros. Esses vírus geralmente limitam a infecção a um simples tipo de hospedeiro, levando a sérios problemas ou à morte. Infectam monócitos, macrófagos e/ou linfócitos, causando infecção persistente e multissistêmica (AIEV e CAEV), associada à síndromes de imunodeficiência (SIV, HIV e FIV), apresentando alta taxa de mutação com

consequente diversidade genotípica, fenotípica e antigênica (Clements & Payne, 1994). Essa forma integrada do genoma viral ao cromossoma da célula hospedeira é chamada de provírus. Após a integração, a síntese do RNA viral é mediada por enzimas das células hospedeiras, usando o DNA proviral como modelo (Ferreira *et al.*, 1995). Essas novas moléculas de RNA são incorporadas às partículas virais em formação, e processadas para a síntese das proteínas da estrutura do vírion, bem como as enzimas virais. As partículas virais, medindo em média 110 nm, brotam da célula onde se replicou, adquirindo a membrana lipoproteica da célula, que previamente recebeu inserção de glicoproteínas virais, permitindo assim através destas moléculas interação com receptores celulares do microambiente tissular. O organismo identifica essas partículas como estranhas, as quais induzem a produção de anticorpos, que poderão ser detectados por testes sorológicos (Hjelle *et al.*, 1995), além de, em fase subsequente, dar início a resposta celular com apresentação dos antígenos virais acoplados às moléculas do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC) do tipo I aos linfócitos T citotóxicos (Budde *et al.*, 2011).

Além dos primatas, humanos e não humanos, vertebrados de outras escalas filogenéticas têm seus representantes retrovirais, no entanto, a relação dos retrovírus com os animais, aparentemente atinge estágios de equilíbrio, em que perturbações nestas relações, levam a patologias nestes animais (Weiss, 1999).

TABELA 3. GÊNEROS DA FAMÍLIA RETROVIRIDAE

Alpharetrovirus

Avian myeloblastosis virus e *Rous sarcoma virus*.

Betaretrovirus

Mouse mammary tumor virus

Gammaretrovirus

Murine leukemia virus e *Feline Leukemia vírus*

Deltaretrovirus

Bovine leukemia virus, Primate T lymphotropic virus (1, 2 e 3)

Epsilonretrovirus

Walleye dermal sarcoma virus

Spumavirus

Simian foamy vírus, Bovine foamy vírus e Feline foamy vírus

Lentivirus

Human immunodeficiency vírus (1 e 2), Bovine imunodeficiency vírus, Equine infectious anemia vírus e Human immunodeficiency virus

Fonte: modificado de Friedman *et al*, 2006

4.4.1 Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV)

4.4.1.1 Aspectos Gerais

Membros do gênero lentivirus, compreendem importantes agentes envolvidos etiológicamente na síndrome da imunodeficiência símia, circulando de forma enzoótica entre macacos do velho mundo e símios, apatogênico em animais de vida livre, mas considerado patogênico em animais em cativeiro, sob estresse e entre chimpanzés (símios antropóides). Assim como os deltaretrovírus, não há relatos na literatura de que o SIV infecte naturalmente primatas não humanos do novo mundo (Kanzaki & Casseb, 2008; Kirchhoff, 2009; Hanh, 2010).

Desde a descoberta do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) como agente desencadeante da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), muito esforço tem sido realizado para caracterizar o reservatório zoonótico deste novo patógeno humano (Hahn *et al.*, 2000; Verschoor *et al.*, 2003). O SIV está intimamente relacionado com o HIV, e tem sido descrito em muitas espécies de primatas não humanos africanos, sendo que o SIVcpz, vírus isolado de chimpanzés (*Pan troglodytes troglodytes* e *Pan troglodytes schweinfurthii*) e transmitido a gorilas

(*Gorilla gorilla gorilla*), SIVgor, estão mais relacionados ao HIV do tipo 1 (Sharp & Hanh, 2010; Takehisa *et al.*, 2009) Estudos sugerem que este último seria resultado de múltiplas transmissões zoonóticas de SIVcpz/SIVgor aos seres humanos (Gao *et al.*, 1999), e outros estudos sugerem que o HIV do tipo 2 foi gerado a partir de transmissões zoonóticas de SIV de macacos da espécie *Cercocebus atys* (sooty mangabeys) (Gao *et al.*, 1992).

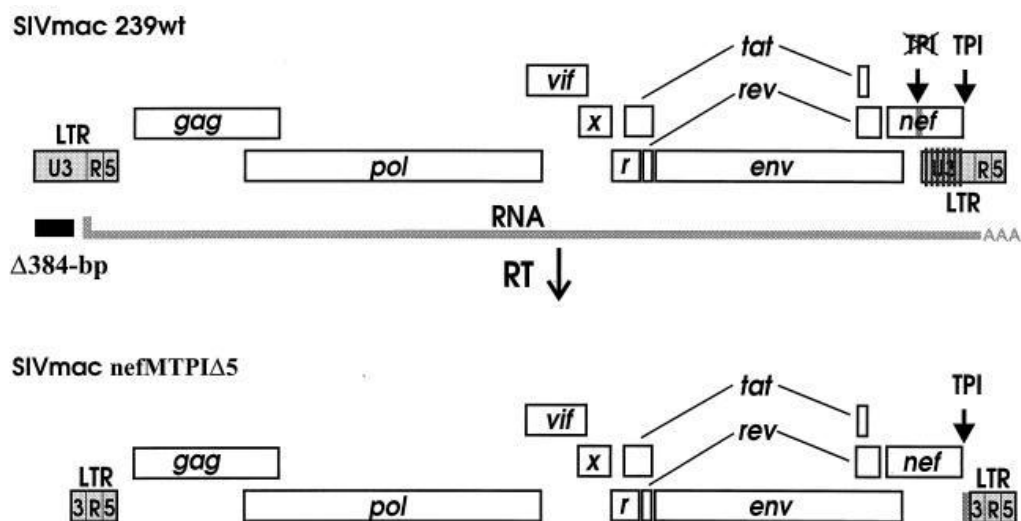
Estes retrovírus circulam naturalmente entre macacos e símios africanos, os quais podem conviver próximos às comunidades humanas, ocasionando risco real para novas transmissões zoonóticas destes agentes virais, visto que a alta incidência de infecção pelo SIV em primatas não humanos, 16,6 %, sugere que na África a exposição de pessoas a uma variedade de SIVs deve ser evento relativamente comum (Verschoor *et al.*, 2003).

4.4.1.2 Estrutura Retroviral

Como todos os retrovírus, o SIV possui envelope lipoproteico adquirido da célula hospedeira, ligeiramente esférico, capsídeo cilíndrico, e genoma composto por dois filamentos idênticos de RNA (Rey *et al.*, 1990).

O genoma de retrovírus exógenos de modo geral consiste de nove arcabouços em fases abertas de leitura (ORFs), flanqueadas por regiões longas repetitivas (LTR), organiza-se em três sequências gênicas, de 5' a 3', em *gag*, *pol* e *env*, codificando proteínas virais estruturais e enzimáticas. Os lentivírus como SIV (Figura 1) e HIV-1/2, apresentam organização genômica mais complexa contendo pequenas fases abertas de leitura (ORFs) localizadas entre as sequências nucleotídicas de *pol* e *env*, os quais são seis ORFs codificando para Vif, Vpx, Vpr, Tat, Rev e Nef em SIV e HIV-2, distintamente do HIV-1 em que Vpx está substituída por Vpu, como também exons na região entre o terminal 3' e o gene *env* (Ferreira *et al.*, 2010). A sequência nucleotídica de *gag* é responsável pela codificação de proteínas estruturais do capsídeo: Matriz (MA), Capsídeo (CA) e Nucleocapsídeo (NU); *env* que codifica as proteínas do envelope viral, que sequencialmente são glicosiladas, a gp120 ou de superfície (SU) e a gp32 ou transmembrana (TM), e *pol*, que codifica as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease (Kanzaki & Looney, 2004; Rey *et al.*, 1990; Cullen, 1992). O genoma é protegido por proteínas

constituindo o nucleocapsídeo viral (Cen *et al.*, 2004). A proteína Vif está associada à infectividade viral e ao controle da produção de progênie viral infecciosa; a Vpr contribui para o transporte do DNA proviral ao núcleo da célula infectada e Nef auxilia na redução dos níveis celulares de moléculas CD4 e MHC classes I e II. As proteínas Tat e Rev estão envolvidas na regulação da expressão gênica (Brooks, 2000; Ferreira *et al.*, 2010).



Fonte: modificado de Münch *et al.*, 2001.

Figura 1. Organização genômica clássica do Vírus da Imunodeficiência Símia. A sequência gênica de *gag* codifica a proteína precursora, Pr 60, clivada em p17, p27, p2, p8, p1 e p6. A região gênica sobreposta de *gag-pol* codifica para os peptídeos p66 e p51 correspondente as duas subunidades da transcriptase reversa, a p32 com função de integrase e p24 do capsídeo viral. O gene *env* codifica proteína precursora glicosilada, gp160, desdobrada em gp32 transmembranaral e gp120 de superfície. Adicionalmente estruturam-se genes acessórios e regulatórios sobrepostos nas regiões de *pol* e *env*, e *ltr* tais como *vif*, *vpr*, *nef*, *tat* e *rev*.

4.4.1.3 Origem e evolução

Os SIVs que infectam chimpanzés selvagens (*Pan troglodytes troglodytes*) e gorilas (*Gorilla gorilla gorilla*) no oeste da África Central são os ancestrais mais próximos do HIV-1/2 (Sharp & Hanh, 2010). Embora as circunstâncias que cercam a origem, evolução e a propagação do HIV-1/2 sejam relativamente mais claras, as indicações da origem do SIV são ainda desconhecidas (Wertheim & Worobey, 2007).

Na África subsaariana são conhecidas mais de 40 espécies diferentes de primatas não humanos infectados naturalmente com o SIV (Bibollet *et al.*, 2004). Cada espécie abriga linhagens geneticamente distintas de SIV, no entanto evidências filogenéticas indicam que SIVs teriam atravessado barreiras interespecies em várias ocasiões no passado (Takehisa *et al.*, 2009).

A ciência ainda não esclareceu se o SIV é uma infecção antiga que foi convergindo com seus hospedeiros primatas há milhões de anos, ou se estes “**encapsulados de ácido nucléico**” chegaram mais recentemente e já aniquilaram linhagens estabelecidas de primatas (Wertheim & Worobey, 2007). Há evidências mais recentes que a infecção *in vivo* por SIV causa depleção de linfócitos T CD4⁺ e eleva a mortalidade entre chimpanzés selvagens, portanto inferindo-se que a origem da AIDS é muitíssimo mais antiga que a emergência do HIV-1/2 (Sharp & Hanh, 2010) e definitivamente, estudos filogenéticos em populações isoladas de símios africanos reportam a existência do SIV por mais de 32.000 anos (Worobey *et al.*, 2010).

Amplas evidências demonstram que o SIV pode migrar para outros hospedeiros filogeneticamente relacionados, e que duas diferentes linhagens virais infectaram chimpanzés, gorilas (Holterman *et al.*, 2000; Holzammer *et al.*, 2001) e mangabeys (Huet *et al.*, 1990; Wertheim & Worobey, 2007), e teriam sido introduzidas em populações humanas pelo menos 11 vezes, gerando o HIV-1/2 (Marx *et al.*, 1991). Em cativeiro, o SIV_{agm}, originalmente isolado do gênero *Cercopitheccus*, foi transmitido ao mangabey africano de coroa branca (*Cercocebus torquatus lunulatus*) e, que por sua vez foi transmitido a várias outras espécies de símios africanos (Nerrienet *et al.*, 2005; Murthy *et al.*, 1996).

Fortes evidências indicam até o momento, sem refutações, que a introdução dos retrovírus exógenos (lentivírus e deltaretrovírus) aos primatas não humanos ocorreu posteriormente a ramificação da árvore filogenética e o isolamento geográfico que compartimentalizou os dois grupos de símios, no novo e velho mundo (Lerche, 2010; Kanzaki & Casseb, 2008; Verdonck *et al.*, 2007).

4.4.1.4 Similaridades entre SIV e HIV

SIV e HIV-1/2 são lentivírus de primatas, compartilhando organizações

genômicas similares, propriedades biológicas e tropismos (Johnson, 1996). As principais células hospedeiras dos lentivírus são da linhagem monocítica/macrofágica e linfócitos T CD4⁺. Ambos os vírus infectam preferencialmente células linfocitárias T auxiliares, utilizando o CD4⁺ como principal receptor e receptores de quimiocinas (CCR5 e CXCR4) como co-receptores (Chen *et al.*, 1998).

4.4.1.5 Imunopatogenia

O SIV infecta primordialmente células T auxiliares CD4⁺, que orquestram todo o mecanismo de defesa do sistema imune contra infecções (Valentine *et al.*, 2009). Uma vez infectadas as células T CD4⁺, o vírus se replica, produzindo grande quantidade de progênie viral, que eventualmente desabilitam estas células de suas funções, infectando outras células, armando redes de sincício via glicoproteínas virais (Garber, 2004). As células T CD8⁺, ou T citotóxicas, mediadoras chave da imunidade antiviral, podem contribuir para o controle da infecção lentiviral através de mecanismos adaptativos. Numerosos estudos indicam que linfócitos T CD8⁺ desempenham papel importante, reprimindo a replicação do vírus (Walker, 2008). Apesar das evidências irrefutáveis de que as células T CD8⁺ são importantes na replicação do SIV e controle durante infecções retrovirais, os mecanismos responsáveis por este efeito antiviral, *in vivo* permanecem mal compreendidos. Apesar dos exaustivos esforços no desenvolvimento de vacinas, os obstáculos são ainda mais fundamentais ao nível da biologia básica de interação entre o vírus e o sistema imunológico, tais como: extrema heterogeneidade do vírus; falta de correlação conhecida de proteção imunológica contra a progressão e transmissão da doença; capacidade do vírus de se tornar imunologicamente silencioso quando a infecção se torna latente, e o fato de que qualquer resposta imune adaptativa ao SIV, resulta na geração e ativação de células T CD4⁺ vírus específicas, as quais são alvos preferenciais para o SIV. Este último efeito pode favorecer a transmissão do vírus e/ou progressão da doença (Garber, 2004).

Alguns indivíduos espontaneamente controlam a replicação do SIV ou HIV-1/2 para níveis muito baixos. Os mecanismos precisos subjacentes a este controle são de grande interesse, como claro entendimento do que constitui boa resposta

imune que poderá auxiliar no desenvolvimento de vacina contra a AIDS (Valentine *et al.*, 2009).

Algumas espécies de primatas não humanos, como macacos rhesus (*Macaca mulatta*), experimentalmente infectados com o SIV desenvolveram imunossupressão profunda dentro de 2 anos de infecção, no entanto a progressão da doença ocorreu de maneira mais rápida em *Macaca nemestrina*, correntemente denominados macacos rabo-de-porco (Gautam *et al.*, 2007). Observa-se que em novos hospedeiros, os vírus apresentam maior potencial patogênico e que variações genéticas e antigênicas podem ser o meio pelo qual estes lentivírus escapem à eliminação pela resposta imune do hospedeiro (Friedman *et al.*, 2006).

O único relato na literatura sobre a evolução natural de infecção por SIVcpz e o impacto nas populações de chimpanzés é conhecido em subespécies de *Pan troglodites schweinfurthii* no leste da África Central, considerado até então o reservatório natural do ancestral do HIV-1 em humanos. Baixos níveis de células T CD4⁺ acompanhado de severa trombocitopenia, perda de peso e períodos inusuais frequentes de infecções com diversos patógenos sugerem infecção progressiva por SIV similar ao observado na infecção humana por HIV-1/2, confirmando observações prévias que SIVcpz pode ser patogênico em seu hospedeiro natural em vida selvagem. A carga viral nestes animais flutuou, em altos níveis comparativamente a animais infectados sem desenvolvimento de doença. A progressão mais rápida a AIDS entre estes animais naturalmente infectados foi mais frequente quando houve superinfecção com 3 diferentes cepas do vírus, no entanto contesta-se, se como em humanos, há animais rápidos progressores e lentos na doença (Etienne *et al.*, 2011), embora Kuwata *et al.* (2006) relatem um grupo minoritário de símios como rápido progressores durante o curso clínico pós-infecção por SIV.

Diferentes mecanismos têm sido associados à ausência de patogenicidade, e recente consenso atualmente afirma que a falta de progressão da doença em algumas espécies de símios é devido ao eficaz controle da ativação imune e proliferação de células T CD4⁺ (Chakrabarti *et al.*, 2000; Dunham *et al.*, 2006). Alelos de *nef* da maioria dos SIVs em infecções que não progredem a doença em seus hospedeiros símios naturais, mas não naqueles de HIV-1 e os precursores símios, modulam negativamente o receptor TCR-CD3⁺ para suprimir a ativação de células T

e apoptose. Esta perda evolucionária da função específica da proteína Nef pode contribuir para a alta virulência do HIV-1 em humanos (Kirchhoff *et al.*, 2008).

4.4.1.6 Modelo de Estudo

Logo após o isolamento e caracterização do HIV-1 (LAV/HTLV-III) em 1983 (Montagnier *et al.*, 1984; Gallo *et al.*, 1984), foram envidados esforços para infectar pequenos animais e primatas não humanos com isolados do HIV-1, dos quais, os animais mais suscetíveis à infecção persistente com HIV-1 foram gibões e chimpanzés (Friedman *et al.*, 2006). Após 10 anos à inoculação, observou-se que dos mais de 100 animais infectados experimentalmente com o HIV-1, somente um chimpanzé desenvolveu sintomas semelhantes aos da AIDS, sendo que os outros persistentemente infectados ao longo de muitos anos de observações, demonstraram capacidade em controlar a infecção viral, apesar de não eliminá-lo, a despeito de forte resposta humoral e celular (Gardner, 1996).

