

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

Diego Queiroz Rodrigues

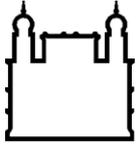
**EFEITO DO FATOR DE CRESCIMENTO DO  
NERVO (NGF) SOBRE A REPLICAÇÃO DO  
HIV-1 EM CÉLULAS PRIMÁRIAS HUMANAS.**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

**Orientador:** Prof. Dr. Dumith Chequer Bou-Babib

**RIO DE JANEIRO**

2009



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**AUTOR: Diego Queiroz Rodrigues**

**EFEITO DO FATOR DE CRESCIMENTO DO  
NERVO (NGF) SOBRE A REPLICAÇÃO DO  
HIV-1 EM CÉLULAS PRIMÁRIAS HUMANAS.**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Dumith Chequer Bou-Habib**

**Aprovada em: 22/06/2009**

**EXAMINADORES:**

**Profa. Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani - Presidente**  
**Prof. Dr. Gonzalo José Bello Bentancor**  
**Profa. Dra. Elizabeth Giestal de Araujo**

# AGRADECIMENTOS

- À minha mãe, pelo apoio irrestrito e incondicional. Sem dúvida você é a pessoa mais importante para que meus anseios e sonhos possam, pouco a pouco, se tornar realidade.
- Aos meus irmãos Andrei, Guilherme e ao meu quase irmão Beбето. Por terem tornado o caminho até aqui bem mais divertido. Obrigado pelas horas de discussão apaixonada sobre o “mais querido do Brasil”.
- Aos amigos, André, Chico, Kene, Pablo, Raquel, Milene, Juliana, Priscila. Vocês foram, cada um a sua maneira, muito importantes para que essa estrada pudesse ser construída.
- Aos amigos feitos nessa caminhada, Eduardo, Victor, Haynna, Julieta, Livia, Jairo. Com certeza tem um muito de vocês neste trabalho. Digo isso não só pelas diversas discussões e dicas científicas, mas pelo companheirismo de sempre. Não foram poucos os experimentos feitos a 4, 6, às vezes, 8 mãos. Vocês possibilitaram que esses 2 anos tenham sido feitos de muitos sorrisos.
- À minha colaboradora e companheira Patrícia. Por todos os ensinamentos moleculares, géis e ajuda nos intermináveis “westerns”. Mas muito mais por ter feito minha vida se encher de luz e felicidade. Sua companhia foi combustível crucial para o término deste trabalho.
- Ao Dumith. Primeiro pelo entusiasmo que conduziu este trabalho, estando sempre disposto a discutir todos os “por menores” de qualquer resultado ou protocolo, sendo um incansável tutor nestes quase 3 anos de convivência. E em segundo, mas com certeza não menos importante, pelo exemplo de integridade moral e ética! Por nos mostrar independentemente das circunstâncias, que uma pessoa não pode perder sua dignidade, contudo sem nunca abdicar da sua nobreza de caráter. Tudo isto com uma pitada de bom humor e cultura, graças aos agradáveis bate-papos sobre vinhos, literatura, viagens, Flamengo, etc.
- Ao Thiago. Por ter confiado em mim e me dado a oportunidade de crescer, além, claro, da amizade e brilhantismo sem os quais este trabalho não existiria.
- À todos do LPT, pela sempre simpática acolhida neste final de percurso.
- À Dra. Juliana De Meis, pela cuidadosa e dedicada revisão desta dissertação
- Ao Professor Carlos Frederico Fontes da Bioquímica Médica da UFRJ por sempre ter aberto suas portas quando precisamos.

- À Dra. Carmen Martins Nogueira, chefe do serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/UFRJ, pelo apoio e fornecimento de bolsas de sangue, material essencial para o estudo.
- Ao NIH AIDS REAGENT PROGRAM, Bethesda, EUA, pelo fornecimento dos isolados virais e outros materiais.
- Às agências de fomento financiadoras do estudo, em particular ao IOC, pela concessão de minha bolsa de mestrado e ainda ao CNPq, PAPES/Fiocruz, POM/IOC.

# SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
SIGLAS E ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A síndrome da imunodeficiência adquirida e o vírus da imunodeficiência Humana.....	1
1.2 Morfologia, genoma viral e ciclo replicativo.....	4
1.3 Imunopatogênese da infecção.....	7
1.4 Fatores que modulam a replicação viral.....	12
1.5 O Fator de Crescimento do Nervo.....	15
1.6 Hipótese.....	18
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivos específicos.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 NGF e isolados virais e outros reagentes.....	20
3.2 Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs).....	20
3.3 Macrófagos Primários.....	20
3.4 Infecção de PBMCs.....	20
3.5 Infecção de Macrófagos.....	21
3.6 Avaliação da replicação do HIV-1.....	21
3.7 Análise do efeito de NGF sobre a replicação do HIV-1 em PBMCs e macrófagos.....	21
3.8 Avaliação de “binding” e entrada viral.....	21
3.9 Detecção do DNA pró-viral total e integrado.....	21
3.10 Análise da transcrição pró-viral.....	22
3.11 Análise das vias de sinalização celular.....	22
3.12 Isolamento do RNA e efeitos do NGF sobre a expressão do APOBEC3G.....	23
3.13 Análise Estatística.....	23

4. RESULTADOS.....	24
4.1 NGF estimula a replicação de HIV-1 em macrófagos humanos infectados <i>in vitro</i> .....	24
4.2 NGF não altera a replicação de HIV-1 em PBMCs humanos infectados <i>in vitro</i> .....	26
4.3 O NGF não modula a captura nem a entrada de HIV-1 em macrófagos humanos infectados <i>in vitro</i> .....	27
4.4 O NGF não altera a integração do DNA pró-viral em macrófagos humanos infectados <i>in vitro</i> .....	29
4.5 NGF induz o aumento da transcrição pró-viral em macrófagos.....	30
4.6 O aumento da replicação de HIV-1 em macrófagos estimulados por NGF é dependente do receptor TrkA.....	31
4.7 Análise de vias de sinalização intracelular envolvidas no efeito do NGF na replicação do HIV-1 em macrófagos humanos infectados <i>in vitro</i> .....	32
4.8 O NGF regula negativamente a produção de APOBEC3G ao nível transcricional.....	33
4.9 O NGF regula negativamente a síntese protéica de APOBEC3G.....	34
5. DISCUSSÃO.....	36
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	46
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
8. ANEXOS.....	64
8.1 Artigos científicos publicados durante a realização do mestrado sem relação com a dissertação.....	64
8.1.1 Characterization of HIV-1 enzyme reverse transcriptase inhibition by the compound 6-chloro-1,4-dihydro-4-oxo-1-( $\beta$ -D-ribofuranosyl) quinoline-3-carboxylic acid through kinetic and <i>in silico</i> studies.....	64
8.1.2 Synthesis, HIV-RT inhibitory activity and SAR of 1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazole derivatives of carbohydrates.....	73
8.1.3 Synthesis, HIV-RT inhibitory activity and SAR of 1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazole derivatives of carbohydrates.....	84