Em outro estudo, pesquisadores utilizaram cepas de HIV-2 (linhagem 287) para infectar macacos rabo-de-porco, o qual representou excelente modelo animal para a patogênese da AIDS, vacina e tratamento (Mansfield *et al.*, 1995).

A natureza proporcionou 3 modelos de lentivírus animais que são substitutos excelentes para humanos infectados com a AIDS: (1) macacos/SIV, (2) HIV-1/2/macacos e (3) FIV/gatos, e ainda um híbrido molecular de SIV e HIV denominado SHIV (Sina *et al.*, 2011). Cada um desses modelos, embora diferentes em período de incubação e virulência, é caracterizado por induzir diminuição seletiva de células T CD4⁺, principal característica do SIV/HIV/AIDS (Gardner, 1996; Kanzaki & Looney, 2004).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Coleta das Amostras Botânicas

O material vegetal foi coletado no bioma Amazônico, no estado do Amapá, em áreas de várzea, cerrado, altas florestas e de transição do platô guianense. Foram feitos registros fotográficos das amostras, buscando-se preferencialmente

plantas utilizadas como alimentos por símios (Figura 2), já utilizadas tradicionalmente por populações locais e ameríndias. Após identificadas, diversas regiões anatômicas das plantas foram coletadas (ramos, caules, folhas, flores e frutos), e preparadas exsicatas mantidas na Embrapa/AP e depositadas nos herbários do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Amapá (IEPA). Este trabalho constitui componente de projetos em que estão envolvidos pesquisadores da Embrapa/AP, Universidade Federal do Amapá/Unifap e Universidade de Brasília/UnB. A autorização do IBAMA para a coleta das plantas foi protocolada no estado do Amapá, submetida em conjunto pela Embrapa/AP e UNIFAP.

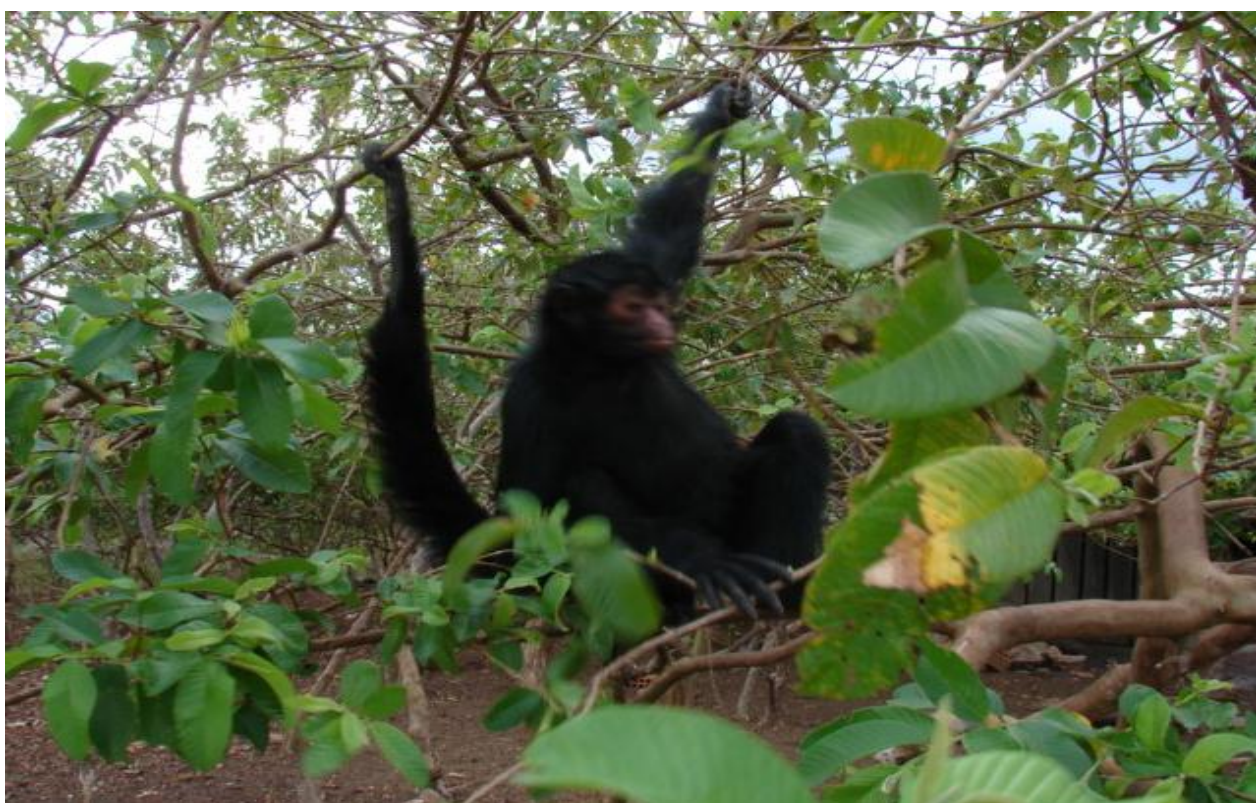


Figura 2. Macaco aranha (*Ateles paniscus*) em goiabeira (*Psidium guajava*) no Amapá.

5.2 Espécimes Botânicas

Neste ensaio foram utilizadas 20 amostras entre cascas do caule, frutos e folhas de plantas amazônicas das famílias Apocynaceae, Rubiaceae, Fabaceae, Caesalpiniaceae, Ochnaceae, Clusiaceae, Arecaceae, Chrysobalanaceae e Olacaceae (Tabela 4) as quais foram higienizadas, secadas em estufa a baixa

temperatura e posteriormente granuladas em moinho de faca (Correia *et al.*, 2008). A coleta das plantas para análise foi realizada em período não reprodutivo e, para o preparo de exsiccatas em época de floração.

Tabela 4. Família de plantas com respectivos extratos obtidos por infusão e seu rendimento final

Código	Família	Parte da planta coletada	Rendimento (gramas)
ESK-01	Apocynaceae	Folhas	8,81
ESK-04	Rubiaceae	Folhas	15,18
ESK-06	Fabaceae	Folhas	16,3
ESK-10	Caesalpiniaceae	Casca	9,95
ESK-22	Rubiaceae	Folhas escuras	12,4
ESK-45	Ochnaceae	Casca do caule	5,09
ESK-71	Clusiaceae	Casca do caule	16,34
ESK-79	Arecaceae	Fruto	5,19
ESK-80	Fabaceae	Folhas	15,59
BR-036	Fabaceae	Folhas	20,97
BR-38	Chrysobalanaceae	Folhas	5,43
BR-042	Olacaceae	Folhas	4,99
BR-50	Chrysobalanaceae	Casca do caule	18,28
BR-51	Fabaceae	Folhas	20,74
BR-52	Fabaceae	Casca do caule	19,06
BR-54	Fabaceae	Casca do caule	23,5
BR-73	Clusiaceae	Casca do caule	14,21
BR-78	Chrysobalanaceae	Folhas	6,2

BR-79	Fabaceae	Casca do caule	9,53
BR-84	Planta aquatica*	Planta inteira	71,44

*sob processo de identificação

5.3 Produção dos Extratos

As amostras granuladas foram pesadas e submetidas à extração por infusão e maceração. Para obtenção dos extratos aquosos, utilizou-se 100 gramas do material botânico granulado em 1 L de água destilada a temperatura de 70 °C, e levadas ao banho-maria até atingir a temperatura de 40 °C, e sequencialmente filtradas, congeladas a -20 °C, liofilizadas em aparelho Liotop.

Para a obtenção do extrato bruto através de maceração, utilizou-se 100 gramas da amostra botânica granulada diluindo-se em solventes em graus diferentes de polaridade, etanol a 95° e hexano (ambos da marca VETEC). As amostras foram mantidas nestes solventes durante 7 dias a temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido três vezes previamente à filtração. Após evaporação do solvente em rotaevaporador (QUIMIS), a 40 °C sob pressão reduzida, o soluto obtido prosseguiu a secagem em temperatura ambiente e armazenado a -20 °C (Correia *et al.*, 2008; Perfeito *et al.*, 2005). Obteve-se o rendimento final da amostra botânica pesando-se o soluto final e subtraindo da massa inicial de trabalho (Tabela 3).

5.4. Linhas Celulares

Foram utilizadas 3 linhagens estabelecidas de células em suspensão: células HUT-78 (catálogo # 301 lote 294-2297) originada de linfoma cutâneo de linfócitos T do sangue periférico de paciente humano com síndrome de Sezary (Gazdar *et al.*, 1980); células Molt-4 (clone 8 catálogo # 175 lote 041241) originalmente derivadas de sangue periférico de paciente humano com diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda; e células H9, obtidas de um único clone de células HUT-78, tanto infectada como não infectada com SIVmac (catálogo # 87 lote # 100090) todas cedidas gentilmente pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH AIDS REAGENT, 2010).

5.5. Cepas Virais Utilizadas

Foram utilizadas as cepas apatogênicas de SIVagm155-4, obtida por transfecção de células CEM-SS utilizando o clone molecular pSIVagm155-4, e SIVmac186, replicando em células H9, ambas gentilmente doadas pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH AIDS REAGENT, 2010).

5.6. Cultivo Celular

5.6.1. Preparação de Meio de Cultura

Neste trabalho utilizou-se o meio RPMI-1640 (INLAB), reconstituído em 1 L de água bidestilada, ajustando-se o pH em torno de 6,8, utilizando 2,2 g/L de bicarbonato de sódio. O meio foi esterilizado por filtração em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 µm (MILLIPORE®) sob pressão de bomba de vácuo (PRISMATEC) e mantido a 4°C. O teste de esterilidade foi realizado utilizando-se o meio Luria-Bertani, incubando-se as amostras em estufa B.O.D (NOVA ÉTICA) a 37°C. Confirmada a esterilidade do meio, suplementa-se com 10 % de soro bovino fetal estéril (SBF), previamente inativado a 56 °C em banho-maria por 30 minutos e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina). Também utilizou-se meio RPMI comercializado em forma líquida, adicionando-se glutamina, soro bovino fetal e antibióticos.

5.6.2. Manutenção das Células

As linhagens celulares foram cultivadas em garrafas de 25 e 75 cm² (marca TPP) estéreis em meio de cultura propício para células em suspensão e de acordo com a necessidade experimental, foram mantidas em incubadora (SANYO), em atmosfera contendo 5 % de CO₂, com umidade controlada e temperatura constante de 37°C. A medida que ocorria a proliferação celular/metabolização, o meio ácido foi removido após centrifugação das células por 5 minutos a aproximadamente 1.500 rpm, adicionando-se meio novo ao sedimento celular. Para manter as linhagens celulares em estoque, o sedimento celular foi ressuspenso em 90% de SBF e 10% de dimetil sulfoxido (DMSO), congeladas inicialmente a -20 °C, transferidas a -80 °C, e finalmente a nitrogênio líquido. Para os ensaios, as células foram rapidamente descongeladas a 37°C e cultivadas em meio adequado como já descrito. Os cultivos foram rotineiramente observados em microscópio invertido (QUIMIS).

5.6.3. Infecção Viral

Para a replicação *in vitro* de SIV, foram utilizadas as linhagens celulares citadas anteriormente (H9 e HUT-78), que já estavam previamente cultivadas em garrafas de poliestireno de 25 cm² com meio RPMI 1640 completo. Após centrifugação por 5 minutos a 1500 rpm, o sedimento foi ressuspensionado em meio novo RPMI, e inoculado 100 µL de SIV_{agm}, seguido de incubação por 48 horas a 37 °C em incubadora de CO₂ (SANYO). O sobrenadante obtido do cultivo foi filtrado em membranas com poros de 0,22 µm e armazenados a -80 °C, utilizado como estoque viral de SIV.

5.6.4. Viabilidade Celular (VC)

A viabilidade celular foi verificada através do método que utiliza como princípio a exclusão do corante vital azul de trypan. Coletou-se alíquota de 10 µl de suspensão de células homogeneizadas e adicionou-se 10 µl de azul de trypan, preparado em concentração de 0,4 % p/v em PBS (INVITROGEN, 2010). A solução homogeneizada foi transferida a câmara de Neubauer e contada as células em 4 quadrantes. As células mortas coram-se em azul e as vivas não captam o corante. O número de células viáveis por mililitro é calculado conforme a equação:

$$VC = \text{total} / 4 \times 20000 = \text{número de células/mL}$$

Após a contagem, ajustou-se o volume de meio RPMI ao número de células que se queria trabalhar, quer seja em placas de 25 cm², placas de 96 e 48 cavidades.

5.6.5. Curva de Crescimento de Células não Infectadas e Infectadas com SIV.

A cada experimento, ajustou-se o número de células ao recipiente de cultivo e volume de Meio RPMI. Os ensaios foram realizados em triplicata, divididos em 2 grupos: células linfoblásticas não infectadas (H9, HUT-78 e Molt-4) e células linfoblásticas que foram infectadas com SIV (H9/SIV) conforme descrito anteriormente com a cepa SIV_{agm} e, células doadas que já vieram infectadas com SIV_{mac} do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos para pesquisa em AIDS. O primeiro experimento foi realizado durante 48 horas, contando-se as células a cada 6 horas. No segundo experimento, as células foram contadas a cada 12 horas

encerrando-se após 120 horas de cultivo. Desta forma, obteve-se a cinética de crescimento populacional das células linfoblásticas livres de infecção viral e infectadas por SIV, utilizando-se duas cepas diferentes, SIVagm e SIVmac.

5.6.6. Teste de Citotoxicidade Celular dos Extratos Vegetais

A concentração dos extratos brutos vegetais utilizada para os ensaios de atividade antiviral foi determinada utilizando-se inicialmente baixas concentrações em testes de citotoxicidade e viabilidade celular por coloração com azul de trypan.

O teste de citotoxicidade utiliza sais de tetrazólio solúveis em água (WST) que ao reagir com enzimas mitocondriais (succinato tetrazólio redutase) liberadas durante o processo de apoptose, se reduz formando compostos de formazan solúveis em água que alteram a leitura em espectrofotômetro. Todos os extratos, separadamente, foram pesados variando a massa entre 3,4 a 5,7 mg, colocados em tubos eppendorf, e diluídos em 2 mL de meio RPMI-1640 (INLAB). Os extratos foram homogeneizados em vortex (CIEN TEC) e centrifugados a 14.000 rpm (MICROCENTRÍFUGA QUIMIS), e coletados seus sobrenadantes, os quais foram adicionados em volume de 50 µL por cavidade em 3 placas de microtitulação de 96 cavidades (TPP) com aproximadamente 325.000 células H9 não infectadas e infectadas com SIVmac em 100 µL por cavidade e submetidas à incubação. A toxicidade celular de cada extrato foi avaliada utilizando-se o kit CytoScan WST-1 (ROCHE). Após 48 horas de incubação a 37°C e atmosfera de 5 % de CO₂, adicionou-se 10 µL de solução de WST. Após intervalos de 30 minutos, 60 minutos e 120 minutos realizou-se a leitura da densidade ótica em espectrofotômetro adaptado a placas de 96 cavidades (LEITOR DE MICROPLACAS DE ELISA) (Chicca *et al.*, 2008). A geração de formazan de cor amarelo-escuro é medida em comprimento de onda entre 420 a 480nm e está diretamente relacionado ao número de células mortas. O controle negativo consistia de células não infectadas e infectadas com SIVmac não tratadas com extrato vegetal, e tratadas com AZT. São considerados tóxicos à célula tratamentos com extratos vegetais gerando leituras de densidade ótica acima das obtidas pelo controle negativo. Desta forma, as concentrações inicialmente ensaiadas variaram entre 85 a 142,5 µg dos extratos em 325.000 células H9.

5.6.7. Detecção de Atividade Antiretroviral

Células linfoblásticas das linhagens H9 e HUT-78 não infectadas e infectadas com SIV_{agm} e SIV_{mac} foram submetidas a tratamento com os extratos aquosos das plantas em estudo. Inicialmente extrapolou-se concentrações de uso que variaram de 272 a 4.000 µg, a partir dos resultados obtidos de citotoxicidade (TABELA 5). Em placas de 48 cavidades, células H9 em densidade de 595.000 células/500 µL foram tratadas com 20 µL de extrato, em triplicata. Após 48 horas de tratamento, as células foram contadas e transferidas a placas de 25 cm² em 5 mL de meio novo e inoculado 1 mL de sobrenadante de células H9 infectadas com SIV_{mac} contendo 599,64 pg/mL. A cada 24 horas as células foram contadas e coletadas alíquotas para determinação da concentração da proteína p27 do SIV.

Tabela 5. Concentração ótima de trabalho dos extratos aquosos.

<u>EXTRATOS</u>	<u>CONCENTRAÇÃO</u>
ESK-01	2.000 µg
ESK-04	4.000 µg
ESK-06	863 µg
ESK-10	272 µg
ESK-22	3000 µg
ESK-45	1189,6 µg
ESK-71	1920 µg
ESK-79	857,2 µg
ESK-80	2000 µg
BR-36	2000 µg
BR-38	1333,2 µg
BR-42	528 µg
BR-50	1500 µg
BR-51	2000 µg
BR-52	2000 µg
BR-54	3000 µg
BR-73	2000 µg
BR-78	326 µg
BR-79	733,2 µg
BR-84	466,6 µg
AZT	200 µg

Para a detecção de infecção por SIV emprega-se o ensaio imunoenzimático (ELISA), o qual fundamenta-se na sensibilização com anticorpo monoclonal murino

anti-SIVp27, de cavidades de placa de poliestireno em fundo chato, conforme o kit comercial “SIV p27 Antigen Capture Assay” (ADVANCED BIOSCIENCE LABORATORIES, INC). Adiciona-se a todas as cavidades sensibilizadas 25 uL de solução tampão com 2,5 % de triton e sequencialmente 100 µL das alíquotas de sobrenadante dos cultivos de células linfoblásticas H9 tratadas com extratos vegetais, previamente centrifugadas a 14.000 rpm durante 2 minutos para remoção de fragmentos celulares. Como controle positivo, utiliza-se antígeno p27 em 6 diluições, em concentrações de 2000, 1000, 500, 250, 125 e 62,5 ng de proteína. O controle negativo constitui-se de meio de cultura RPMI, que também é utilizado para a diluição da proteína SIVp27 e dos sobrenadantes a serem dosados. Após incubação em câmara úmida a 37°C por 1 hora, as cavidades são lavadas por 4 vezes com tampão de salina fosfatada com tween 20 e secadas em papel toalha. Solução de anticorpo monoclonal anti-SIVp27 conjugado a peroxidase “horse radish” é distribuída em volume de 100 µL a cada cavidade e incubada a placa por mais 1 hora nas mesmas condições anteriores. Ao término da reação, as cavidades são novamente lavadas como já descrito, secadas e adicionado 100 µL do substrato a cada cavidade consistindo de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB)/peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Passados 30 minutos, a reação é detida distribuindo-se 100 µL de ácido sulfúrico a 2N em cada cavidade. A leitura da densidade ótica é realizada em espectrofotômetro/leitor de ELISA, em comprimento de onda de 450 nm. A leitura de densidade ótica do controle positivo varia entre 1,2 a 2,4 (Figura 4) e o controle negativo abaixo de 0,15 (ABLINC, 2011).

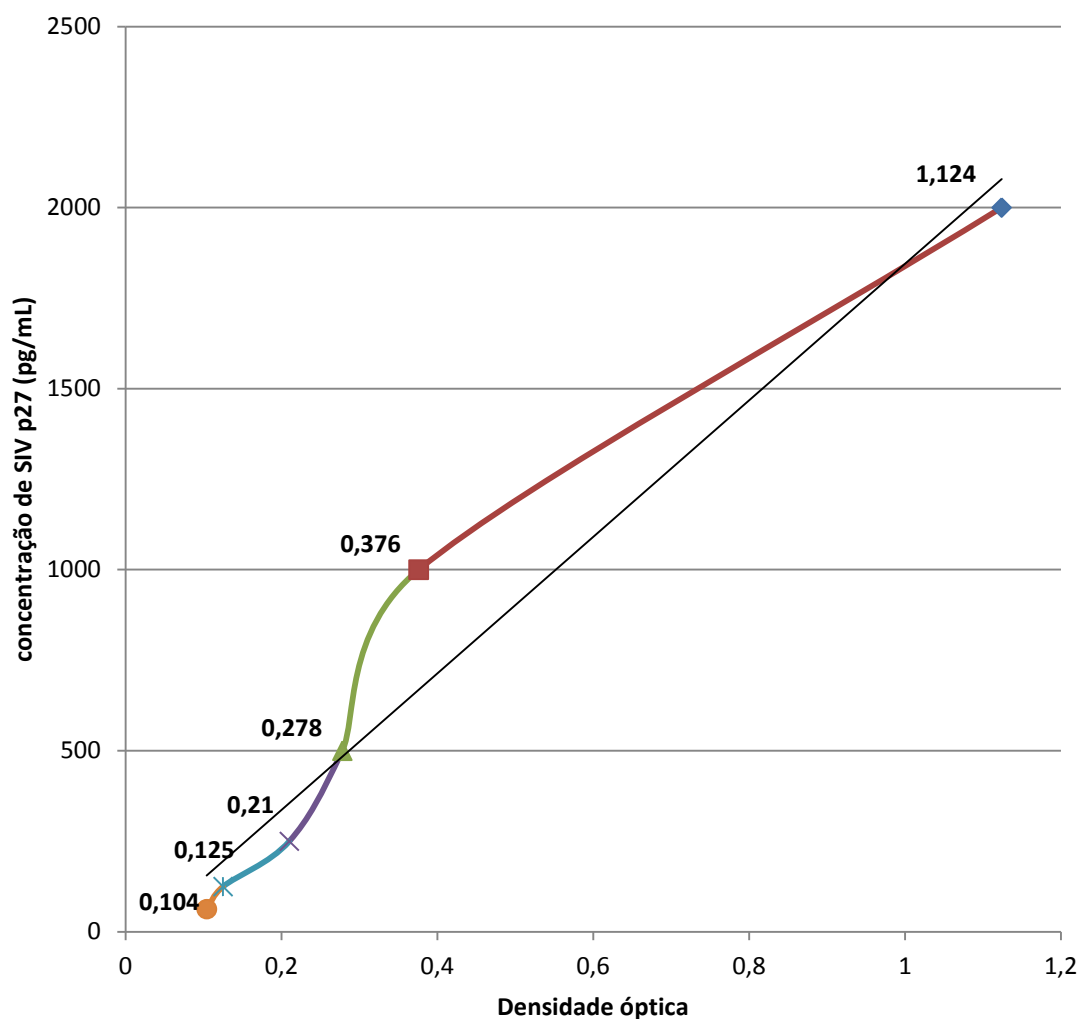


Figura 3. Controle positivo do ensaio de ELISA.

6. RESULTADOS

6.1. Curva de Crescimento

Os ensaios de cultivo de células linfoblásticas HUT-78 e H9, não infectadas e infectadas com SIVagm e SIVmac (Figuras 4 e 5), demonstraram a capacidade do SIV em induzir a proliferação das células. Especificamente em relação a linhagem Molt-4, a curva de crescimento foi difícil de ser estabelecida, visto que comparativamente às outras linhagens celulares, HUT-78 e H9, há maior susceptibilidade ao efeito citopático, com formação de sincícios, que com a perda da individualidade, a contagem das células em câmara de Neubauer é impraticável.

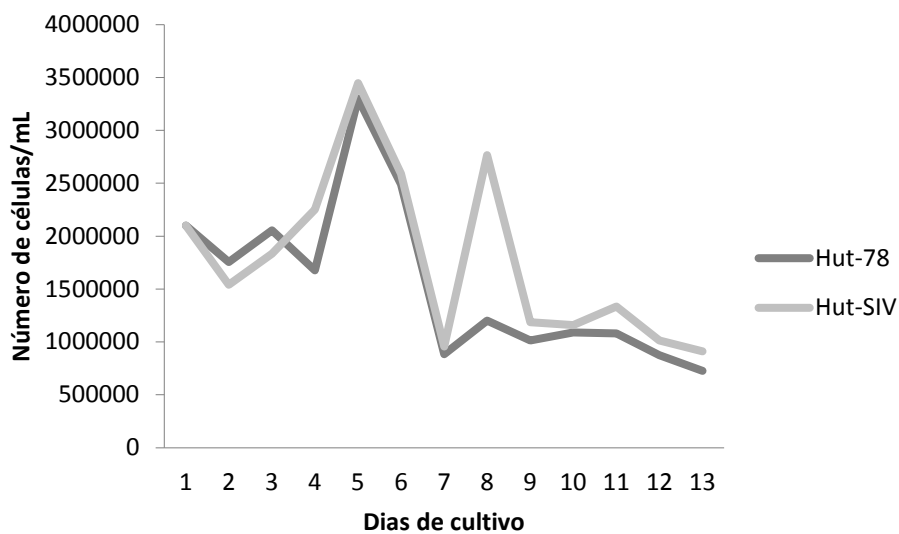


Figura 4. Curva de crescimento de Hut-78 não infectada e infectada por SIVagm.

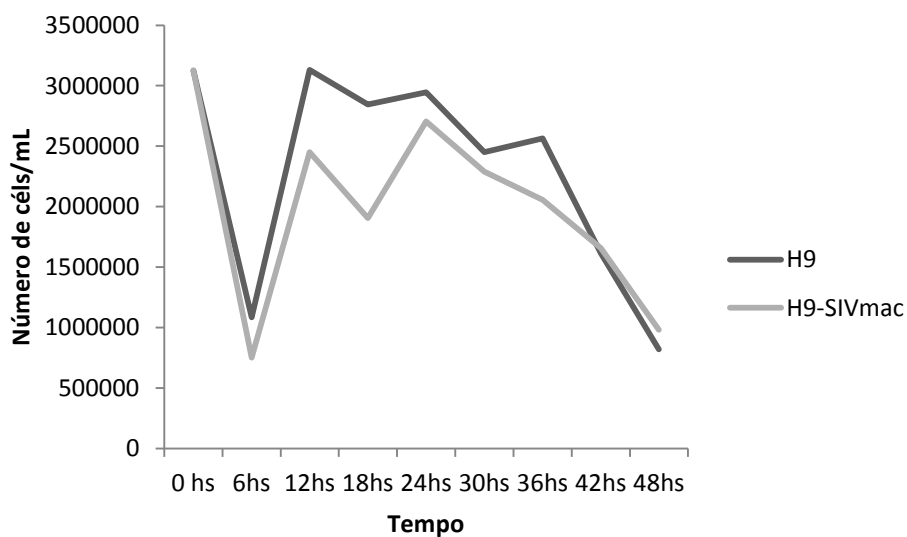


Figura 5. Curva de crescimento de células H9 não infectadas e infectadas com SIVmac.

6.2. Ensaio de Citotoxicidade e Viabilidade Celular

O teste de citotoxicidade e viabilidade celular mostrou que a maioria dos extratos inicialmente induziram a proliferação celular em baixas concentrações, em média 85 µg (Figura 7), sem apresentar toxicidade. Enquanto que em concentrações maiores que 10.000 µg, começava a haver inibição da divisão celular e

aparecimento de sinais de citotoxicidade (Figura 6). As concentrações ótimas de trabalho dos extratos vegetais variavam entre 4.000 a 272 μg . Todas as concentrações ensaiadas baseiam-se em densidade celular de 1.000.000, 325.000 a 595.000 células em volumes de 200 μL , 500 μL e 6.000 μL de meio de cultivo.

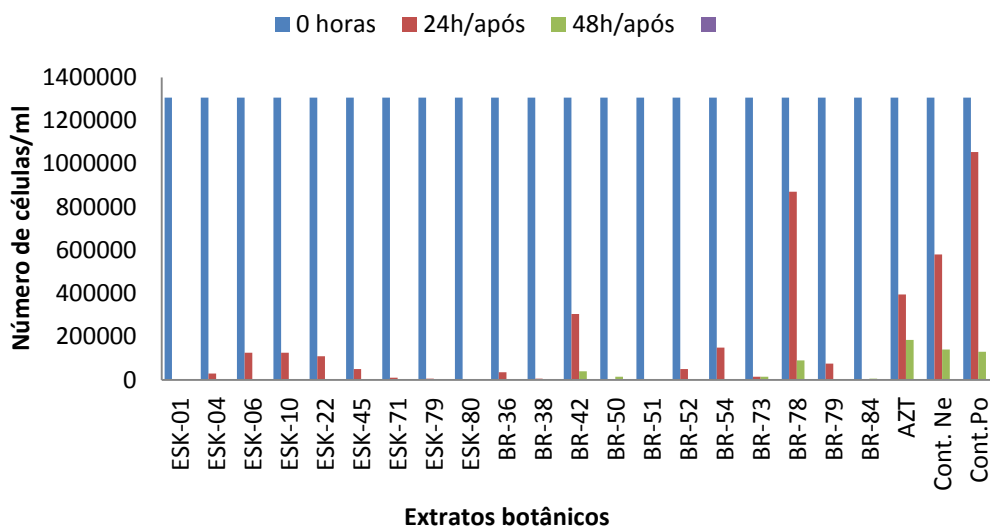


Figura 6. Células H9SIV tratadas com altas concentrações de extratos botânicos.

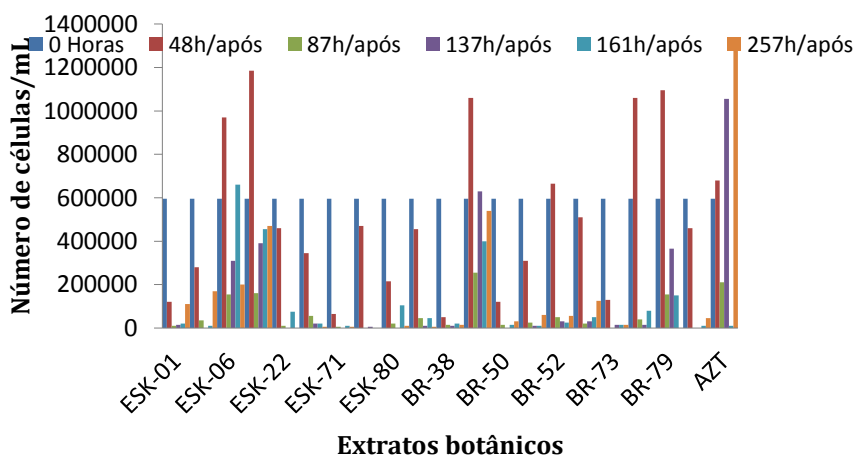


Figura 7. Células H9SIV tratadas com baixas concentrações do extratos botânicos.

6.3. Ensaio de Atividade Antiretroviral

Utilizando-se as concentrações ótimas entre 272 a 4.000 μg dos extratos em estudo, observou-se expressiva ação inibitória da replicação viral entre um representante da família Fabaceae. Embora em termos absolutos, o teste de ELISA tenha registrado a redução de SIVp27 por ação de 8 extratos (ESK-71, ESK-80, BR-

50, BR-51, BR-52, BR-54, BR-73 e BR-78) como apresentado na Figura 8 e Tabela 6, apenas 1 reduziu a produção de SIVp27 sem contudo interferir na proliferação celular (BR-54), além do que, em experimento de citotoxicidade e viabilidade celular, as linhas celulares linfoblásticas não infectadas, submetidas à ação deste extrato, da família Fabaceae, induziu expressiva proliferação celular, distintamente a qualquer outro extrato testado que apesar de induzirem a proliferação celular, não sustentaram por mais tempo este estado, já declinando a densidade celular após as 96 hs de cultivo (Figura 9 e Tabela 6).

Tabela 6: Concentração de SIV p27 de células H9 tratadas com extratos e densidade celular contadas em diferentes intervalos de tempo

Extrato	Nº. Céls. 0 hs	Nº. Cels 48 hs	Conc. SIVp27 pg/mL	Nº. Cels 96 hs	Conc. SIVp27 pg/mL	Nº. Cels 144 hs
ESK-01	5,95X10 ⁵	4,2X10 ⁴	231,10	1,0X10 ⁴	178,31	1,5X10 ⁴
ESK-04		9,8X10 ⁴	225,44	3,5X10 ⁴	199,05	0
ESK-06		3,395X10 ⁵	200,93	1,55X10 ⁵	204,70	3,1X10 ⁵
ESK-10		4,1475X10 ⁵	204,70	1,6X10 ⁵	187,74	3,9X10 ⁵
ESK-22		1,61X10 ⁵	259,38	1,0X10 ⁴	185,85	0
ESK-45		1,2705X10 ⁵	244,30	5,5X10 ⁴	259,39	2,0X10 ⁴
ESK-71		2,275X10 ⁴	363,08	5,0X10 ³	230,00	0
ESK-79		1,645X10 ⁵	327,26	0	223,56	0
ESK-80		7,525X10 ⁴	383,82	20000	193,39	0
BR-36		1,5925X10 ⁵	297,09	45000	189,62	1,0X10 ⁴
BR-38		1,75X10 ⁴	298,97	15000	197,16	1,0X10 ⁴
BR-42		3,71X10 ⁵	297,09	255000	224,36	6,3X10 ⁵
BR-50		4,2X10 ⁴	351,77	15000	174,54	0
BR-51		1,085X10 ⁵	377,08	25000	207,39	1,0X10 ⁴
BR-52		2,3275X10 ⁵	361,19	50000	203,62	3,0X10 ⁴
BR-54		1,785X10 ⁵	400,79	20000	194,19	3,0X10 ⁴
BR-73		4,55X10 ⁴	419,64	0	140,60	0
BR-78		3,71X10 ⁵	474,32	40000	182,08	1,5X10 ⁴
BR-79		3,8325X10 ⁵	142,49	155000	261,27	3,65X10 ⁵
BR-84		1,61X10 ⁵	182,08	0	204,70	0
AZT	2,22X10 ⁵	195,28	210000	178,31	1,055X10 ⁶	
CONT.NEG	3,71X10 ⁵	--	343.453	--	696613	

¹ Número de células tratadas com extratos.