# ÍNDICE DE FIGURAS E TABELA

Figura 1 - Número estimado de pessoas infectadas pelo HIV no mundo.....	3
Figura 2 – Número estimado de novas infecções por HIV em 2007 no mundo.....	3
Figura 3 – Estrutura do vírion.....	4
Figura 4 – Organização gênica e esquema de clivagem do HIV-1.....	5
Figura 5 – O ciclo replicativo do HIV-1.....	7
Figura 6 – Modelo de ativação do sistema imune.....	10
Figura 7 – Ação da proteína APOBEC3G.....	14
Figura 8 – Neurotrofinas e seus receptores.....	16
Figura 9 – Efeito da adição de NGF na replicação de HIV-1 em macrófagos.....	24
Figura 10 - Efeito da adição de NGF na replicação de HIV-1 em macrófagos.....	25
Figura 11 – Cinética da replicação viral em macrófagos.....	25
Figura 12 – Efeito da adição de NGF na replicação de HIV-1 em PBMCs.....	26
Figura 13 – Produção viral em diferentes dias pós infecção de PBMCs.....	27
Figura 14 – Ensaio de <i>Binding</i> do HIV-1.....	28
Figura 15 – Ensaio de entrada do HIV-1.....	28
Figura 16 – Análise da síntese/integração pró-viral.....	29
Figura 17 – Análise da transcrição viral.....	30
Figura 18 – Análise da participação do receptor TrkA.....	31
Figura 19 – Análise das vias de sinalização intracelular.....	32
Figura 20 – Análise da expressão de RNAm para APOBEC3G.....	33
Figura 21 - Análise da síntese de APOBEC3G.....	35
Figura 22 – Via de sinalização envolvida com o efeito de NGF.....	45
Tabela 1 - Nome, especificidade e concentrações dos fármacos utilizados.....	23

# SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS - *Acquired Immune Deficiency Syndrome*, ou Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

DNA - *Desoxyribonucleic Acid*, ou Ácido Desoxiribonucléico.

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ou Ensaio Imunoenzimático.

ERK - *Extracellular Signal-Regulated Kinases*, ou Quinases Reguladoras de Sinal Extracelular.

HIV - *Human Immune deficiency Virus*, ou Vírus da Imunodeficiência Humana.

IFN - Interferon

Ig- Imunoglobulina.

IL - Interleucina.

JNK - *c-Jun N-terminal kinases*, ou Quinase c-Jun N-terminal.

LPS - *Lipopolysaccharide*, ou Lipopolisacarídeo.

LTR - *Long Terminal Repeats*.

MIP - *Macrophage Inflammatory Protein*, ou Proteína Inflamatória de Macrófagos.

NF- $\kappa$ B - *Nuclear factor- $\kappa$ B* ou Fator Nuclear-  $\kappa$ B

NGF – *Nerve Growth Factor*, ou Fator de Crescimento do Nervo.

P38 - *mitogen-activated protein kinases*, ou Proteína Quinase ativada por mitógeno.

PBMCs - *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, ou Células Mononucleares de Sangue Periférico.

PBS - *Phosphate Buffered Saline*, ou Salina Fosfatada Tamponada.

PCR - *Polimerase Chain Reaction*, ou Reação em Cadeia da Polimerase.

PHA - *Phytohemagglutinin*, ou Fitohemaglutinina.

PKA – *Protein Kinase A*, ou Proteína Quinase A.

PKC – *Protein Kinase C*, ou Proteína Quinase C.

PLC - *Phospholipase C*, ou Fosfolipase C.

RANTES - *Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted*.

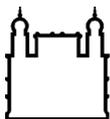
RNA - *Ribonucleic Acid*, ou Ácido Ribonucléico.

RNA<sub>m</sub> - RNA mensageiro.

SIV - *Simiam Immune deficiency Virus*, ou Vírus da Imunodeficiência Símia.

Trk – *Tropomyosin-Related Kinase*, ou Quinase relacionada a tropomiosina.

TNF - *Tumor Necrosis Factor*, ou Fator de Necrose Tumoral.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

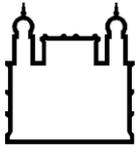
**Efeito do fator de crescimento do nervo (NGF) sobre a replicação do HIV-1 em células primárias humanas.**

### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Diego Queiroz Rodrigues**

O vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), agente etiológico da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), representa um dos patógenos de maior interesse clínico das últimas décadas. Durante a infecção pelo HIV-1 muitas células CD4<sup>+</sup> morrem; enquanto outras, como os macrófagos, sobrevivem e sustentam a replicação do HIV-1 por longos períodos, transformando-se em reservatórios virais. Desta forma, o reconhecimento de fatores que possam manter esses reservatórios celulares vivos e influenciar a replicação do HIV-1 é uma das maiores tarefas para o desenvolvimento de uma estratégia terapêutica mais eficaz. Uma vez demonstrado que a infecção pelo HIV-1 aumenta a secreção do fator de crescimento do nervo (NGF) e que esta molécula é crucial para a sobrevivência de macrófagos, nós analisamos se o NGF poderia modular a replicação do HIV-1 em PBMCs e macrófagos e os mecanismos relacionados a esse fenômeno. Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) e macrófagos infectados *in vitro* com HIV-1 foram tratadas com NGF. A replicação viral foi medida por ELISA para p24 em sobrenadantes de cultura. Diferentes inibidores farmacológicos foram utilizados para a análise de possíveis vias de sinalização intracelular envolvidas com a replicação de HIV-1 induzida por NGF. A participação de APOBEC3G foi avaliada em macrófagos expostos ao NGF, utilizando RT-PCR e “immunoblotting”. Infecções com HIV-1 sincronizadas foram utilizadas para estudar se o NGF poderia influenciar a ligação e entrada do vírus. A integração e a transcrição do HIV-1 foram avaliadas por PCR e real-time PCR, respectivamente. Nossos resultados demonstraram que o NGF estimulou a replicação do HIV-1 em macrófagos mas não em PBMCs atingindo um aumento de até 20 vezes em relação ao controle quando tratado com 10ng/mL. Esta neurotrofina não afetou a adsorção, a penetração, nem a integração do DNA proviral. Desta forma, o NGF deve atuar através da estimulação da transcrição das proteínas virais. A via disparada por NGF que estimula a transcrição do HIV-1 é dependente do receptor TrKA, que leva a mobilização de cálcio intracelular derivado do retículo endoplasmático e a ativação de PKC. Uma vez disparado, PKC ativa ERK1/2, p38quinase e NFκB. A diminuição da produção de APOBEC3G em macrófagos tratados com NGF, também foi observada, inclusive quando tratado com interferon-γ. Em conjunto, nossos resultados sugerem que o NGF estimula a produção de HIV-1 em macrófagos. Esse efeito envolve o receptor TrKA e está associado com a regulação negativa de APOBEC3G. Nosso estudo evidencia uma nova forma de interação entre o HIV-1 e a célula hospedeira, trazendo bases para uma melhor compreensão sobre esta complexa relação.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**Nerve Growth Factor (NGF) effects on HIV-1 replication in human primary cells.**