² Número de células tratadas com extratos e infectadas com 594,98 pg/ML de SIVmac

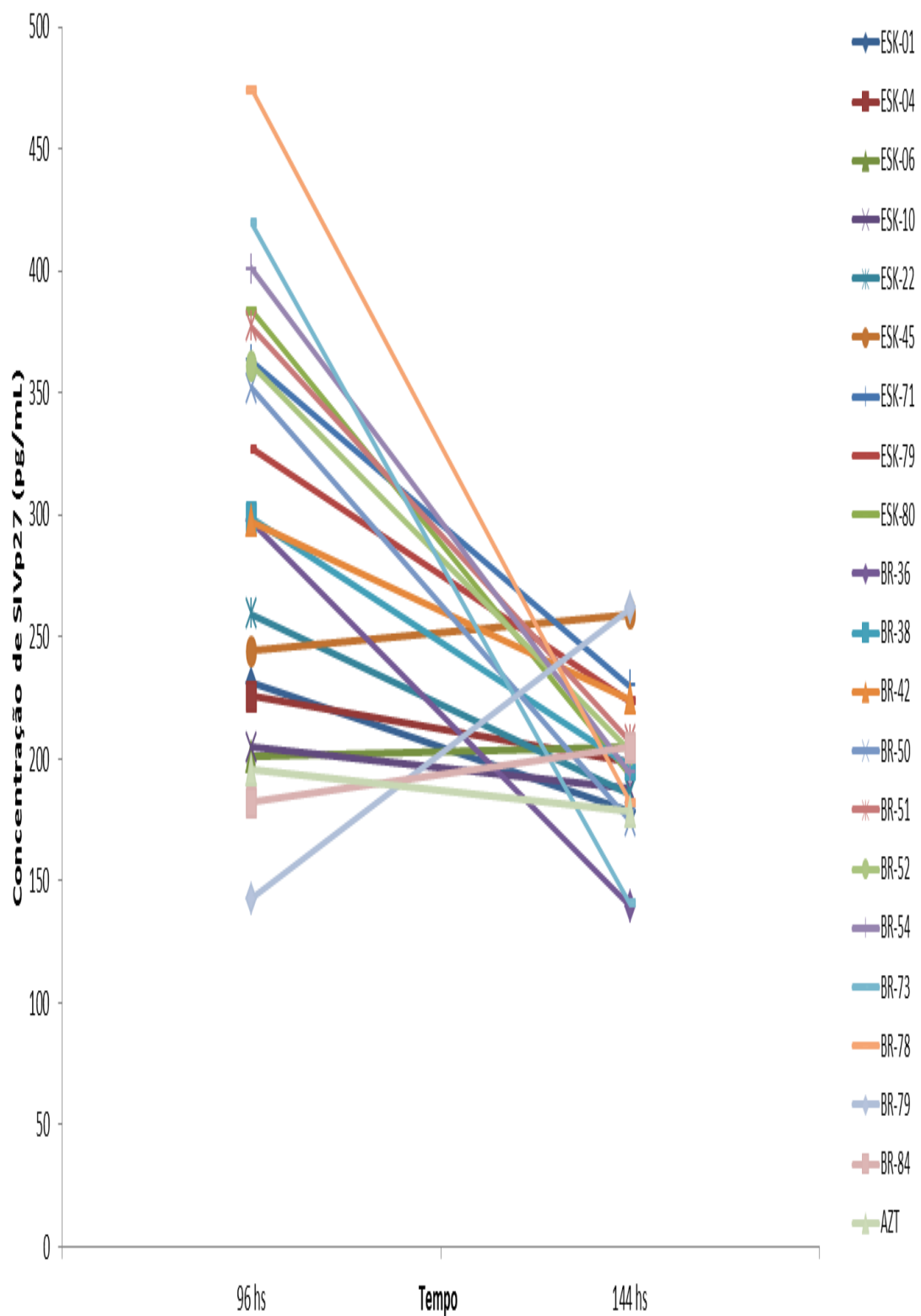


Figura 8. Valores de densidade óptica/concentração de p27 no ensaio de ELISA de sobrenadantes de células H9 tratadas com extratos botânicos.

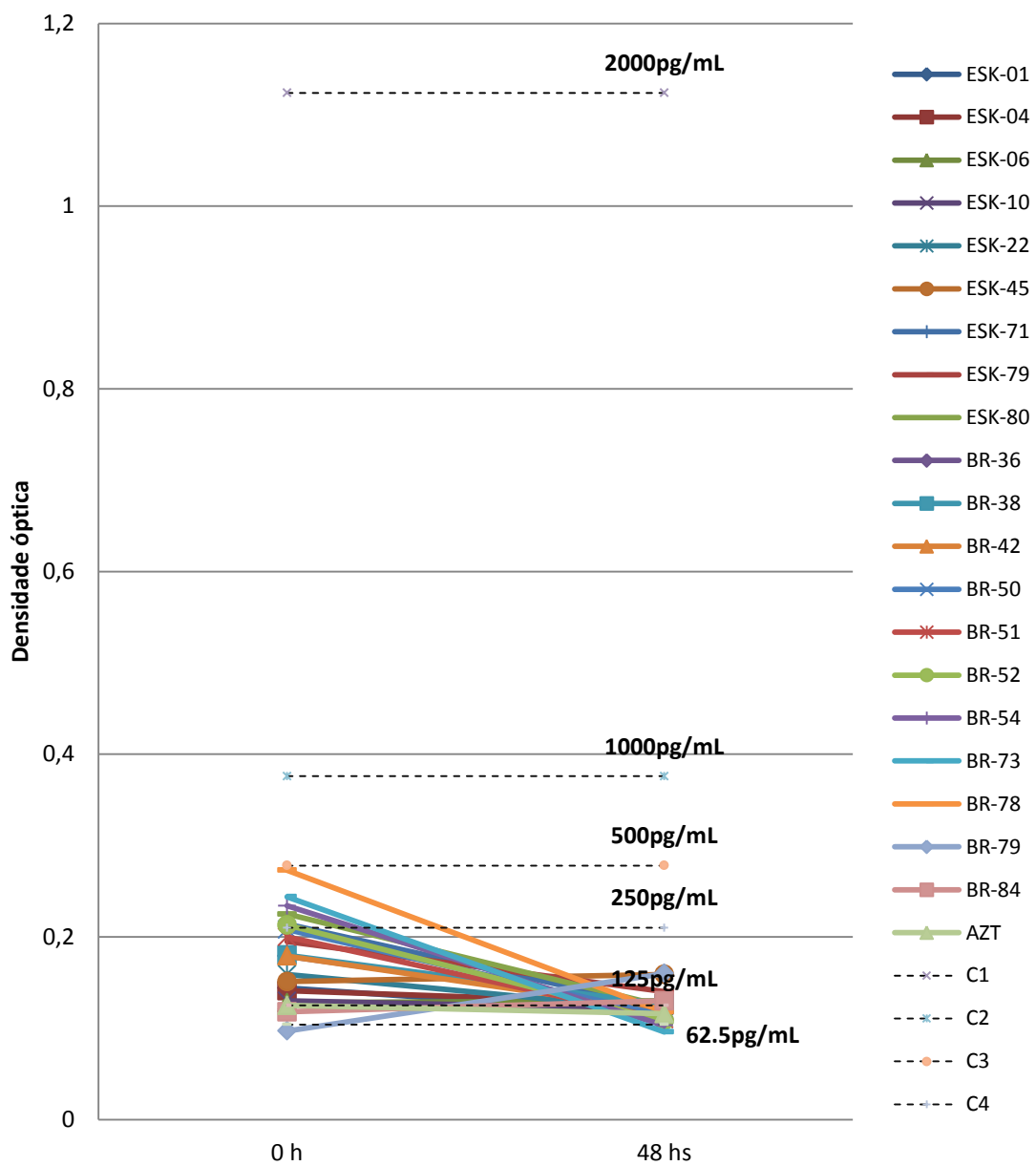


Figura 9. Interpolação de valores de concentração de p27 de sobrenadantes de células H9 tratados com extratos botânicos e controle positivo (CP)

6.4. Diferentes Concentrações dos Extratos Brutos Vegetais

A consistência, massa e volume de cada extrato apresentaram-se diferentes, dificultando a homogeneidade em termos de tentativa de uso de quantidades iguais de todos os extratos para os ensaios (Tabela 4).

6.5. Efeito Citopático Observado

O efeito citopático (ECP) observado para o SIV compreendeu alterações que se caracterizaram pela formação de sincício, de células gigantes multinucleadas, desorganização no citoplasma, formando, algumas vezes, focos de aglomerados celulares arredondados (semelhantes a cachos de uvas), células binucleadas e também lise celular (Figura 10 e 11).

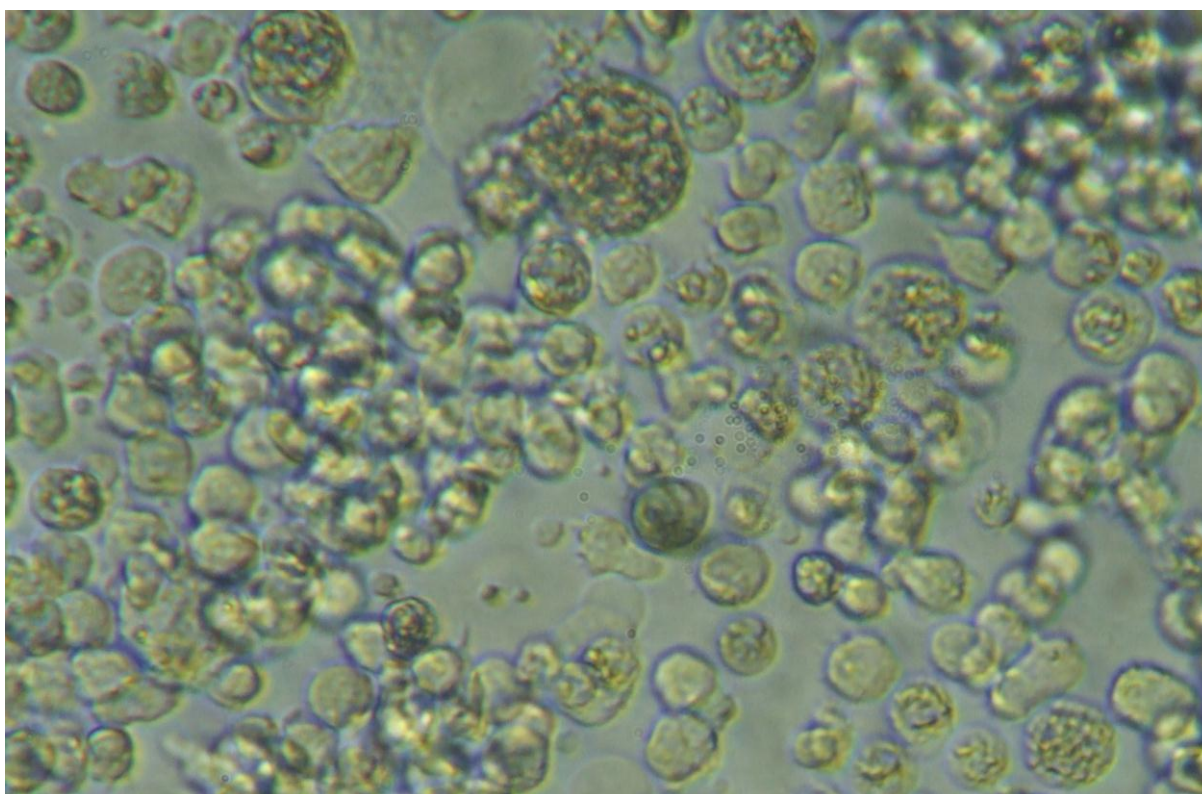


Figura 10. Micrografia ótica de células HUT-78 infectadas com SIVagm (400x)

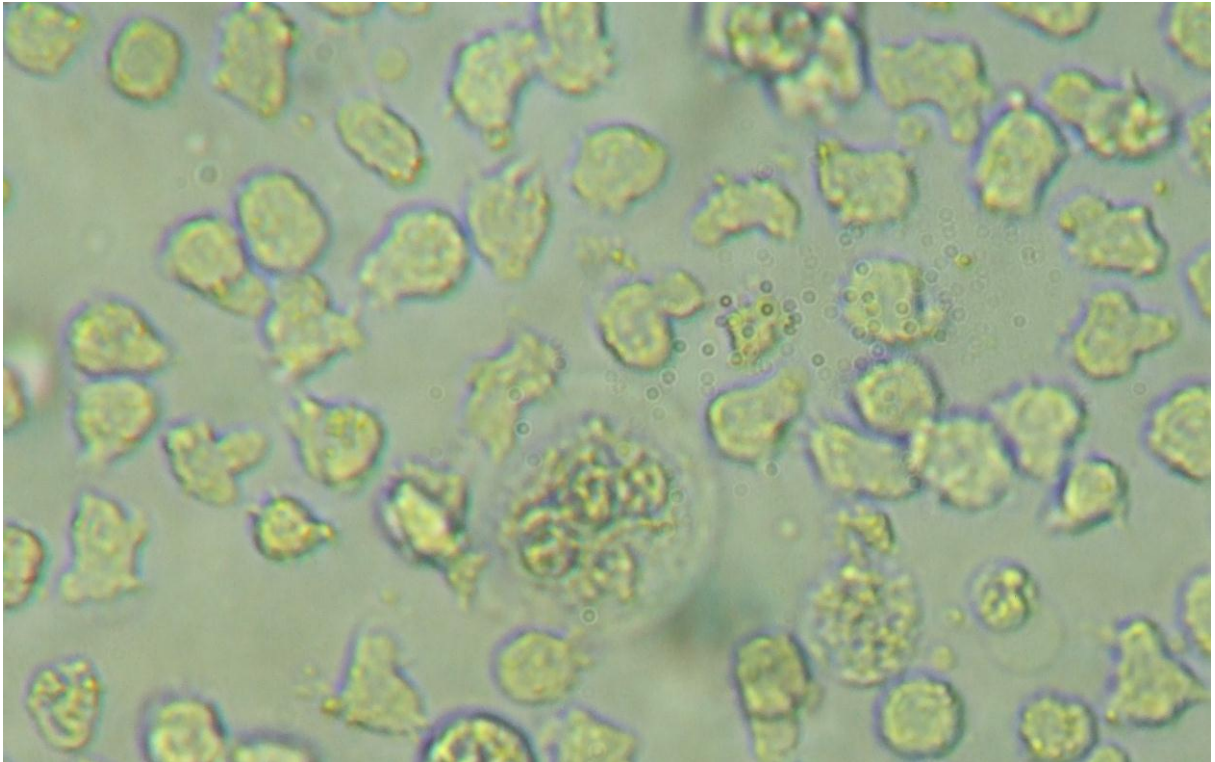


Figura 11. Micrografia ótica de células H9 não infectadas (400x)

7. DISCUSSÃO

A indução da proliferação celular das linhagens HUT-78, H9 e MOLT-4 desencadeada pela infecção pelo SIV *in vitro* observada neste estudo é comumente reportada *in vivo*, entre pacientes humanos infectados pelo HIV-1, fator determinante na patogênese do SIV/HIV na etiologia e progressão da AIDS em primatas, mecanismo este que redundava na total exaustão das células T CD4⁺, o que cognomina a síndrome. Este achado é amplamente reportado na literatura na infecção natural pelo SIV/HIV e *in vivo* experimentalmente com SIV e SHIV (Catalfamo *et al.*, 2011; Brunner *et al.*, 2011). Contrariamente ao que ocorre entre macacos do velho mundo, a proteína Nef codificada pelo SIV parece contrabalançar este mecanismo reduzindo a proliferação celular ao agir sobre os receptores TCR/CD3⁺ dos linfócitos T alvos. Este mecanismo de controle, ainda não bem compreendido, que de certo modo permitiria a coexistência do SIV entre populações de macacos do velho mundo, ainda não evoluiu na relação homem versus HIV-1, ou seja, Nef ainda não é eficiente na homeostase da infecção do HIV-1 no homem (Schmökkel *et al.*, 2011).

Os extratos ESK-06, ESK-10, BR-42, BR-78 e BR-79 das famílias Fabaceae, Caesalpiniaceae, Olacaceae e Chrysobalanaceae apresentaram atividade linfoproliferativa e/ou imunomodulatória dos linfoblastos em experimento, os quais são alvo da infecção pelo SIV/HIV. Independentemente da infecção lentiviral, estas plantas poderiam ter aplicação tanto terapêutica como biotecnológica, como fitomitoógenos (Naithani *et al.*, 2008; Martins&Santos, 1995; Gazdar *et al.*, 1980).

Os extratos ESK-01, ESK-04, ESK-71, ESK-80, BR-38, BR-50 e BR-73 das famílias Apocynaceae, Rubiaceae, Clusiaceae, Fabaceae e Chrysobalanaceae exibiram atividade citotóxica frente às linhagens celulares aqui utilizadas. Esta ação melhor estudada e confirmada poderia gerar fitomedicamentos com citotoxicidade específica para células infectadas com SIV e/ou células neoplásicas.

O extrato BR-54 da família Fabaceae reduziu a concentração de SIV sem contudo alterar a densidade celular, portanto surge como potencial candidato a agente antiretroviral. Há escassos relatos na literatura acerca da ação antiretroviral de plantas, no entanto o uso destas é restrito. No momento atual, em que novas plantas são reveladas quanto às suas atividades medicinais, comprovadas em experimentos em laboratório, dificilmente poderão ser utilizadas como fitoterápicos, mas terão que esperar pelo menos 10 anos para preencher todos os requisitos de segurança e eficácia, visto a necessidade de serem aprovadas após passarem por muitos ensaios, pré-clínicos e clínicos, e obviamente do mercado, para serem finalmente utilizadas pelo homem. Embora as populações tradicionais em países em desenvolvimento e pobres as continuem usando como fitoterápicos, particularmente em comum associação à antiretrovirais, as publicações especializadas, em periódicos de forte impacto, demonstrem sua incompatibilidade com os medicamentos sintéticos, aprovados pelo FDA, ANVISA e outras entidades (Dev 2010; Da Cunha *et al.*, 2007; Cragg *et al.*, 1997; Gonçalves 2006), desencorajando esta associação por interferir na terapêutica (Hardman *et al.*, 2005).

Os extratos ESK-06, ESK-10 e BR-42 das famílias Fabaceae, Caesalpiniaceae e Olacaceae relativamente reduziram a concentração viral visto que ocorreu expressivo incremento na densidade das células infectadas com SIV. Estes achados necessitam ser melhor estudados, confirmados e compreendidos.

Apesar do grande foco de atenção residir quase que exclusivamente na interação do genoma do vírus e sua expressão e a resposta do hospedeiro (Palermo *et al.*, 2011), sem considerar o ambiente, propomos neste trabalho que, além dos

fatores comumente citados e amplamente discutidos referentes ao papel do estresse na ativação do vírus e fator debilitante do sistema imune do hospedeiro (Jam *et al.*, 2010), enfatizamos que, a alimentação, atualmente mais considerada plástica e energética entre humanos, embora haja corrente emergente voltada aos nutracêuticos (Olsen, 2011), entre primatas não humanos, a nutrição pode se considerar bem mais funcional e com papel mais protetivo e estimulante das defesas imunológicas, integradas não só na necessidade plástica e energética. Assim portanto, muitos dos alimentos vegetais dos primatas não humanos e provavelmente de outros taxa, sustentem atividades imunoestimulantes.

O fato que as plantas coletadas estão no novo mundo e os primatas não humanos do velho mundo não compartilham o SIV com os macacos do novo mundo, não descarta nossa proposição, posto que as famílias de plantas estudadas neste trabalho possuem representantes no continente africano, com ancestrais comuns amplamente ilustrado na literatura especializada, com plantas medicinais comuns nos dois continentes (Chidume *et al.*, 2002; Kotwal *et al.*, 2005; Mbagwu *et al.*, 2007; Mbagwu&Adeyemi, 2008; Sucher & Carles, 2008; Kihampa *et al.*, 2009; Bouetard *et al.*, 2010; Onasanwo *et al.*, 2010; Marnewick *et al.*, 2010).

Embora inicialmente um dos objetivos deste trabalho também tenha sido a detecção de sequências gênicas de SIV em amostras fecais de símios do novo mundo (*Ateles paniscus*, *Ateles belzebuth*, *Ateles marginatus*, *Lagothrix lagotricha*, *Cebus apella*, *Saimiri boliviensis*, *Saimiri sciureus*, *Potos flavus*, *Chiropotes satanas*, *Cebus albifrons*, *Callimico goeldii*, *Callicebus cupreus*, *Leontopithecus rosalia*, *Callithrix argentata*, *Leontopithecus chrysopycus*, *Saguinus midas niger*, *Saguinus imperator*, *Mico chrysoleucus*, *Leontopithecus chrysomelas*, *Aotus nigriceps*, *Pithecia irrorata*, *Callicebus moloch*, *Alouatta caraya*, *Callithrix penicillata*, *Callithrix geoffroyi*, *Ateles chamek*) e do velho mundo (*Lophocebus aterrimus*, *Papio hamadryas*, *Macaca fuscata*) coletadas na Fundação Zoológico de Brasília, de forma a sustentar a presente hipótese, contatos com a Dra. Beatrice Hahn da Universidade do Alabama (comunicação pessoal), considerada a maior autoridade nesta área molecular, com muitos trabalhos relatando a detecção de RNA retroviral de símios do velho mundo em amostras fecais, nos informou que também tentou detectar SIV entre símios do novo mundo, mas sem sucesso. Portanto, considerando a ampla experiência e expertise de Dra. Hahn e sua superioridade em termos de infraestrutura e logística, preferimos trilhar posteriormente a conclusão desta

dissertação, em busca de retrovírus endógenos entre macacos do novo mundo, em estudo comparativo com sequências retrovirais endógenas de primatas não humanos do velho mundo, na tentativa de compreender a evolução destes organismos e sua patogênese entre antropóides e na evolução para o HIV-1/2 no homem e possível papel dos alimentos vegetais nos mecanismos imunomodulatórios nestes hospedeiros.

A ação imunomodulatória sobre células linfoblásticas observada neste trabalho e particularmente de um representante da família Fabaceae, inibindo fortemente a replicação retroviral nos conduz a imaginar como se comportam os primatas não humanos, em que sua dieta é basicamente de plantas da mesma família e gêneros das aqui estudadas. Embora utilizadas pelo homem como medicinal, seu uso não é constante, portanto a metabolização das mesmas é limitada e conseqüentemente a eliminação pelo organismo, diferentemente do que ocorre com os primatas não humanos que teoricamente as utilizam por milhares de anos, portanto plenamente adaptadas às suas enzimas para desdobramento e eliminação pelo organismo.

Os animais domesticados, alimentados com ração, a cada geração, deixam de utilizar sua maquinaria enzimática para metabolização e eliminação de produtos naturais. Ainda como resquícios longíquos na memória celular, ainda observamos gatos e cães mastigando ervas em busca de alívio de seus padecimentos. Da mesma forma, o homem ao abandonar as cavernas, optou pelas drogas sintéticas, superdosadas em seus princípios ativos, eliminadas outras moléculas por desconhecer suas funções provavelmente protetoras. Curiosamente os relatos na literatura científica provam a incompatibilidade do uso em comum de medicamentos sintéticos e ervas (Shord *et al.*, 2009), Por exemplo, o abacavir, inibidor nucleosídico da transcriptase reversa, não pode ser administrado em pacientes que façam consumo do alho, *Allium sativum*, pois o mesmo ativa enzimas CYP que rapidamente metabolizam o abacavir reduzindo extremamente sua eficácia terapêutica (Ho *et al.*, 2010). Muitas outras plantas têm sido relatadas em sua ação antagônica sobre medicamentos sintéticos (Meel, 2010).

Fundamentado nos resultados obtidos e relatos da literatura, lançamos as hipóteses de: possível ação imunomodulatória de plantas da família Fabaceae, Caesalpiniaceae, Olacaceae Chrysobalanaceae sobre as células linfocíticas, as quais inibiriam a replicação viral, e ainda, em natureza os hospedeiros do SIV

utilizam alimentos vegetais com atividades imunoestimulantes/antiretroviral que poderiam atenuar a infecção viral.

As plantas aqui estudadas são principalmente utilizadas como antiinflamatórios, antimicrobianos, para combate de parasitas intestinais, dentre muitas outras aplicações populares (comunicação pessoal). Estudos preliminares das plantas aqui investigadas são encontrados em Correa *et al.* (2008 e 2010), reportando atividade antibacteriana entre os extratos ensaiados. Também em Segovia *et al.* (2010), são relatadas atividades medicinais das plantas aqui investigadas. Dentre os membros da família Fabaceae, cita-se atividade abortiva entre espécies do gênero *Dalbergia* (Peters e Guerra, 1995), provavelmente por sua atividade estrogênica (De-Eknamkul *et al.*, 2011). Detectou-se ainda atividade antibacteriana entre fitopatógenos (Rajaonson *et al.*, 2011), antitrombocítica (Tão e Wang, 2010), antiplasmodial (Songsiang *et al.*, 2009) e antidiarréica (Mujumdar *et al.*, 2005). Entre representantes do gênero *Vatairea* encontramos espécies exibindo atividade anti-hiperglicemiante (Baviloni *et al.*, 2010), embora entre espécies encontradas no Amapá não se encontre relatos na literatura científica. O gênero *Bauhinia* apresenta várias espécies com atividade biológica tais como antimicrobiana, imunomodulatória, cicatrizante, analgésica e antiinflamatória (Chew *et al.*, 2011; Semwal e Sharma, 2011; Dugasani *et al.*, 2010; Kannan *et al.*, 2010; Ananth *et al.*, 2010; Shreedhara *et al.*, 2009).

Espécies da família Apocinaceae encontradas no estado do Amapá não tem sido reportadas na literatura. Entre membros da família Caesalpiniaceae, há estudos de fracionamento de extratos crus compostos de ácido vouacapenico e metil vouacapenato (Kido *et al.*, 2003). Em muitos dos casos, escassas informações são encontradas na literatura como forma de proteção de patentes, similarmente ao que ocorre neste trabalho, em que os extratos com potencial ação antiretroviral, necessitam ser protegidos visto que destas plantas novas drogas antiretrovirais podem ser desenvolvidas.

8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Embora os ensaios *in vitro* sejam limitados, apontamos os resultados aqui obtidos preliminarmente como promissores, principalmente tomando em conta o extrato bruto de uma Fabaceae amazônica (BR-54) atuando sobre a linhagem de

célula linfoblástica induzindo proliferação da mesma, e simultaneamente inibindo vigorosamente a replicação do retrovírus em estudo, e ainda, atividade citotóxica de espécies das famílias Apocynaceae, Rubiaceae, Clusiaceae, Fabaceae e Chrysobalanaceae (ESK-01, ESK-04, ESK-71, ESK-80, BR-38, BR-50 e BR-73) sobre linhas linfoblásticas malignizadas e atividade mitogênica sobre as mesmas linhagens, das famílias Fabaceae, Caesalpinaceae, Olacaceae e Chrysobalanaceae (ESK-06, ESK-10, BR-42, BR-78 e BR-79).

Portanto, estudos posteriores visam:

- Fracionar os componentes químicos dos extratos brutos das plantas que apresentaram atividade antiretroviral;
- Testar essas frações em diferentes concentrações de SIV em cultivo;
- Avaliar se a atividade biológica ocorre no extrato como um todo ou resume-se a alguma fração do mesmo;
- Estudar o mecanismo de ação antiretroviral das frações ou do extrato integral que venham a exibir atividade.
- Provar a atividade antiretroviral entre outros membros da família retroviridae, em particular o HIV, AIEV, FIV e FeLV.
- Avaliar ação imunomodulatória dos extratos *in vivo*.

Em suma, espera-se que estes estudos conduzam ao desenvolvimento de fitoterápicos e novas drogas, genuinamente nacionais, particularmente de ação antiretroviral e possivelmente antineoplásicas.

9 REFERÊNCIAS

ABLINC. Disponível em: < www.ablinc.com/specman/5436&5450.pdf > Acesso em: 28 jan, 2011.

ABOUEM, À., ZINTCHEM, A., BIKOBO, D.N., DE THÉODORE ATCHADÉ A., MBING, J.N., GANGOUE-PIEBOJI, J., TIH, R.G., BLOND, A., PEGNYEMB, D.E., BODO, B. Nitrile glucosides and serotobenine from *Campylospermum glaucum* and *Ouratea turnarea*. **Phytochemistry**. 69(11):2209-13, 2008.

ACUÑA, U. M., FIGUEROA, M., KAVALIER, A., JANCOVSKI, N., BASILE, M. J., KENNELLY, E. J. Benzophenones and biflavonoids from *Rheedia edulis*. **J Nat Prod**. 73(11):1775-9, 2010.

ADARAMOYE, O. A. Protective effect of kolaviron, a biflavonoid from *Garcinia kola* seeds, in brain of Wistar albino rats exposed to gamma-radiation. **Biol Pharm Bull**. 33(2):260-6, 2010.

AGUIAR, J.C., SANTIAGO, G. M., LAVOR, P. L., VERAS, H. N., FERREIRA, Y. S., LIMA, M. A., ARRIAGA, A. M., LEMOS, T. L., LIMA, J. Q., DE JESUS, H. C., ALVES, P. B., BRAZ-FILHO, R. Chemical constituents and larvicidal activity of *Hymenaea courbaril* fruit peel. **Nat Prod Commun**. 5(12):1977-80, 2010.

ALBUQUERQUE, U.P. & HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Rev Bras Farmacog**. 16: 678-689, 2006.

ALCARO, S., ALTERI, C., ARTESE, A., CECCHERINI-SILBERSTEIN, F., COSTA, G., ORTUSO, F., PARROTTA, L., PERNO, C.F., SVICHER, V. Molecular and structural aspects of clinically relevant mutations related to the approved non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. **Drug Resist Updat**. DOI:10.1016/j.drug.2011.01.002, 2011.

ANANTH, K.V., ASAD, M., PREM KUMAR, N., ASDAQ, S.M., RAO, G.S. Evaluation of Wound Healing Potential of Bauhinia purpurea Leaf Extracts in Rats. **Indian J Pharm Sci.** 72(1):122-7, 2010.

ANURADHA, V., SRINIVAS, P.V., RAO, R.R., MANJULATHA, K., PUROHIT, M. G., RAO, J. M. Isolation and synthesis of analgesic and anti-inflammatory compounds from ochna squarrosa l. **BIOORG MED CHEM.** 14(20):6820-6, 2006.

AURICCHIO, P. **Primatas do Brasil.** São Paulo, Terra Brasilis, 168 p. 1995.

BANKAR, G. R., NAYAK, P. G., BANSAL, P., PAUL, P., PAI, K. S., SINGLA, R. K., BHAT, V. G. Vasorelaxant and antihypertensive effect of Cocos nucifera Linn. endocarp on isolated rat thoracic aorta and DOCA salt-induced hypertensive rats. **J Ethnopharmacol.** 134(1):50-4, 2011.

BAVILONI, P.D., DOS SANTOS, M.P., AIKO, G.M., REIS, S.R., LATORRACA, M.Q., DA SILVA, V.C., DALL'OGGIO EL, DE SOUSA, J.R, LOPES, C.F., BAVIERA, A.M., KAWASHITA, N.H. Mechanism of anti-hyperglycemic action of Vatairea macrocarpa (Leguminosae): investigation in peripheral tissues. **J Ethnopharmacol.** 131(1):135-9, 2010.

BENEDEK, B., WENIGER, B., PAREJO, I., BASTIDA, J., ARANGO, G. J., LOBSTEIN, A., CODINA, C. Antioxidant activity of isoflavones and biflavones isolated from Godoya antioquiensis. **Arzneimittelforschung.** 56(9):661-4, 2006.

BHANDARE, A. M., KSHIRSAGAR, A. D., VYAWAHARE, N. S., HADAMBAR, A. A., THORVE, V. S. Potential analgesic, anti-inflammatory and antioxidant activities of hydroalcoholic extract of Areca catechu L. nut. **Food Chem Toxicol.** 48(12):3412-7, 2010.

BIBOLLET-RUCHE, F., BAILES, E., GAO F, POURRUT, X., BARLOW, K.L. New simian immunodeficiency virus infecting De Brazza's monkeys (Cercopithecus

neglectus): Evidence for a Cercopithecus monkey virus clade. **J Virol.** 78:7748–7762, 2004.

BILIA, A. R., BRACA, A., MENDEZ, J., MORELLI, I. Molluscicidal and piscicidal activities of Venezuelan Chrysobalanaceae plants. **Life Sci.** 2000; 66(4):PL53-9.

BODEKER, G., CARTER, G., BURFORD, G., & DVORAK-LITTLE, M. HIV/AIDS: Traditional systems of health care in the management of a global epidemic. **J Altern Complement Med.** 12(6):563-76, 2006.

BONVISSUTO, G., MINUTOLI, L., MORGIA, G., BITTO, A., POLITO, F., IRRERA, N., MARINI, H., SQUADRITO, F., ALTAVILLA, D. Effect of *Serenoa repens*, lycopene, and selenium on proinflammatory phenotype activation: an in vitro and in vivo comparison study. **Urology.** 77(1):248.e9-16, 2011.

BOUETARD, A., LEFEUVRE, P., GIGANT, R., BORY, S., PIGNAL, M., BESSE, P., GRISONI, M. Evidence of transoceanic dispersion of the genus *Vanilla* based on plastid DNA phylogenetic analysis. **Mol Phylogenet Evol.** 55(2):621-30, 2010.

BOURRY, O., MANNIOUI, A., SELIER, P., ROUCAIROL, C., DURAND-GASSELIN, L., DEREUDDRE-BOSQUET, N., BENECH, H., ROQUES, P., LE GRAND, R. Effect of a short-term HAART on SIV load in macaque tissues is dependent on time of initiation and antiviral diffusion. **Retrovirology.** 7:78, 2010.

BRACA, A., SORTINO, C., POLITI, M., MORELLI, I., MENDEZ, J. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. **J Ethnopharmacol.** 79(3):379-81, 2002.

BROOKS, G.F., BUTEL, J.S., MORSE, S.A., JAWETZ, MELNICK & ADELBERG
Microbiologia Médica, 21th ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2000.

BRUNNER, J., BOEHLER, T., EHEMANN, V., KASSAM, S., OTTO, H., SERGI, C.
Decreased Apoptosis Despite Severe CD4 Depletion in the Thymus of a Human
Immunodeficiency Virus-1 Infected Child. **Klin Padiatr**. DOI: 10.1055/s-0030-
1270514), 2011.

BUDDE, M.L., LHOS, T. J.J., BURWITZ, B.J., BECKER, E.A., BURNS, C.M.,
O'CONNOR, S.L., KARL, J.A., WISEMAN, R.W., BIMBER, B.N., ZHANG, G.L.,
HILDEBRAND, W., BRUSIC, V., O'CONNOR, D.H. Transcriptionally Abundant Major
Histocompatibility Complex Class I Alleles are Fundamental to Non-Human Primate
SIV-specific CD8+ T Cell Responses. **J Virol**. DOI:10.1128/JVI.02355-10), 2011.