### ABSTRACT

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Diego Queiroz Rodrigues**

The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), the etiological agent of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), represents one of the main pathogens of clinical interest of the last decades. During HIV-1 infection many CD4<sup>+</sup> cells die; while others, such as macrophages, survive and sustain HIV-1 replication for long periods, becoming viral reservoirs. Therefore, the recognition of factors that can maintain these reservoir cells alive and influence HIV-1 replication is one of the main tasks for the development of a more efficient therapeutic strategy. Since it has been shown that HIV-1 infection increases nerve growth factor (NGF) secretion, and that this molecule is crucial for macrophage survival, we further analyzed whether NGF could modulate HIV-1 replication in PBMCs and macrophages and the mechanisms underlying this phenomenon. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and macrophages infected *in vitro* by HIV-1 were treated with recombinant human NGF. Viral replication was measured by p24-ELISA in culture supernatants. Different pharmacological inhibitors were employed to analyze the possible signaling pathway involved in NGF-induced HIV-1 replication. Participation of APOBEC3G was evaluated in macrophages exposed to NGF, using RT-PCR and immunoblotting assays. Synchronized HIV-1 infections were also used to study whether NGF would influence HIV-1 binding/entry. HIV-1 integration and transcription were evaluated by PCR and real-time PCR, respectively. Our results demonstrated that NGF stimulated HIV-1 replication in macrophages, but not in PBMCs reaching as much as a 20-fold increase at 10 ng/mL. This neurotrophin did not affect viral adsorption and penetration, nor integration of proviral DNA. Therefore, NGF probably act trough the stimulation of viral transcription. The pathway triggered by NGF to stimulate HIV-1 transcription was dependent on the engagement of high affinity receptor TrKA, which led to a mobilization of intracellular calcium, derived from endoplasmatic reticulum, and to PKC signaling. Once triggered, PKC activated ERK1/2, p38kinase, and NF- $\kappa$ B. We also observed a decrease of APOBEC3G production in NGF-treated macrophages, even when they were stimulated with interferon- $\gamma$ . All together, our results suggest that NGF stimulates HIV-1 production in an important HIV-1 reservoir, such as macrophages. This effect involves TrKA engagement and is associated with APOBEC3G down-regulation. Our study evidences a new feature of HIV-1/cell host interaction, providing basis for a better comprehension of this complex interaction.

# 1. Introdução

## 1.1. A síndrome da imunodeficiência adquirida e o vírus da imunodeficiência Humana.

A infecção pelo vírus da imunodeficiência Humana (HIV), agente etiológico da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), é caracterizada por uma profunda imunossupressão associada a infecções oportunistas, tumores malignos e degeneração do sistema nervoso central (Dybul, 2003).

A AIDS foi identificada pela primeira vez no início da década de 80, acometendo majoritariamente homossexuais do sexo masculino e usuários de drogas injetáveis de cidades da América do Norte, como Nova York e São Francisco, e de alguns países europeus. Estes primeiros pacientes apresentavam enfermidades atípicas para indivíduos imunocompetentes, como Sarcoma de Kaposi e pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* (Fauci, 2003; Gottlieb *et al.*, 1981).

A identificação do agente etiológico da AIDS teve início a partir da análise da biópsia de linfonodo de um paciente com AIDS, a qual revelou a presença de atividade da enzima transcriptase reversa (RT) nos extratos celulares, evidenciando que o agente causador da doença poderia ser um retrovírus (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983). Na ocasião, os únicos retrovírus humanos conhecidos eram os Vírus T-Linfotrópicos Humanos tipos I e II (HTLV-I e HTLV-II). No entanto, experimentos de imunoprecipitação demonstraram que, embora houvesse semelhança entre as proteínas do provável agente causador da AIDS e dos vírus HTLV tipos I e II, observava-se um diferente padrão de bandas entre eles. Desta forma, o agente causador da síndrome foi inicialmente classificado como retrovírus, e referido pelos nomes de HTLV-III e/ou “Lymphadenopathy-Associated Virus” (LAV) (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Montagnier, 2002). Contudo, este vírus não parecia pertencer à mesma família de outros retrovírus previamente descritos, como por exemplo, a dos HTLVs. Isto porque tanto o HTLV-I quanto o II classicamente levam à imortalização de linfócitos (Miyoshi *et al.*, 1981), e o que se observava nos pacientes com AIDS era justamente o oposto, mais precisamente o declínio do número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Stahl *et al.*, 1982).

Diversos estudos então tiveram início com o intuito de entender melhor a natureza deste vírus recém-descoberto e buscar como classificá-lo de forma adequada.

(Gallo *et al.*, 1984; Sarngadharan *et al.*, 1984; Schupbach *et al.*, 1984). Porém, apenas na segunda metade da década de 80 o agente causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida foi enfim classificado, sendo inserido num subgrupo distinto dentro dos retrovírus, os *Lentivirus*, e denominado Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), considerado um dos mais importantes agentes infecciosos deste século (Coffin *et al.*, 1986).

Atualmente, dois tipos de HIV são identificados, o tipo 1 e o tipo 2 (HIV-1 e HIV-2), que são classificados em grupos e subtipos, de acordo com a sua diversidade genética. Análises filogenéticas de seqüências pró-virais do HIV-1 revelaram a existência de três grupos genéticos: o M (Bachis *et al.*), O (Outlier) e N (Non-M/Non-O) (Simon *et al.*, 2006). No grupo M, variantes do HIV-1 são classificadas como subtipos (A1, A2, A3, A4, B, C, D, F1, F2, G, H, J, e K) (Taylor *et al.*, 2008) de acordo com o seu grau de similaridade genética. No Brasil predomina o subtipo B, seguido pelos subtipos F e C e pelas formas recombinantes B/F e B/C (Bello *et al.*, 2007). O HIV-1 apresenta distribuição irrestrita no mundo, enquanto o HIV-2 é encontrado principalmente na África Oriental e em algumas regiões da Europa (Requejo, 2006).

Sabe-se que, apesar de parcialmente semelhantes do ponto de vista genético, o HIV-2 é menos patogênico do que o HIV-1, assim considerado tendo em vista que os pacientes apresentam imunossupressão menos grave, menor freqüência de infecções oportunistas, e sobrevida mais longa (Poulsen *et al.*, 1997; Rowland-Jones & Whittle, 2007). Além disso, estes pacientes apresentam carga viral mais baixa (MacNeil *et al.*, 2007) e por isso oferecem menor risco de transmissão sexual e vertical (Andreasson *et al.*, 1993; Kanki *et al.*, 1994).