CARBONARI, K. A., FERREIRA, E. A., REBELLO, J. M., FELIPE, K. B., ROSSI, M.
H., FELÍCIO, J. D., FILHO, D. W., YUNES, R. A., PEDROSA, R. C. Free-radical
scavenging by *Ouratea parviflora* in experimentally-induced liver injuries. **Redox
Rep**. 11(3):124-30, 2006.

CARDOSO, C. L., CASTRO-GAMBOA, I., BERGAMINI, G.M., CAVALHEIRO, A.J.,
SILVA, D.H., LOPES, M.N., ARAÚJO, A.R., FURLAN, M., VERLI, H., BOLZANI, V.D.
An Unprecedented Neolignan Skeleton from *Chimarrhis turbinata*. **J. Nat. Prod.** 74
(3):487–491, 2011.

CARRAI, V., BORGOGNINI-TARLI, S. M., HUFFMAN, M. A., BARDI, M. Increase in
tannin consumption by sifaka (*Propithecus verreauxi verreauxi*) females during the
birth season: a case for self-medication in prosimians? **Primates**. 44:61–66, 2003.

CARRASCO, D., MÉNDEZ, J., BRACA, A., DE LEO, M., GONZÁLEZ-MUJICA, F., DUQUE, S. Effect of flavonoids from *Exellodendron coriaceum* (Chrysobalanaceae) on glucose-6-phosphatase. **Nat Prod Commun.** 4(12):1657-9, 2009.

CATALFAMO, M., WILHELM, C., TCHEUNG, L., PROSCHAN, M., FRIESEN, T., PARK, J.H., ADELSBERGER, J., BASELER, M., MALDARELLI, F., DAVEY, R., ROBY, G., REHM, C., LANE, C. CD4 and CD8 T Cell Immune Activation during Chronic HIV Infection: Roles of Homeostasis, HIV, Type I IFN, and IL-7. **J Immunol.**186(4):2106-16, 2011.

CEN, S., NIU, M., SAADATMAND, J., GUO, F., HUANG, Y., NABEL, G.J., KLEIMAN, L. Incorporation of pol into human immunodeficiency virus type 1 Gag virus-like particles occurs independently of the upstream Gag domain in Gag-pol. **J Virol.** 78(2):1042–9, 2004.

CHAKRABARTI, L.A., LEWIN, S.R., ZHANG, L., GETTIE, A., LUCKAY, A., MARTIN, L.N., SKULSKY, E., HO, D.D., CHENG-MAYER, C., MARX, P.A. Age-dependent changes in T cell homeostasis and SIV load in sooty mangabeys. **J Med Primatol.** 29(34):158–65, 2000.

CHEN, Z., GETTIE, A., HO, D.D., MARX, P.A. Primary SIVsm isolates use the CCR5 coreceptor from sooty mangabeys naturally infected in West Africa: a comparison of coreceptor usage of primary SIVsm, HIV-2, and SIVmac. **Virology.** 246:113–124, 1998.

CHEW, Y.L., CHAN, E.W., TAN, P.L., LIM, Y.Y., STANSLAS, J., GOH, J.K. Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. **BMC Complement Altern Med.** 11(1):12, 2011.

CHICA, A., F. PELLATI, B., ADINOLFI, A., MATHIAS, I., MASSARELLI, A.M., BIANUCCI, K., BONE, R., LEHMANN, NIERI, P. Cytotoxic activity of polyacetylenes and polyenes isolated from roots of *Echinacea pallida*. **Br J Pharmacol.**153(5):879-85, 2008.

CIBIN, T. R., DEVI, D. G., ABRAHAM, A. Chemoprevention of skin cancer by the flavonoid fraction of *Saraca asoka*. **Phytother Res.** 24(5):666-72, 2010.

CLEMENTS, J.E., PAYNE, S. Molecular basis of the pathobiology of lentiviruses. **Virus Res.** 32:97-109, 1994.

CONSTANTINE, N.T. Serologic tests for the retroviruses: approaching a decade of evolution. **AIDS.** 7:1-13, 1993.

CORREIA, A. F., SEGOVIA, J. F. O., GONÇALVES, M.S.A, DE OLIVEIRA, V.L., SILVEIRA, D., CARVALHO, J. C. T., KANZAKI, L.I.B. Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug-resistant bacteria. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.** 12(6):369-380, 2008.

CORREIA, A. F., SEGOVIA, J. F. O., BEZERRA R. M., GONÇALVES, M. C. A., ORNELAS S. S., SILVEIRA D., CARVALHO J. C. T., SÉRGIO DINIZ P. S. S., KANZAKI L. I. B. Aerobic and Facultative Microorganisms Isolated From Corroded Metallic Structures in a Hydroelectric Power Unit in the Amazon Region of Brazil. **Air, Soil and Water Research.** 3:113–121, 2010.

CAI, L., JIANG, S. Development of peptide and small-molecule HIV-1 fusion inhibitors that target gp41. **Chem Med Chem.** 5(11):1813-24, 2010.

CHANG, C. L., ZHANG, L. J., CHEN, R. Y., KUO, L. M., HUANG, J. P., HUANG, H. C., LEE, K. H., WU, Y. C., KUO, Y. H. Antioxidant and anti-inflammatory phenylpropanoid derivatives from *Calamus quiquesetinervius*. **J Nat Prod.** 73(9):1482-8, 2010.

CHIDUME, F. C., KWANASHIE, H. O., ADEKEYE, J. O., WAMBEBE, C., GAMANIEL, K. S. Antinociceptive and smooth muscle contracting activities of the methanolic extract of *Cassia tora* leaf. **J Ethnopharmacol.** 81(2):205-9, 2002.

CRAGG, G.M., NEWMAN, D.J. & SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. **J Nat Prod.** 60:52-60, 1997.

CULLEN, B.R. Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. **Microbiol. Rev.** 56:375–394, 1992.

DA CUNHA, A.P., TEIXEIRA, F., DA SILVA, A.P., ROQUE, O.R. **Plantas na terapêutica - farmacologia e ensaios clínicos.** Fund. Calouste Gulbenkian. Lisboa, 2007.

DE-EKNAMKUL, W., UMEHARA, K., MONTHAKANTIRAT, O., TOTH, R., FRECER, V., KNAPIC, L., BRAIUCA, P., NOGUCHI, H., MIERTUS, S. Study of natural estrogen-like isoflavonoids and diphenolics from Thai medicinal plants. **J Mol Graph Model.** 29(6):784-94, 2011.

DE MELO, C. M., DE CASTRO, M.C., DE OLIVEIRA, A. P., GOMES, F. O., PEREIRA, V. R., CORREIA, M. T., COELHO, L. C., PAIVA, P. M. Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. **Phytother Res.** 24(11):1631-6, 2010.

DEV, S. Impact of natural products in modern drug development. **Indian J Exp Biol.** 48(3):191-8, 2010.

DINIZ, S.P.S.S.; COELHO, J.S.; ROSA, G.S.; SPECIAN, V.; OLIVEIRA, R.C.; OLIVEIRA, R.R. Bioatividade do óleo essencial de *Mentha arvensis* L. no controle de fitopatógenos. **Rev Bras Plant Med.** 10(4):9-11, 2008.

DUGASANI, S., BALIJEPALLI, M.K., TANDRA, S., PICHKA, M.R. Antimicrobial activity of *Bauhinia tomentosa* and *Bauhinia vahlii* roots. **Pharmacogn Mag.** 6(23):204-7, 2010.

DUNHAM, R., PAGLIARDINI, P., GORDON, S., SUMPTER, B., ENGRAM, J., MOANNA, A., LAWSON, B., MCCLURE, H.M., XIAN-XU, H., IBEGBU, C., KATZ, N., PANDREA, I., APETREI, C., SODORA, D.L., FEINBERG, M.B., STAPRANS, S.I., SILVESTRI, G. The AIDS-resistance of naturally SIV-infected sooty mangabeys is independent of cellular immunity to the virus. **Blood.** 108:209–217, 2006.

EBERLIN, S., DEL CARMEN VELAZQUEZ PEREDA, M., DE CAMPOS DIEAMANT, G., NOGUEIRA, C., WERKA, R. M., DE SOUZA QUEIROZ, M. L. Effects of a Brazilian herbal compound as a cosmetic eyecare for periorbital hyperchromia ("dark circles"). **J Cosmet Dermatol.** 8(2):127-35, 2009.

ETIENNE, L., NERRIENET, E., LEBRETON, M., BIBILA, G.T., FOUPOUAPOUOGNIGNI, Y., ROUSSET, D., NANA, A., DJOKO, C.F., TAMOUFE, U., AGHOKENG, A.F., MPOUDI-NGOLE, E., DELAPORTE, E., PEETERS, M., WOLFE, N.D., AYOUBA, A. Characterization of a new simian immunodeficiency virus strain in a naturally infected *Pan troglodytes troglodytes* chimpanzee with AIDS related symptoms. **Retrovirology.** 8(1):4, 2011.

FEELEY, K.J., SILMAN, M.R. Extinction risks of Amazonian plant species.

FERRARI, S. F., VEIGA, L. M.; URBANI, B. Geophagy in New World Monkeys (Platyrrhini): Ecological and Geographic Patterns. **Folia Primatologica**. 79:402-415, 2008.

FERNANDES, J., CASTILHO, R. O., DA COSTA, M. R., WAGNER-SOUZA, K., COELHO KAPLAN, M. A., GATTASS, C. R. Pentacyclic triterpenes from Chrysobalanaceae species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines. **Cancer Lett**. 190(2):165-9, 2003.

FERREIRA, R.C.C., RIFFEL, A., SANTANA, A.E.G. HIV: mecanismo de replicação, alvos farmacológicos e inibição por produtos derivados de plantas. **Quím. Nova**. 33(8):1743-1755, 2010.

FERREIRA, O.C., VAZ R.S., CARVALHO, M.B., GUERRA, C., FABRON, A.L., ROSEMBLIT, J., HAMERSCHLAK, N. Human T-lymphotropic vírus type 1 and type II infections and correlation with risk factors in blood donors from São Paulo, Brasil. **Transfusion**. 35:258-263, 1995.

FIGUEIRÓ, M., ILHA, J., POCHMANN, D., PORCIÚNCULA, L. O., XAVIER, L. L, ACHAVAL, M., NUNES, D. S., ELISABETSKY, E. Acetylcholinesterase inhibition in cognition-relevant brain areas of mice treated with a nootropic Amazonian herbal (Marapuama). **Phytomedicine**. 17(12):956-62, 2010.

FIORE, C., EISENHUT, M., KRAUSSE, R., RAGAZZI, E., PELLATI, D., ARMANINI, D., BIELENBERG, J. Antiviral effects of Glycyrrhiza species. **Phytother Res**. 22(2):141-8, 2008.

FORD, N., WILSON, D., CHAVES, G.C., LOTROWSKA, E., KIJTIWATCHAKUL, K. Sustaining access to antiretroviral therapy in the less-developed world: lessons from Brazil and Thailand. **AIDS**. 21 Suppl 4:S21-9, 2007.

FRIEDMAN, H., SPECTER, S., BENDINELLI, M. **In vivo models of HIV disease and control**. Springer Science, Inc.233, Spring street, New York, NY 10013, USA. 2006.

GALLO, R.G., SALAHUDDIN, S.Z., POPOVIC, M. Frequent detection and isolation of cytopathicretroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk of AIDS. **Science**. 224:500–503,1984.

GAO, F., YUE, L., WHITE, A. T., PAPPAS, P. G., BARCHUE, J., HANSON, A. P., GREENE, B. M.,SHARP, P. M., SHAW, G. M. & HAHN, B. H. Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. **Nature**. 358:495-9, 1992.

GAO, F., BAILES, E., ROBERTSON, D. L., CHEN, Y., RODENBURG, C. M., MICHAEL, S. F., CUMMINS, L. B., ARTHUR, L. O., PEETERS, M., SHAW, G. M., SHARP, P. M. & HAHN, B. H. Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. **Nature** 397:436-41, 1999.

GARBER, D.A., SILVESTRI, G., FEINBERG, M.B. Prospects for an AIDS vaccine: three big questions, no easy answers. **Lancet Infect Dis**. 4:397–413, 2004.

GARDNER, M.B. The history of simian AIDS, **J. Med. Primatol**. 25, 148–157,1996.

GAUTAM, R., CARTER, A.C., KATZ, N., BUTLER, I.F., BARNES, M., HASEGAWA, A., RATTERRE, M., SILVESTRI, G., MARX, P.A, HIRSCH, V.M., PANDREA, I., APETREI, C. In vitro characterization of primary isolates belonging to SIVsmm Different lineages. In vitro growth in cells is Rhesus Macaque It is unlikely for replication in rhesus monkeys In Vivo. **Virology**. 362(2):257–270, 2007.

GAYATHRI, V., ANANTHI, S., CHANDRONITHA, C., RAMAKRISHNAN, G., SUNDARAM, R. L., VASANTHI, H. R. Cardioprotective effect of nerium oleander flower against isoproterenol-induced myocardial oxidative stress in experimental rats. **J Cardiovasc Pharmacol Ther.**16(1):96-104, 2011.

GAZDAR, A.F.; CARNEY, D. N.; BUNN, P.A.; RUSSEL, E.K.; JAFFE, E.S.; SCHECHTER, G. P.; GUCCION, J. G. Mitogen requirements for the *in vitro* propagation of cutaneous T-cell lymphomas. **Blood.** 55:409-417, 1980.

GONÇALVES, R. S. B. Tripternos como Inibidores de fusão: Uma Nova Estratégia do Combate ao vírus HIV. **Revista Fitos- Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Fitoterápicos.** 2(03):74-82, 2006.

GUPTA, M., MAZUMDER, U. K., KUMAR, R. S., SIVAKUMAR, T., VAMSI, M. L. Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **J Pharmacol Sci.** 94(2):177-84, 2004.

HAHN, B. H., SHAW, G. M., DE COCK, K. M.; SHARP, P. M. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. **Science.** 287:607-14, 2000.

HASUDA, T., HITOTSUYANAGI, Y., TAKEYA, K. Production of monoclonal antibodies against antitumor cyclohexapeptide RA-VII from *Rubia cordifolia* and their characterization. **J Nat Med.** DOI: 10.1007/s11418-011-0508-z, 2011.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G.; GOODMAN & GILMAN. *As bases farmacológicas da terapêutica*, 10^a ed., **McGraw-Hill**: Rio de Janeiro, 2005.

HENDERSON, L. E., BENVENISTE, R. E., SOWDER, R., COPELAND, T. D., SCHULTZ, A. M., OROSZLAN, S. Molecular characterization of gag proteins from simian immunodeficiency virus (SIVMne). **J Virol.** 62(8):2587-95, 1988.

HJELLE, B., CYRUS, S., SWENSON, S.; MILLS, R. Serologic distinction between human T lymphotropic virus (HTLV) type I and HTLV type II. **Transfusion.** 31:731-736, 1995.

HO, B.E., SHEN, D.D., MCCUNE, J.S., BUI, T., RISLER, L., YANG, Z., HO, R.J. Effects of Garlic on Cytochromes P450 2C9- and 3A4-Mediated Drug Metabolism in Human Hepatocytes. **Sci Pharm.** 78(3):473-481, 2010.

HOLTERMAN, L., NIPHUIS, H., KOORNSTRA, W., DUBBES, R., TEN HAAFT, P.; HEENEY, J. L. The rate of progression to AIDS is independent of virus dose in simian immunodeficiency virus-infected macaques. **J Gen Virol.** 81:1719-1726, 2000.

HOLZAMMER, S., HOLZNAGEL, E., KAUL, A., KURTH, R., NORLEY, S. High virus loads in naturally and experimentally SIVagm-infected African green monkeys. **Virology.** 283:324–331, 2001.

HUET, T., CHEYNIER, R., MEYERHANS, A., ROELANTS, G., WAIN-HOBSON, S. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. **Nature.** 345:356–359, 1990.

HUFFMAN, M.A. Self-Medicative Behavior in the African Great Apes: An Evolutionary Perspective into the Origins of Human Traditional Medicine. **BioScience**. 51:651-662, 2001.

ICHINO, C., KIYOHARA, H., SOONTHORNCHAREONNON, N., CHUAKUL W, ISHIYAMA A, SEKIGUCHI H, NAMATAME M, OTOGURO K, OMURA S, YAMADA H. Antimalarial activity of biflavonoids from *Ochna integerrima*. **Planta Med**. 72(7):611-4, 2006.

INTAHPHUAK, S., KHONSUNG, P., PANTHONG, A. Anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic activities of virgin coconut oil. **Pharm Biol**. 48(2):151-7, 2010.

INVITROGEN. Disponível em:

<<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/cryopreservation-of-mammalian-cells.html>> Acesso em: 23 nov. 2010.

JAM, S., IMANI, A.H., FOROUGH, M., SEYEDALINAGHI, S., KOOCHAK, H.E., MOHRAZ, M. The effects of mindfulness-based stress reduction (MBSR) program in Iranian HIV/AIDS patients: a pilot study. **Acta Med Iran**. 48(2):101-6, 2010.

JASSIM, S.A., NAJI, M.A. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. **J Appl Microbiol**. 95(3):412-27, 2003.

JENNINGS, G.T. & BACHMANN M.F. The coming of age of virus-like particle vaccines. **Biol Chem**. 389(5):521-36, 2008.

JOHNSON, R. P. Macaque models for AIDS vaccine development. **Curr Opin Immunol**. 8:554–560, 1996.

JOULAIN, D. Flower scents from the Pacific. **Chem Biodivers.** 5(6):896-909, 2008.