Apesar de ter sido descoberto há pouco mais de duas décadas, o HIV é considerado como um dos mais importantes agentes infecciosos do séculos XX e XXI, os números que elevam essa patologia ao *status* de pandemia são assustadores. Estima-se que cerca de 25 milhões de pessoas já tenham morrido em decorrência da AIDS, que entre 30 e 36 milhões de pessoas estejam infectados pelo vírus (Figura 1), e que, apesar de esforços integrados da comunidade científica e de órgãos de saúde pública, ocorrem ainda cerca 2,7 milhões de novas infecções por ano (UNAIDS, 2008) (Figura 2)

## Número estimado de pessoas infectadas com HIV no mundo, 1990-2007

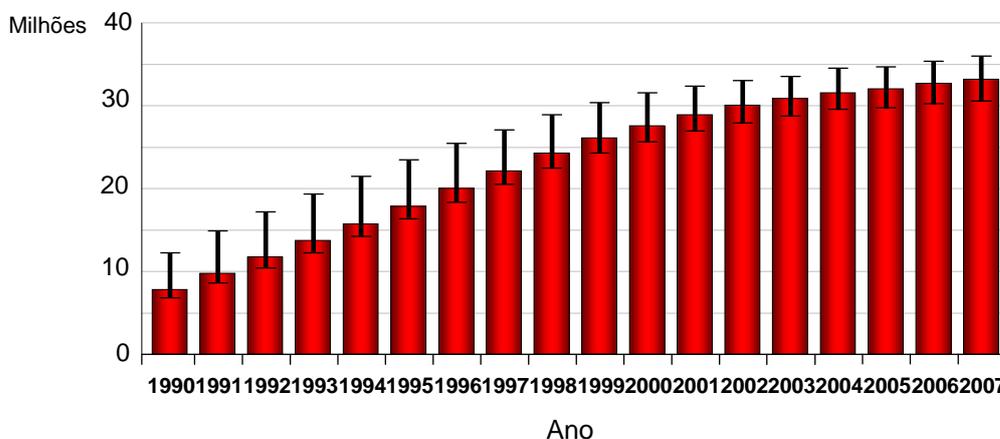


Figura 1 - Número estimado de pessoas infectadas pelo HIV, demonstrando o caráter pandêmico da AIDS no mundo (Adaptado de UNAIDS, 2008).

## Estimativa de novas infecções por HIV no mundo em 2007

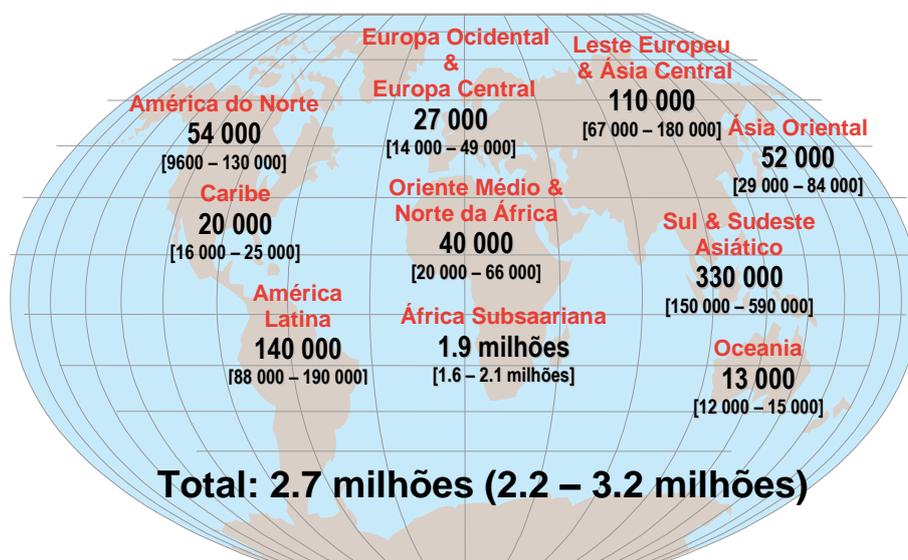


Figura 2 – Número estimado de novas infecções por HIV em 2007 no mundo, demonstrando que apesar dos esforços milhões de indivíduos ainda são infectados anualmente (Adaptado de UNAIDS, 2008).

## 1.2 Morfologia, genoma viral e ciclo replicativo

O HIV é um vírus envelopado contendo em seu genoma duas cópias RNA em fita única, não segmentado. Análises por microscopia eletrônica da partícula viral revelaram que o vírion apresenta um diâmetro entre 106nm e 186nm (Briggs *et al.*, 2006). Externamente, ele é formado por uma bicamada lipídica derivada da membrana plasmática da célula hospedeira (Dybul M, 2003), onde estão inseridas as glicoproteínas do envelope, organizadas em trímeros (Welman *et al.*, 2007). Cada um dos monômeros glicoprotéicos é formado por glicoproteínas transmembranares de 41 kDa (gp41) e glicoproteínas de 120kDa (gp120), ancoradas à gp41 (Weiss *et al.*, 1990) (Figura 3).

Na camada seguinte do envelope externo encontra-se uma matriz proteica formada pela proteína p17. O core cônico protegido pela matriz proteica, é composto pela proteína do capsídeo (p24) onde está albergado o genoma do HIV, associado a proteínas do nucleocapsídeo (p7), e às enzimas transcriptase reversa (TR), integrase (IN) e protease (PR) (Fields *et al.*, 2001) (Figura 3).

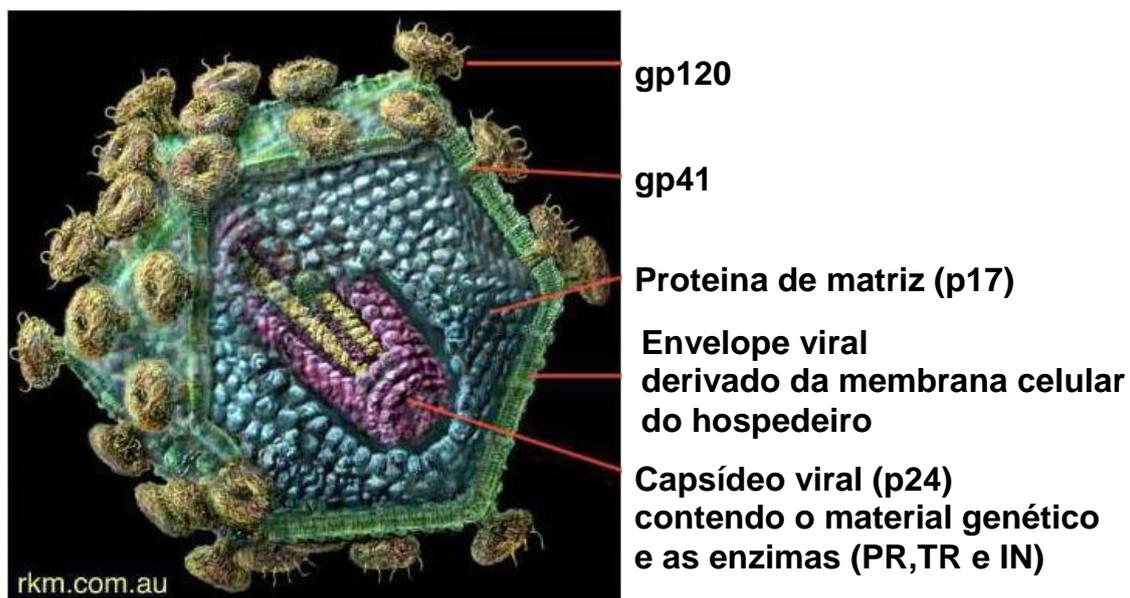


Figura 3 – Estrutura esquemática do vírus HIV, destacando a disposição dos seus principais componentes. (Adaptado de Russel Kightley Media)