KALLINGS, L.O. The first postmodern pandemic: 25 years of HIV/ AIDS. **J Intern Med.** 263(3):218-43, 2008.

KANNAN, N., RENITTA, R.E., GURUVAYOORAPPAN, C. Bauhinia tomentosa stimulates the immune system and scavenges free radical generation in vitro. **J Basic Clin Physiol Pharmacol.** 21(2):157-68, 2010.

KANNUR, D. M., HUKKERI, V. I., AKKI, K. S. Adaptogenic activity of Caesalpinia bonduc seed extracts in rats. **J Ethnopharmacol.** 108(3):327-31, 2006.

KANZAKI, L.I.B., LOONEY D.J. Feline immunodeficiency virus: a concise review. **Front Biosci.** 9:370-7, 2004.

KANZAKI, L. I .B.; CASSEB, J. Human T-Lymphotropic Viruses Evolution Possibly Explained by Primate Deltaretrovirus Geographical Segregation **Retrovirology: Research and Treatment.** 1:15-20, 2008.

KALYANARAMAN, V.S., SARNGADHARAN, M.G.; ROBERT-GUROF, F. M. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science.** 218:571-573, 1982.

KIDO, T., TANIGUCHI, M., BABA, K. Diterpenoids from Amazonian crude drug of Fabaceae. **Chem Pharm Bull (Tokyo).** 51(2):207-8, 2003.

KIHAMPA, C., NKUNYA, M. H., JOSEPH, C. C., MAGESA, S. M., HASSANALI, A., HEYDENREICH, M., KLEINPETER, E. Anti-mosquito and antimicrobial nor-halimanolids, isocoumarins and an anilinoid from *Tessmannia densiflora*. **Phytochemistry.** 70(10):1233-8, 2009.

KIM, J.H., BAE, C.H., PARK, S.Y, LEE, S. J., KIM, Y. Uncaria rhynchophylla inhibits the production of nitric oxide and interleukin-1 β through blocking nuclear factor κ B, Akt, and mitogen-activated protein kinase activation in macrophages. **J Med Food.** 13(5):1133-40, 2010.

KIM, Y., NARAYANAN, S., CHANG, K. O. Inhibition of influenza virus replication by plant-derived isoquercetin. **Antiviral Res.** 88(2):227-35, 2010.

KIRCHHOFF, F., SCHINDLER, M., SPECHT, A., ARHEL, N., MÜNCH, J. Role of Nef in primate lentiviral immunopathogenesis. **Cell Mol Life Sci.** 65(17):2621-36, 2008.

KIRCHHOFF, F. Is the high virulence of HIV-1 an unfortunate coincidence of primate lentiviral evolution? **Nat Rev Microbiol.** 7(6):467-76, 2009.

KOTWAL, G. J., KACZMAREK, J. N., LEIVERS, S., GHEBREMARIAM, Y. T., KULKARNI, A. P., BAUER, G., DE BEER, C., PREISER, W., MOHAMED, A. R. Anti-HIV, anti-poxvirus, and anti-SARS activity of a nontoxic, acidic plant extract from the Trifolium species Secomet-V/anti-vac suggests that it contains a novel broad-spectrum antiviral. **Ann N Y Acad Sci.**1056:293-302, 2005.

KRIEF, S., HLADIKA, C.M., HAXAIRE, C. Ethnomedicinal and bioactive properties of plants ingested by wild chimpanzes in Uganda. **J Ethnopharm** 101:1–15, 2005.

KUMAR-ROINÉ, S., MATSUI, M., REYBIER, K., DARIUS, H.T., CHINAIN, M., PAUILLAC, S., LAURENT, D. Ability of certain plant extracts traditionally used to treat ciguatera fish poisoning to inhibit nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. **J Ethnopharmacol.** 123(3):369-77, 2009.

KUMAR, V. L., CHAUDHARY, P., RAMOS, M. V., MOHAN, M., MATOS, M. P. Protective Effect of Proteins Derived from the Latex of Calotropis procera against

Inflammatory Hyperalgesia in Monoarthritic Rats. **Phytother Res.** DOI: 10.1002/ptr.3428, 2011.

KUMAR, R. S., SIVAKUMAR, T., SUNDERAM, R. S., GUPTA, M., MAZUMDAR, U. K., GOMATHI, P., RAJESHWAR, Y., SARAVANAN, S., KUMAR, M. S., MURUGESH, K., KUMAR, K. A. Antioxidant and antimicrobial activities of Bauhinia racemosa L. stem bark. **Braz J Med Biol Res.** 38(7):1015-24, 2005.

KUWATA, T., DEHGHANI, H., BROWN, C.R., PLISHKA, R., BUCKLER-WHITE, A., IGARASHI, T., MATTAPALLIL, J., ROEDERER, M., HIRSCH, V.M. Infectious molecular clones from a simian immunodeficiency virus-infected rapid-progressor (RP) macaque: evidence of differential selection of RP-specific envelope mutations in vitro and in vivo. **J Virol.** 80(3):1463-75, 2006.

LEE, H.Z., BAU, D.T, KUO, C.L., TSAI, R.Y., CHEN, Y.C., CHANG, Y. H. Clarification of the phenotypic characteristics and anti-tumor activity of Hedyotis diffusa. **Am J Chin Med.** 39(1):201-13, 2011.

LERCHE, N.W. Simian retroviruses: infection and disease--implications for immunotoxicology research in primates. **J Immunotoxicol.** 7(2):93-101, 2010.

LEROUX, C., CADORÉ, J. L., MONTELARO, R.C. Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? **Vet Res.** 35(4):485-512, 2004.

LEVY, J., CRAWFORD, C., HARTMANN, K., HOFMANN-LEHMANN, R., LITTLE, S., SUNDAHL, E., THAYER, V. American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines. **J Feline Med Surg.**10(3):300-16, 2008.

LI, Y., Z., LI, Z. L., YIN, S. L., SHI, G., LIU, M. S., JING, Y. K., HUA, H. M. Triterpenoids from Calophyllum inophyllum and their growth inhibitory effects on human leukemia HL-60 cells. **Fitoterapia.** 81(6):586-9, 2010.

LIN, C. M., LIN, R. D., CHEN, S. T., LIN, Y. P., CHIU, W. T., LIN, J. W., HSU, F. L., LEE, M. H. Neurocytoprotective effects of the bioactive constituents of *Pueraria thomsonii* in 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-treated nerve growth factor (NGF)-differentiated PC12 cells. **Phytochemistry**. 71(17-18):2147-56, 2010.

LIN, L. C., KUO, Y. C., CHOU, C. J. Immunomodulatory proanthocyanidins from *Ecdysanthera utilis*. **J Nat Prod**. 65(4):505-8, 2002.

LU, H. H., KAO, S. Y., LIU, T. Y., LIU, S. T., HUANG, W. P., CHANG, K. W., LIN, S. C. Areca nut extract induced oxidative stress and upregulated hypoxia inducing factor leading to autophagy in oral cancer cells. **Autophagy**. 6(6):725-37, 2010.

LUCETTI, D. L., LUCETTI, E. C., BANDEIRA, M. A., VERAS, H. N., SILVA, A. H., LEAL, L. K., LOPES, A. A., ALVES, V. C., SILVA, G. S., BRITO, G. A., VIANA, G. B. Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. **J Inflamm (Lond)**. 7:60, 2010.

MANSFIELD, K.G., LERCHE, N.W., GARDNER, M.B. Origins of simian immunodeficiency virus infection in macaques at the New England Regional Primate Research Center. **J. Med. Primatol**. 24:116–122, 1995.

MARNEWICK, J. L., RAUTENBACH, F., VENTER, I., NEETHLING, H., BLACKHURST, D. M., WOLMARANS, P., MACHARIA, M. Effects of rooibos (*Aspalathus linearis*) on oxidative stress and biochemical parameters in adults at risk for cardiovascular disease. **J Ethnopharmacol**.133(1):46-52, 2011.

MARTI, G., EPARVIER, V., MORETTI, C., PRADO, S., GRELLIER, P., HUE, N., THOISON, O., DELPECH, B., GUÉRITTE, F., LITAUDON, M. Antiplasmodial benzophenone derivatives from the root barks of *Symphonia globulifera* (Clusiaceae). **Phytochemistry**. 71(8-9):964-74, 2010.

MARTINS, E.R., SANTOS, R.H. **Plantas medicinais: uma alternativa terapêutica de baixo custo**. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 26 p. 1995.

MARX, P. A., LI, Y., LERCHE, N. W., SUTJIPTO, S., GETTIE, A., YEE, J. A., BROTMAN, B. H., PRINCE, A. M., HANSON, A., WEBSTER, R.G., DESROSIERS, R. C. Isolation of a simian immunodeficiency virus related to human immunodeficiency virus type 2 from a West African pet sooty mangabey. **J. Virol.** 65:4480–4485, 1991.

MBAGWU, H. O., ADEYEMI, O. O. Anti-diarrhoeal activity of the aqueous extract of *Mezoneuron benthamianum* Baill (Caesalpiniaceae). **J Ethnopharmacol.** 116(1):16-20, 2008.

MBAGWU, H. O., ANENE, R. A., ADEYEMI, O. O. Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory properties of *Mezoneuron benthamianum* Baill (Caesalpiniaceae). **Nig Q J Hosp Med.** 17(1):35-41, 2007.

MEEL, B.L. HIV/AIDS and traditional healers: a blessing in disguise. **Med Sci Law.** 50(3):154-5, 2010.

MELO, J.G., DE AMORIM, E.L., DE ALBURQUEQUE, U.P. Native medicinal plants commercialized in Brazil - priorities for conservation. **Environ Monit Assess.** 156(1-4):567-580, 2008.

MENDONÇA, P. M., LIMA, M. G., ALBUQUERQUE, L. R., CARVALHO, M. G., QUEIROZ, M. M. Effects of latex from "*Amapazeiro*" *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) on blowfly *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) post-embryonic development. **Vet Parasitol.** DOI:10.1016/j.vetpar.2011.01.002, 2011.

MIRANDA, M. M., GONÇALVES, J. L., ROMANOS, M. T., SILVA, F. P., PINTO, L., SILVA, M. H., EJZEMBERG, R., GRANJA, L. F., WIGG, M. D. Anti-herpes simplex virus effect of a seed extract from the tropical plant *Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch (Chrysobalanaceae). **Phytomedicine**. 9(7):641-5, 2002.

MÖLLER, M., SUSCHKE, U., NOLKEMPER, S., SCHNEELE, J., DISTL, M., SPORER, F., REICHLING, J., WINK, M. Antibacterial, antiviral, antiproliferative and apoptosis-inducing properties of *Brackenridgea zanguebarica* (Ochnaceae). **J Pharm Pharmacol**. 58(8):1131-8, 2006.

MONTAGNIER, L., CHERMANN, J.C., BARRÉ-SINOUSSE, F., KLATZMANN, D., WAIN, S., ALIZON, M., CLAVEL, F., BRUN-VEZINET, F., VILMER, E., ROUZIQUX, C. Lymphadenopathy associated virus and its etiological role in AIDS. **Princess Takamatsu Symp**.15:319-31, 1984.

MONZOTE, L., CUESTA-RUBIO, O., MATHEEUSSEN, A., VAN ASSCHE, T., MAES, L., COS, P. Antimicrobial evaluation of the polyisoprenylated benzophenones nemorosone and guttiferone a. **Phytother Res**. 25(3):458-62, 2011.

MOORTHY, R., PRABHU, K. M., MURTHY, P. S. Mechanism of anti-diabetic action, efficacy and safety profile of GII purified from fenugreek (*Trigonella foenum-graceum* Linn.) seeds in diabetic animals. **Indian J Exp Biol**. 48(11):1119-22, 2010.

MUJUMDAR, A.M., MISAR, A.V., UPADHYE, A.S. Antidiarrhoeal activity of ethanol extract of the bark of *Dalbergia lanceolaria*. **J Ethnopharmacol**. 102(2):213-6, 2005.

MUKHERJEE, M., BHASKARAN, N., SRINATH, R., SHIVAPRASAD, H. N., ALLAN, J. J., SHEKHAR, D., AGARWAL, A. Anti-ulcer and antioxidant activity of GutGard. **Indian J Exp Biol**. 48(3):269-7, 2010.

MURATA, R. M., BRANCO-DE-ALMEIDA, L. S, FRANCO, E. M., YATSUDA, R., DOS SANTOS, M. H., DE ALENCAR, S. M., KOO, H., ROSALEN, P. L. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and development of dental caries in vivo by 7-epiclusianone and fluoride. **Biofouling**. 26(7):865-72, 2010.

MURAKAMI, A., TANAKA, S., OHIGASHI, H., HIROTA, M., IRIE, R., TAKEDA, N., TATEMATSU, A., KOSHIMIZU, K. Chalcone tetramers, lophirachalcone and alatachalcone, from *Lophira alata* as possible anti-tumor promoters. **Biosci Biotechnol Biochem**. 56(5):769-72, 1992.

MURTHY, K.K., COBB, E.K., EL-AMAD, Z., ORTEGA, H., HSUEH, F.C., SATTERFIELD, W., LEE, D.R., KALISH, M.L., NHAIGWOOD, N.L., KENNEDY, R.C., STEIME, K.S., SCHULTZ, A., AND LEVY J.A. Titration of a vaccine stock preparation of human immunodeficiency virus type 1SF2 in cultured lymphocytes and in chimpanzees. **AIDS Res. Hum. Retrovir**. 12:1341–1348, 1996.

NAITHANI, R., HUMA, L.C., HOLLAND, L.E., SHULKA, D., MCCORMICK, D.L., MEHTA, R.G., MORIARTY, R.M. Antiviral activity of phytochemicals: a comprehensive review. **Mini Rev Med Chem**. 8(11):1106-33, 2008.

NAYAK, B. S., ANDERSON, M., PINTO PEREIRA, L. M. Evaluation of wound-healing potential of *Catharanthus roseus* leaf extract in rats. **Fitoterapia**. 78(7-8):540-4, 2007.

NDIAYE, M., DIATTA, W., SY, A. N., DIÈYE, A. M., FAYE, B., BASSÈNE, E. Antidiabetic properties of aqueous barks extract of *Parinari excelsa* in alloxan-induced diabetic rats. **Fitoterapia**. 79(4):267-70, 2008.

NDONGO, J.T., SHAABAN, M., MBING, J.N., BIKOBO, D.N., ATCHADÉ, A. D. E. T., PEGNYEMB, D.E., LAATSCH H. Phenolic dimers and an indole alkaloid from *Campylospermum flavum* (Ochnaceae). **Phytochemistry**.71(16):1872-8, 2010.

NERRIENET, E., SANTIAGO, M.L., FOUPOUAPOUOGNIGNI, Y., BAILES, E., MUNDY, N.I., NJINKU, B., KFUTWAH, A., MULLER-TRUTWIN, M.C., BARRE-SINOUSI, F., SHAW, G.M., SHARP, P.M., HAHN, B.H., AYOUBA, A. Simian immunodeficiency virus infection in wild-caught chimpanzees from Cameroon. **J. Virol.** 79:1312–1319, 2005.

NIH AIDS REAGENT (Instituto nacional de saúde dos EUA). Disponível em:
< <https://www.aidsreagent.org/index.cfm> > Acesso em: 19 dez.2010.

NÚÑEZ M. Clinical syndromes and consequences of antiretroviral-related hepatotoxicity. **Hepatology.** 52(3):1143-55, 2010.

OLSEN, N.J. Nutraceuticals for the treatment of osteoarthritis. **Minerva Med.** 102(1):33-40, 2011.

ONASANWO, S. A., SINGH, N., OLALEYE, S. B., MISHRA, V., PALIT, G. Anti-ulcer & antioxidant activities of *Hedranthera barteri* {(Hook F.) Pichon} with possible involvement of H⁺, K⁺ ATPase inhibitory activity. **Indian J Med Res.** 132:442-9, 2010.

OVESEN, R. G., BRANDT, K.K., GÖRANSSON, U., NIELSEN, J., HANSEN, H.C., CEDERGREEN, N. Biomedicine in the environment: Cyclotides constitute potent natural toxins in plants and soil bacteria. **Environ Toxicol Chem.**
DOI: 10.1002/etc.496, 2011.

PALERMO, R.E., PATTERSON, L.J., AICHER, L.D., KORTH, M.J., ROBERT-GUROFF, M., KATZE, M.G. Genomic analysis reveals pre- and postchallenge differences in a rhesus macaque AIDS vaccine trial: insights into mechanisms of vaccine efficacy. **J Virol.** 85(2):1099-116, 2011.

PAGAA (Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents). Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Washington, DC: U.S. Department of Health and Human Services. Disponível em: <www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf> Acesso em: 20 de dezembro de 2010.

PARVEEN, M., GHALIB, R. M., KHANAM, Z., MEHDI, S. H., ALI, M. A novel antimicrobial agent from the leaves of *Peltophorum vogelianum* (Benth.). **Nat Prod Res.** 24(13):1268-73, 2010

PATERNITI, I., BRIGUGLIO, E., MAZZON, E., GALUPPO, M., OTERI, G., CORDASCO, G., CUZZOCREA, S. Effects of *Hypericum Perforatum*, in a rodent model of periodontitis. **BMC Complement Altern Med.** 2310:73, 2010.

PEGNYEMB, D. E., MBING, J. N., DE THÉODORE ATCHADÉ, A., TIH, R. G., SONDEGAM, B. L., BLOND, A., BODO, B. Antimicrobial biflavonoids from the aerial parts of *Ouratea sulcata*. **Phytochemistry.** 66(16):1922-6, 2005.

PERFEITO, P., SANTOS, M.L.S., LOPEZ, K.S.E., PAULA, J.E., SILVEIRA, D. Characterization and biological properties of *Pouteria torta* extracts: a preliminary study. **Brazilian J Pharmacog.** 15, 183-186, 2005.

PETERS, V.M., GUERRA, M.D. Effects of *Dalbergia subcymosa* Ducke decoction on rats and their offspring during pregnancy. **J Ethnopharmacol.** 46(3):161-5, 1995.

PHILIPPI, M. E., DUARTE, B. M., DA SILVA, C. V., DE SOUZA, M. T., NIERO, R., CECHINEL FILHO, V., BUENO, E. C. Immunostimulatory activity of *Calophyllum brasiliense*, *Ipomoea pes-caprae* and *Matayba elaeagnoides* demonstrated by human peripheral blood mononuclear cells proliferation. **Acta Pol Pharm.** 67(1):69-73, 2010.

PIATO, A. L., DETANICO, B. C., LINCK, V. M., HERRMANN, A. P., NUNES, D. S., ELISABETSKY E. Anti-stress effects of the "tonic" *Ptychopetalum olacoides* (Marapuama) in mice. **Phytomedicine** 17(3-4):248-53, 2010.

PISONI, G., BERTONI, G., PURICELLI, M., MACCALLI, M., MORONI, P. Demonstration of coinfection with and recombination by caprine arthritis-encephalitis virus and maedi-visna virus in naturally infected goats. **J Virol.** 81(10):4948-55, 2007.

PRADEEP, A. R., HAPPY, D., GARG, G. Short-term clinical effects of commercially available gel containing *Acacia arabica*: a randomized controlled clinical trial. **Aust Dent J.** 55(1):65-9, 2010.

QURESHI, A. K., MUKHTAR, M. R., HIRASAWA, Y., HOSOYA, T., NUGROHO, A.E., MORITA, H., SHIROTA, O., MOHAMAD, K., HADI, A.H., LITAUDON, M., AWANG, K. Neolamarckines A and B, new indole alkaloids from *Neolamarckia cadamba*. **Chem Pharm Bull (Tokyo).** 59(2):291-3, 2011.

RAJAONSON, S., VANDEPUTTE, O.M., VEREECKE, D., KIENDREBEOGO, M., RALAMBOFETRA, E., STÉVIGNY, C., DUEZ, P., RABEMANANTSOA, C., MOL, A., DIALLO, B., BAUCHER, M., EL JAZIRI, M. Virulence quenching with a prenylated isoflavanone renders the Malagasy legume *Dalbergia pervillei* resistant to *Rhodococcus fascians*. **Environ Microbiol.** doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02424.x, 2011.

REY, M.A., LAURENT, A.G., MCCLURE, J., KRUST, B., MONTAGNIER, L., AND HOVANESSIANI, A.G. Transmembrane envelope glycoproteins of Human Rights Immunodeficiency Virus Type 2 and simian immunodeficiency SIV-mac exists as homodimers. **J Virol.** 64:922-926, 1990.

SEGOVIA, J. F. A., GONÇALVES, M. C. A., CARVALHO, J. C. T., CORREIA, A. F., DE OLIVEIRA, V. L., SILVEIRA, D., KANZAKI, L. I. B. A Detecção de Produtos Naturais Biologicamente Ativos em Espécies da Flora do Estado do Amapá **In Programa Primeiros Projetos –PPP**, cap. 4, Secretaria de Estado da Ciência e Tecnologia, Amapá, 2010.

SHARP, P.M., HAHN, B.H. The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 365(1552):2487-94, 2010.

SHORD, S.S., SHAH, K., LUKOSE, A. Drug-botanical interactions: a review of the laboratory, animal, and human data for 8 common botanicals. **Integr Cancer Ther.** 8(3):208-27, 2009.

SCHULZ, V., RUDOLF, H., VARRO E.T. Fitoterapia Racional- Um guia de fitoterapia para as ciências da saúde, Ed. Manole. Primate lentiviruses and AIDS research. **AIDS Rev.** 2:155–167, 2002.

SCHMÖKEL, J., SAUTER, D., SCHINDLER, M., LEENDERTZ, F.H., BAILES, E., DAZZA, M.C., SARAGOSTI, S., BIBOLLET-RUCHE, F., PEETERS, M., HAHN, B.H., KIRCHHOFF, F. The presence of a vpu gene and the lack of Nef-mediated downmodulation of T cell receptor-CD3 are not always linked in primate lentiviruses. **J Virol.** 85(2):742-52, 2011.

SEIDL, P.R. Prospects for Brazilian natural products. **An Acad Bras Cienc.** 71(2):239-47, 1999.

SEMWAL, S., SHARMA, R.K. Antibacterial sesquiterpene lactone glucoside from seed pods of *Bauhinia retusa*. **J Asian Nat Prod Res.** 13(1):75-9, 2011.

SHREEDHARA, C. S., VAIDYA, V. P., VAGDEVI, H. M., LATHA, K. P., MURALIKRISHNA, K. S., KRUPANIDHI, A. M. Screening of *Bauhinia purpurea* Linn. for analgesic and anti-inflammatory activities. **Indian J Pharmacol.** 41(2):75-9, 2009.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMAN, G., MELLO, J. P. C., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. (organ.) *Farmacognosia da planta ao medicamento*, 2^{ed.}, Ed. Universidade/UFRGS (Porto Alegre), pg. 191, 2000.

SINA, S. T., REN, W., CHENG-MAYER, C. Co-receptor use in nonhuman primate models of HIV infection. **J Transl Med.** 9 Suppl 1:S7, 2011.

SONGSIANG, U., WANICH, S., PITCHUANCHOM, S., NETSOPA, S., UANPORN, K., YENJAI, C. Bioactive constituents from the stems of *Dalbergia parviflora*. **Fitoterapia.** 80(7):427-31, 2009.

SUCHER, N. J., CARLES, M. C. Genome-based approaches to the authentication of medicinal plants. **Planta Med.** 74(6):603-23, 2008.

TAKEHISA, J., KRAUS, M. H., AYOUBA, A., BAILES, E., VAN HEUVERSWYN, F., DECKER, J. M., LI, Y., RUDICELL, R. S., LEARN, G. H., NEEL, C., NGOLE, E. M., SHAW, G. M., PEETERS, M., SHARP, P. M., HAHN, B. H. Origin and biology of simian immunodeficiency virus in wild-living western gorillas. **J Virol.** 83(4):1635-48, 2009.

TAO, Y., WANG, Y. Bioactive sesquiterpenes isolated from the essential oil of *Dalbergia odorifera* T. Chen. **Fitoterapia.** 81(5):393-6, 2010.

VALENTINE, L. E., LOFFREDO, J. T., BEAN, A. T., LEO´N, E. J., MACNAIR, C. E., BEAL, D. R., PIASKOWSKI, S. M., KLIMENTIDIS, Y. C., LANK, S. M., WISEMAN, R. W., WEINFURTER, J. T., MAY, G. E., RAKASZ, E. G., WILSON, N. A., FRIEDRICH,

T. C., O'CONNOR, D. H., ALLISON, D. B., WATKINS, D.I. Infection with "leaked" virus variants affect the control of Simian Immunodeficiency Virus SIVmac239 Replication Mamu-B * 08-Positive Macaques. **J Virol.** 83:11514–11527, 2009.

VAN ROMPAY, K. K. A., MATTHEWS, T. B., HIGGINS, J., CANFIELD, D. R., TARARA, R. P., WAINBERG, M. A., SCHINAZI, R. F., PEDERSEN, N. C., NORTH, T. W. Virulence and reduced fitness of simian immunodeficiency virus with the M184V mutation in reverse transcriptase. **J Virol.** 76:6083–6092, 2002.

VAN VAERENBERGH, K. Study of the impact of HIV genotypic drug resistance testing on therapy efficacy. **Verh K Acad Geneesk Belg.** 63(5):447-73, 2001.

VERDONCK, K., GONZÁLEZ, E., VAN DOOREN, S., VANDAMME, A.M., VANHAM, G., GOTUZZO, E. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. **Lancet Infect Dis. Review.** 7(4):266-81, 2007.

VERSCHOOR, E. J., FAGROUCH, Z., BONTJER, I., NIPHUIS, H., HEENEY, J. L. A novel simian immunodeficiency virus isolated from a Schmidts' guenon (*Cercopithecus ascanius schmidti*). **J Gen Virol.** 85(Pt 1):21-4, 2004.

VIJAYAN, P. Antiviral activity of medicinal plants of Nilgiris. **Indian J Med Res.** 120(1):24-9, 2004.

WALKER, B. D., BURTON, D. R. Toward an AIDS vaccine. **Science.** 320:760–764, 2008.

WANG, J., LIU, H., ZHAO, J., GAO, H., ZHOU, L., LIU, Z., CHEN, Y., SUI, P. Antimicrobial and antioxidant activities of the root bark essential oil of *Periploca sepium* and its main component 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde. **Molecules.** 15(8):5807-17, 2010.

WEISS, R.A., GRIFFITHS, D., TAKEUCHI, Y., PATIENCE, C., VENABLES, P.J. Retroviruses: ancient and modern. **Arch Virol Suppl.** 15:171-7, 1999.

WERTHEIM, J.O., WOROBEY, M. A challenge to the ancient origin of SIVagm based on African green monkey mitochondrial genomes. **Plos Pathog** 3(7): e95, 2007.

WILKIN, T. J., SHALEV, N., TIEU, H. V., HAMMER, S. M. Advances in antiretroviral therapy. **Top HIV Med.** 18(2):66-92, 2010.

WONG, S. K., LIM, Y. Y., ABDULLAH, N. R., NORDIN, F. J. Assessment of antiproliferative and antiplasmodial activities of five selected Apocynaceae species. **BMC Complement Altern Med** 11:3, 2011.

WOROBEY, M., TELFER, P., SOUQUIÈRE, S., HUNTER, M., COLEMAN, C.A., METZGER, M.J., REED, P., MAKUWA, M., HEARN, G., HONARVAR, S., ROQUES, P., APETREI, C., KAZANJI, M., MARX, P.A. Island biogeography reveals the deep history of SIV. **Science.** 329(5998):1487, 2010.

RASHAN, L. J., FRANKE, K., KHINE, M. M., KELTER, G., FIEBIG, H. H., NEUMANN, J., WESSJOHANN, L. A. Characterization of the anticancer properties of monoglycosidic cardenolides isolated from Nerium oleander and Streptocaulon tomentosum. **J Ethnopharmacol.** DOI:10.1016/j.jep.2011.01.038, 2011.

RASOARIVELO, S. T., GROUGNET, R., VÉRITÉ, P., LECSÖ, M., BUTEL, M. J., TILLEQUIN, F., GUILLOU, C. R., DEGUIN, B. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of Anthospermum emirnense and Anthospermum perrieri (Rubiaceae). **Chem Biodivers.** 8(1):145-54, 2011.

REUTRAKUL, V., NINGNUEK, N., POHMAKOTR, M., YOOSOOK, C., NAPASWAD, C., KASISIT, J., SANTISUK, T., TUCHINDA, P. Anti HIV-1 flavonoid glycosides from *Ochna integerrima*. **Planta Med.** 73(7):683-8, 2007.

RIGANO, D., RUSSO, A., FORMISANO, C., CARDILE, V., SENATORE, F. Antiproliferative and cytotoxic effects on malignant melanoma cells of essential oils from the aerial parts of *Genista sessilifolia* and *G. tinctoria*. **Nat Prod Commun.** 5(7):1127-32, 2010.

SASIDHARAN, S., NILAWATYI, R., XAVIER, R., LATHA, L. Y., AMALA, R. Wound healing potential of *Elaeis guineensis* Jacq leaves in an infected albino rat model. **Molecules.** 15(5):3186-99, 2010

SCHMIDT, A. J., KRIEG, J. C., HEMMETER, U. M., KIRCHER, T., SCHULZ, E., CLEMENT, H. W., HEISER, P. Impact of plant extracts tested in attention-deficit/hyperactivity disorder treatment on cell survival and energy metabolism in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Phytother Res.** 24(10):1549-53, 2010.

SEM WAL, S., SHARMA, R. K. Antibacterial sesquiterpene lactone glucoside from seed pods of *Bauhinia retusa*. *J Asian Nat Prod Res.* 13(1):75-9, 2011.

SCHMIDT, C. A., MURILLO, R., BRUHN, T., BRINGMANN, G., GOETTERT, M., HEINZMANN, B., BRECHT, V., LAUFER, S. A., MERFORT, I. Catechin derivatives from *Parapiptadenia rigida* with in vitro wound-healing properties. **J Nat Prod.** 73(12):2035-41, 2010.

SHUKLA, S., MEHTA, A., MEHTA, P., VYAS, S. P., SHUKLA, S., BAJPAI, V. K. Studies on anti-inflammatory, antipyretic and analgesic properties of *Caesalpinia bonducella* F. seed oil in experimental animal models. **Food Chem Toxicol.** 48(1):61-4, 2010.

SHUKLA, S., MEHTA, A., JOHN, J., MEHTA, P., VYAS, S. P., SHUKLA, S. Immunomodulatory activities of the ethanolic extract of *Caesalpinia bonducella* seeds. **J Ethnopharmacol.**125(2):252-6, 2009.

SILVA, E. M., CIRNE-SANTOS, C. C., FRUGULHETTI, I. C., GALVÃO-CASTRO, B., SARAIVA, E. M., KUEHNE, M. E., BOU-HABIB, D. C. Planta Med. Anti-HIV-1 activity of the Iboga alkaloid congener 18-methoxycoronaridine. **Planta Med.** 70(9):808-12, 2004.

SINGH, S. K., YADAV, R. P., SINGH, A. Piscicidal activity of leaf and bark extract of *Thevetia peruviana* plant and their biochemical stress response on fish metabolism. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.**14(11):915-23, 2010.

SORO, T. Y., TRAORE, F., SAKANDE, J. Analgesic activity of the aqueous extract from *Ximenia Americana*. **C R Biol.** 332(4):371-7, 2009.

SOUZA, A., MBATCHI, B., HERCHUELZ, A. Induction of insulin secretion by an aqueous extract of *Tabernanthe iboga* Baill. (Apocynaceae) in rat pancreatic islets of Langerhans. **J Ethnopharmacol.**133(3):1015-20, 2011.

SUFFREDINI, I. B., PACIENCIA ML, FRANA SA, VARELLA AD, YOUNES RN. In vitro breast cancer cell lethality of Brazilian plant extracts. **Pharmazie.** 62(10):798-800, 2007.

SULEIMAN, M. M., BAGLA, V., NAIDOO, V., ELOFF, J. N. Evaluation of selected South African plant species for antioxidant, antiplatelet, and cytotoxic activity. **Pharm Biol.** 48(6):643-50, 2010.

SULEIMANA, M., MCGAW, L. J., NAIDOO, V., ELOFF, J. Detection of antimicrobial compounds by bioautography of different extracts of leaves of selected South african tree species. **Afr J Tradit Complement Altern Med.** 7(1):64-78, 2009.

SUSANTO, H., FAKHRUDIN, N., MURTI, Y. B., SUPRIATNO, SISWOMIHARJO, W. Saponins from *Plumeria acuminata* Ait induce cell growth inhibition and apoptosis of oral squamous carcinoma cells. **Chin J Dent Res.**13(2):153-6, 2010.

TAKEHISA, J., KRAUS, M. H., DECKER, J. M., LI, Y., KEELE, B. F., BIBOLLET-RUCHE, F., ZAMMIT, K. P., WENG, Z., SANTIAGO, M. L., KAMENYA, S., WILSON, M. L., PUSEY, A. E., BAILES, E., SHARP, P. M., SHAW, G. M., HAHN, B. H. Generation of infectious molecular clones of simian immunodeficiency virus from fecal consensus sequences of wild chimpanzees. *J Virol.* 81(14):7463-75, 2007.

TANG, W., KUBO, M., HARADA, K., HIOKI, H., FUKUYAMA, Y. Novel NGF-potentiating diterpenoids from a Brazilian medicinal plant, *Ptychopetalum olacoides*. **Bioorg Med Chem Lett.** 19(3):882-6, 2009.

YUAN, Y., DAI, X., WANG, D., ZENG, X. Purification, characterization and cytotoxicity of malanin, a novel plant toxin from the seeds of *Malania oleifera*. **Toxicol.** 54(2):121-7, 2009.

VERONESE, F. D., JOSEPH, B., COPELAND, T. D., OROSZLAN, S., GALLO, R. C., SARNGADHARAN, M. G. Identification of simian immunodeficiency virus SIVMAC env gene products. **J Virol.**63(3):1416-9, 1989.

ZHAO, Y., LIU, J. P., LU, D., LI, P. Y., ZHANG, L. X. A new antioxidant xanthone from the pericarp of *Garcinia mangostana* Linn. **Nat Prod Res.** 24(17):1664-70, 2010.

ZHENG, M., LIU, C., PAN, F., SHI, D., MA, F., ZHANG, Y., ZHANG, Y. Protective Effects of Flavonoid Extract from *Apocynum venetum* Leaves Against Corticosterone-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells. **Cell Mol Neurobiol.** 31(3):421-8, 2011.

ZHONG XZ, WANG GC, WANG Y, ZHANG XQ, YE WC. Monomeric indole alkaloids from the aerial parts of *Catharanthus roseus*. **Yao Xue Xue Bao.** 45(4):471-4, 2010.