O HIV apresenta uma estrutura genômica complexa e capacidade para expressão gênica diferencial. O RNA genômico tem 9.7 Kb, contendo nos flancos seqüências

LTR (*Long Terminal Repeats*) que contêm importantes elementos regulatórios para a transcrição viral, inclusive o promotor viral, na LTR-5' (Frankel & Young, 1998). Além dos genes comuns a todos os retrovírus - *gag*, *pol* e *env*, - o HIV contém mais dois produtos gênicos de função regulatória; *tat* e *rev*, e mais quatro com função acessória; *nef*, *vpu*, *vpr* e *vif* (Figura 4).

A partir do gene *gag* é produzido um RNA mensageiro policistrônico e, conseqüentemente, um precursor protéico que é clivado durante o processo de maturação do vírus, dando origem à proteína p24 fosforilada, a p17 meristilada, e a p9, rica em aminoácidos prolina. Já o produto do gene *pol* é clivado originando a protease, a transcriptase reversa (heterodímero p66/p51), e a integrase. E o gene *env* codifica a proteína precursora gp160 que, quando clivada pela protease viral, origina as glicoproteínas gp 120 e gp 41 (Arts & Wainberg, 1996)(Figura 4).

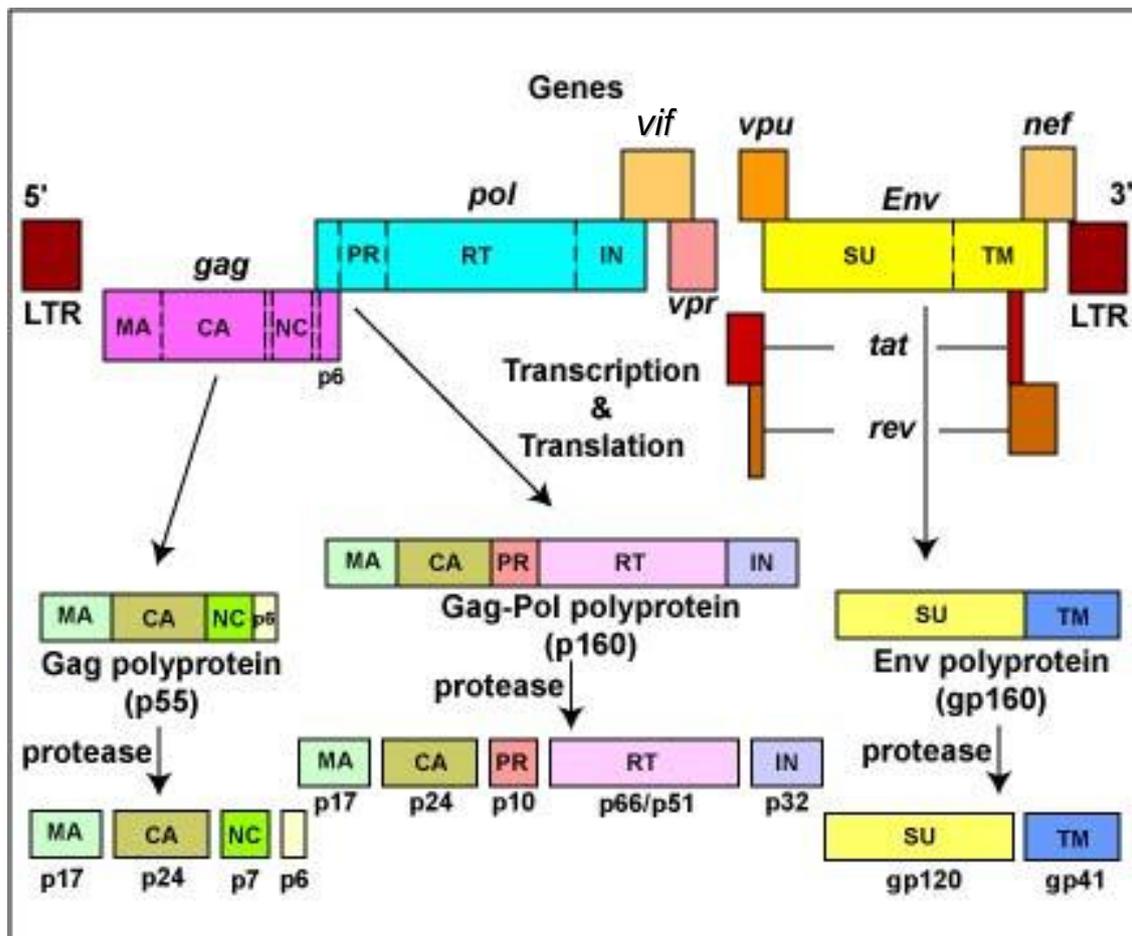


Figura 4 – Organização gênica e esquema de clivagem do HIV-1 (Adaptado de “Dr. Kaiser’s Microbiology Web Site” student.ccbcmd.edu).

O ciclo de replicação viral inicia-se com a ligação da proteína gp120 à proteína de superfície celular CD4 (Figura 5). Essa ligação induz mudanças conformacionais na proteína gp120, levando à exposição de sítios que se ligam aos receptores de quimiocinas CCR5 ou CXCR4 (Turner & Summers, 1999). Após a ligação da gp120 com CD4 e o respectivo co-receptor, ocorrem modificações conformacionais nas glicoproteínas virais que permitem a exposição de resíduos hidrofóbicos da gp41, os quais medeiam a fusão entre o envelope viral e a membrana celular. A fusão é vital para o processo infeccioso, pois ela é seguida pela introdução do core viral no citosol da célula alvo (Hottiger & Hubscher, 1996) (Figura 5). Após essa etapa ocorre o desnudamento viral, isto é a liberação do material genético e das enzimas essenciais para a replicação do vírus, o que é seguido pela transcrição reversa do RNA viral (Hottiger & Hubscher, 1996).

A transcrição reversa é uma das características que definem os retrovírus. Em resumo, é a capacidade de converter os genomas de RNA em DNA dupla-fita, conversão essa catalisada pela enzima transcriptase reversa logo após a infecção (Coffin *et al.*, 1997). A transcrição do RNA viral se inicia pela ligação de um *primer* de tRNA<sup>Lys</sup> complementar a um sítio próximo à extremidade 5' do RNA viral, que serve de molde. A partir deste *primer* a transcriptase reversa sintetiza um segmento de DNA, complementar ao RNA, que é translocado para o término 3' da molécula, para completar a síntese da fita de DNA. Uma subsequente atividade RNase H, desta mesma enzima, é necessária para degradar o RNA do híbrido DNA-RNA. Por fim, esta enzima ainda apresenta uma atividade DNA polimerase-DNA dependente que é responsável pela síntese da fita de DNA complementar. A transcrição reversa muito comumente introduz erros no genoma viral a cada ciclo de replicação, resultando em uma progênie viral geneticamente variada (Hottiger & Hubscher, 1996).

A enzima integrase promove a integração do DNA dupla fita linear viral no cromossoma da célula hospedeira (Coffin *et al.*, 1997). O DNA integrado, chamado de provírus, se comporta essencialmente como um gene celular. Após a integração, o provírus serve como molde para a síntese de RNAs mensageiros (RNAm) virais, que codificam as proteínas estruturais, regulatórias e acessórias usadas na replicação viral. Essa síntese ocorre pela ação da RNA polimerase II celular auxiliada por fatores de transcrição celulares e pela proteína viral Tat (Greene & Peterlin, 2002) (Figura 5).

Os primeiros RNAs formados sofrem processamento completo e originam as proteínas Tat, Rev e Nef. Em seguida são formados RNAs parcialmente processados ou não-processados e, com o auxílio de Rev, são transportados para o citoplasma (Hope, 1997). Os RNAs para env são traduzidos no retículo endoplasmático e os produtos gerados pela tradução de *gag* e *gag-pol* se associam às novas fitas de RNA do vírus e às proteínas do envelope (Frankel & Young, 1998).

As novas partículas virais produzidas nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> são, então, liberadas por brotamento e tornam-se infectivas após a clivagem das poliproteínas *gag* e *gag-pol* pela protease viral (Frankel & Young, 1998). (Figura 5)

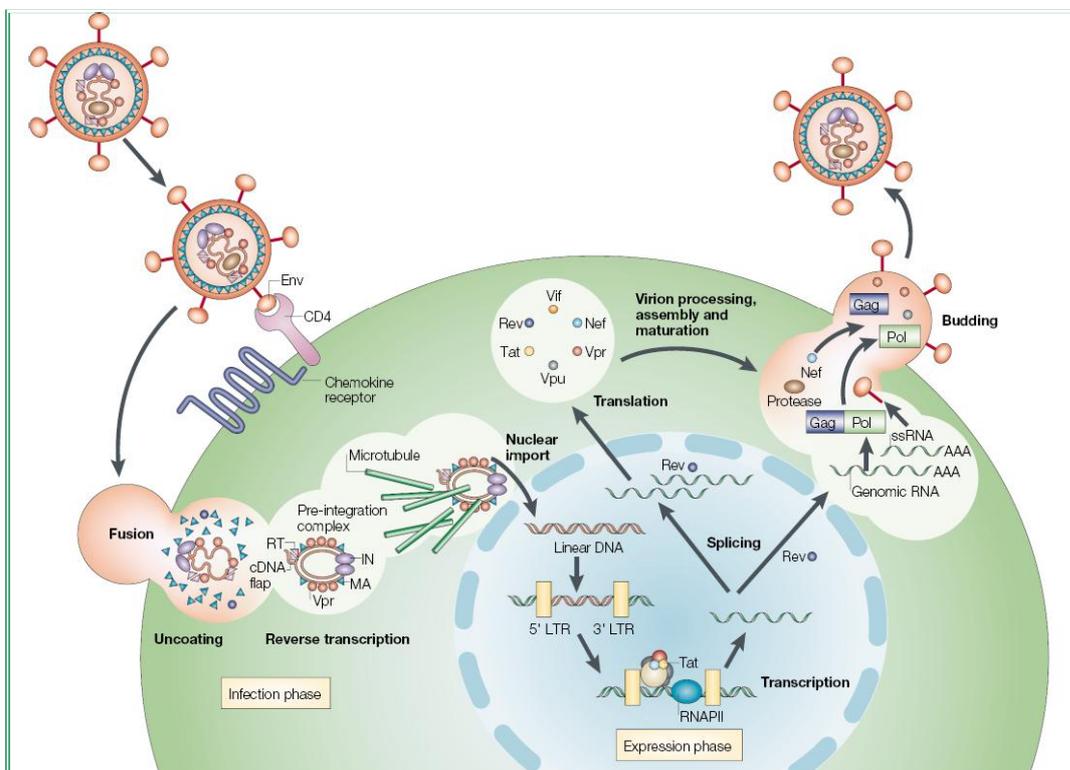


Figura 5 – O ciclo replicativo do HIV-1 (Peterlin & Trono, 2003).

### 1.3 Imunopatogênese da infecção

Desde os primeiros casos da epidemia de AIDS, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> foram identificados como sendo as principais células-alvo para a infecção pelo HIV-1 (Dalglish *et al.*, 1984; Klatzmann *et al.*, 1984). Porém, com o fato de alguns isolados virais apresentarem tropismo diferenciado para tipos celulares que expressam a molécula CD4<sup>+</sup>, como macrófagos e linfócitos T CD4<sup>+</sup>, ficou claro que

a molécula CD4 não era o único receptor requerido para a entrada na célula-alvo (Dean *et al.*, 1996).

Apenas em 1995, ou seja, mais de uma década após a descoberta do HIV, um estudo mostrando que as beta-quimiocinas Rantes, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  impediam a entrada do HIV em células humanas formulou as bases para a identificação dos outros co-receptores envolvidos com o processo de fusão e entrada do vírus nas células alvo (Cocchi *et al.*, 1995). Em 1996, vários grupos demonstraram que o CXCR4 e o CCR5 eram os co-receptores do HIV-1 (Deng *et al.*, 1996; Dragic *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996), acabando com a dúvida sobre as razões pelas quais certas cepas virais tinham tropismo por determinado tipo celular e construindo o conceito de vírus R5-trópicos, X4-trópicos ou, em alguns casos, duplo-trópicos.

Como dito anteriormente desde a identificação dos primeiros casos clínicos de AIDS, em 1981, demonstrou-se que a queda no número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> é uma característica marcante da progressão clínica da enfermidade. Diversos estudos têm sido realizados com o intuito de elucidar como o HIV-1 induz a destruição maciça de células T CD4<sup>+</sup> e, conseqüentemente, leva ao estado clínico da grave imunossupressão característica desta síndrome (Appay & Sauce, 2008).

As principais linhas de raciocínio aceitas hoje em dia pra explicar o fenômeno de destruição da população de T CD4<sup>+</sup> apontam para os efeitos citolíticos diretos mediados pelo vírus, ou mecanismos indiretos, como auto-imunidade, apoptose, ativação crônica do sistema imune, atividade de células T citotóxicas específicas anti HIV-1 (CTL). (Dybul M, 2003; Picker, 2006). De fato, embora haja evidências de um papel direto da replicação e citopatogenicidade do HIV-1 na depleção de linfócitos, também não são raros os trabalhos que sugerem danos causados pelo HIV-1 às células que não estão infectadas. Por exemplo, células T CD4<sup>+</sup> não infectadas e T CD8<sup>+</sup> de indivíduos HIV-positivos entram em apoptose tanto *in vitro* como nos linfonodos (Finkel *et al.*, 1995; Meyaard *et al.*, 1992). Um dos mecanismos de indução de apoptose em células não-infectadas é o de regulação positiva da expressão do ligante de Fas (FasL) em células infectadas; moléculas FasL interagem com o receptor Fas de células vizinhas, disparando o processo de apoptose. Neste contexto, a proteína viral nef parecer ter um papel fundamental, uma vez que promove a indução de FasL nas células infectadas, enquanto protege estas últimas da morte, inibindo a expressão de proteínas apoptóticas, como ASK1 (Geleziunas *et al.*, 2001). No entanto, a depleção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> parece não ser o único fator responsável pela progressão para a síndrome da imunodeficiência

adquirida, tendo em vista que macacos que são infectados pelo *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV) também apresentam importante depleção sem apresentar quadro clínico semelhante à AIDS (Pandrea *et al.*, 2006).

Alguns autores defendem que a ativação crônica e generalizada do sistema imune possa ser o fator principal causador da aceleração e progresso até o quadro clínico de AIDS (Picker, 2006). Em humanos e primatas não-humanos, a depleção das células T CD4<sup>+</sup> é acompanhada por um estado de ativação imune generalizada, manifestada na fase crônica da infecção. Os sinais dessa ativação generalizada são a maior frequência de células T que expressam marcadores de ativação (como por exemplo CD38, HLA-DR), a elevada produção de citocinas pró-inflamatórias e o aumento da reciclagem de células B, T, NK e monócitos (Hasegawa *et al.*, 2009; Picker, 2006). Essa ativação não ocorre apenas em células específicas contra o HIV, ou contra o SIV, e sim em diversas células com as mais diferentes especificidades. Diversas teorias buscam explicar de que forma a infecção pelo HIV gera tal ativação. Vários autores sugerem que essa ativação generalizada se dê por uma recorrente estimulação antigênica associada à resposta inflamatória (Picker, 2006). Alguns grupos atribuem que tal estimulação antigênica poderia acontecer via ativação celular pela ligação das fitas simples de RNA viral produzidas pelas células infectadas aos Toll like-receptors (TLR) 7/8 (Meier *et al.*, 2007). Entretanto, talvez a teoria mais aceita e discutida hoje em dia, defende a idéia de que esta ativação do sistema imune se deva ao fenômeno da translocação microbiana, isto é, a entrada de produtos microbianos na circulação sanguínea (Brenchley *et al.*, 2006). Em resumo, produtos microbianos derivados do trato gastrointestinal atingiriam a circulação em consequência da aumentada permeabilidade intestinal, a qual é secundária a severa redução do número de células T CD4<sup>+</sup> no tecido linfóide associado ao intestino (GALT) (Figura 6). Essa ativação crônica leva a uma regeneração insuficiente de células T de memória central, destruição da arquitetura dos linfonodos devido à inflamação crônica, além de perda de células T “naive” pela excessiva diferenciação em células de memória (Brenchley *et al.*, 2006). Contudo, o papel desses fatores na história natural da AIDS, individualmente ou em combinação, ainda não estão completamente elucidados.

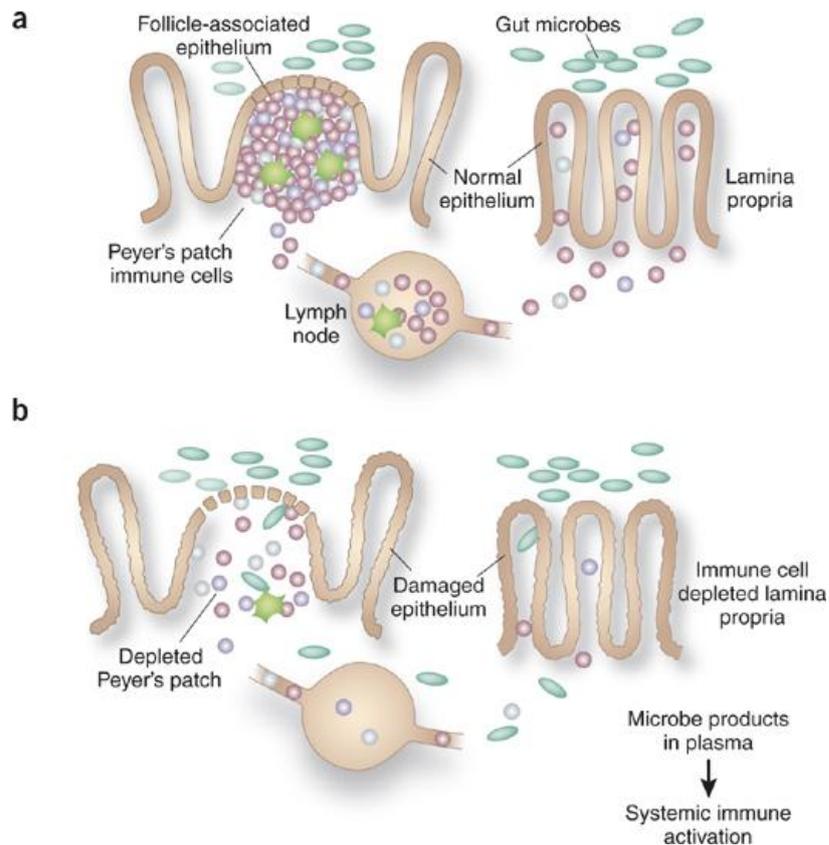


Figura 6 – Modelo de ativação do sistema imune. Modelo propõe a depleção das células imune das placas de Peyer (células do GALT) como principal razão da ativação do sistema imune observada em pacientes HIV-1 positivos. A) Indivíduo sadio, com arquitetura das placas de Peyer íntegra. Como consequência não ocorre passagem de produtos microbianos derivados da luz intestinal. B) Indivíduo HIV<sup>+</sup>, com arquitetura das placas de Peyer comprometida, permitindo a passagem de produtos microbianos derivados da luz intestinal e conseqüente ativação do sistema imune (Brenchley *et al.*, 2006).

Trabalhos recentes em modelos animais vêm mostrando que, ao contrário do que se pensava até recentemente a chave para o entendimento dos eventos que desencadeiam a imunossupressão característica da AIDS pode estar nas primeiras semanas que se seguem à infecção (Picker & Watkins, 2005). Nas primeiras horas e dias após a infecção, a replicação viral atinge níveis muito altos, favorecendo o aparecimento de diversos vírions mutantes decorrentes dos erros próprios da transcriptase reversa. Além disso, nessa fase os vírus e células infectadas pelo HIV-1 atravessam a barreira da mucosa intestinal e infectam a células-alvo residentes da lâmina própria, o que acarreta duas conseqüências diretas graves, uma a redução

maciça do número de células T CD4<sup>+</sup>, incluindo as de memória, e a outra o estabelecimento de reservatórios virais (Haase, 2005).

É justamente no contexto dos reservatórios virais que as células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas, receberam importância para o entendimento da progressão clínica para a AIDS. Estas células tem sido apontadas como os principais reservatórios para o HIV-1, sendo fundamentais para o entendimento dos mecanismos de persistência do vírus no organismo (Brown *et al.*, 2006).

Diferentemente do que ocorre em linfócitos T CD4<sup>+</sup> os vírus com tropismo por macrófagos, com raras exceções, são R5-trópicos (Dean *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996). Outra diferença entre macrófagos e células T CD4<sup>+</sup> referentes ao curso da infecção pelo HIV-1 é que grande parte da maturação de vírus nos macrófagos acontece nas membranas de vesículas citoplasmáticas que, quando se fundem com a membrana plasmática, liberam os vírions produzidos (Orenstein *et al.*, 1988; Raposo *et al.*, 2002). Como resultado disso, a maioria das proteínas virais se localiza na membrana destas vesículas citoplasmáticas, e não na membrana plasmática, tornando assim os macrófagos infectados menos visíveis para células citotóxicas (Stevenson, 2003). Dessa forma, macrófagos infectados por HIV-1 apresentam uma meia-vida relativamente elevada, sendo capazes de liberar partículas virais e mantendo-se livre dos efeitos citopáticos mediados pelo vírus ou pela resposta imune anti-HIV-1, reunindo, assim características críticas para serem considerados reservatórios virais privilegiados (Brown *et al.*, 2006).

Diversos estudos mostram ainda que embora o número de células T infectadas pelo HIV-1 exceda em muito, o número de macrófagos infectados, esta desproporção não reflete a real contribuição de macrófagos infectados para a perenização da carga viral circulante (Embretson *et al.*, 1993). Em macacos rhesus, por exemplo, a infecção pelo SIV leva a uma depleção completa de células T CD4<sup>+</sup>, mas após essa depleção a viremia é mantida por macrófagos tissulares (Igarashi *et al.*, 2001).

As células dendríticas, apesar de serem consideradas como os reservatórios virais menos caracterizados, desempenham também importante papel no estabelecimento e na disseminação da infecção pelo HIV-1. Elas são susceptíveis à infecção direta pelo HIV-1, e também são responsáveis pela transmissão de vírions através do fenômeno da “sinapse virológica” para células T CD4<sup>+</sup> em tecidos linfóides diversos

(van Kooyk & Geijtenbeek, 2003), promovendo ainda um aumento da replicação viral pela liberação de fatores solúveis (Groot *et al.*, 2006).

#### 1.4 Fatores que modulam a replicação viral

Como todos os retrovirus o HIV-1 se integra ao genoma da célula hospedeira, consequentemente, a eficácia da produção de novas partículas virais é influenciada pelo estado metabólico e de ativação da célula (Stevenson, 2003). Desta forma fatores endógenos e exógenos, que ativam linfócitos T CD4<sup>+</sup> e monócitos/macrófagos têm papel fundamental na replicação viral e, portanto, no progresso da infecção.

Diversos relatos na literatura sugerem que a infecção pelo HIV é um potente estimulador da produção de citocinas, em modelos *in vivo* bem como *in vitro* (Chehimi *et al.*, 1994; Chehimi *et al.*, 1996; Clerici *et al.*, 1996; Cohen, 2003). No entanto, apesar de alguns autores demonstrarem que células infectadas pelo HIV-1 têm uma regulação positiva na produção do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Stevenson, 2003), a forma como isto ocorre ainda não está completamente esclarecida, este fato merece destaque, uma vez que mostra a formação de uma alça de retro-alimentação favorável à disseminação do vírus no organismo. Isto porque, o TNF- $\alpha$  bem como IL-1 $\beta$ , cujos os níveis também estão aumentados *in vitro*, estimulam fortemente a replicação viral por induzir a ligação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B ao gene promotor da replicação do HIV, o LTR (Swingler *et al.*, 1994). Outras citocinas, como IL-6, GM-CSF e IFN- $\gamma$  também são descritas como capazes de modular positivamente a replicação do HIV-1, mas diferentemente, do TNF- $\alpha$  e IL1 $\beta$ , estimulam eventos pós-transcricionais (Stevenson, 2003).

Entretanto existem citocinas que diminuem a replicação viral, seja através da inibição da transcrição, como IL-16, seja inibindo a transcrição reversa e expressão de genes do provirus, como IFN- $\alpha$ , ou mesmo por vias ainda não totalmente elucidadas, como IL-4, IL-13 e IL-27 (Alfano & Poli, 2005; Creery *et al.*, 2006; DeVico & Gallo, 2004; Fakruddin *et al.*, 2007; Fauci, 2003).

De uma forma geral os estudos que buscam relacionar citocinas com o HIV-1 mostram que as pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) tendem a favorecer a replicação viral, enquanto as do tipo 2 (IL-4, IL-10, IL-13) desempenham papel contrário (Bahbouhi *et al.*, 2004; Cassol *et al.*, 2009).

Outra forma recentemente descrita de modulação da replicação do HIV-1 mediada por citocinas é através da capacidade destas em regular fatores celulares intrínsecos que restringem a replicação do HIV-1. Destes fatores, os mais estudados são as enzimas citidina-deaminases que integram a família de proteínas APOBEC e que são fortemente induzidas por IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Desta família de proteínas, as que se destacam por conferirem maior restrição à infecção pelo HIV são o APOBEC3G, APOBEC3A e APOBEC3F (Peng *et al.*, 2007). Estas proteínas podem se incorporar à partícula viral ainda em formação antes de sua saída da célula. Tais proteínas induzem um grande número de mutações hiper-somáticas no DNA pró-viral durante o processo de transcrição reversa, através da desaminação da desoxi-citosina, com conseqüente formação da desoxi-uracila. Este acúmulo de mutações gera então vírions não-infectivos, impedindo com isso novos ciclos de infecção (Chiu *et al.*, 2005; Soros & Greene, 2007) (Figura 7). A proteína viral Vif possibilita ao HIV-1 o escape deste mecanismo celular, marcando a APOBEC3A, 3F e 3G para a degradação nos proteossomas via ubiquitinação (Marin *et al.*, 2003; Sheehy *et al.*, 2003) (Figura 6). Alguns autores sugerem que é justamente pela alta expressão de APOBEC3A e 3G que algumas células como T CD4<sup>+</sup> quiescentes e monócitos são refratárias a infecção pelo HIV-1 (Chiu *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2007).

Outro fator intrínseco de restrição à replicação do HIV-1 descrito recentemente é o CD317. Esta proteína de membrana, induzida por IFN- $\alpha$ , foi vista como sendo capaz de reter na membrana da célula os novos vírions produzidos e em brotamento, impedindo com isso sua liberação. Este efeito também é contraposto por uma proteína viral, neste caso a Vpu (Neil *et al.*, 2008), mas sua atividade neutralizadora sobre o CD317 não está esclarecido.

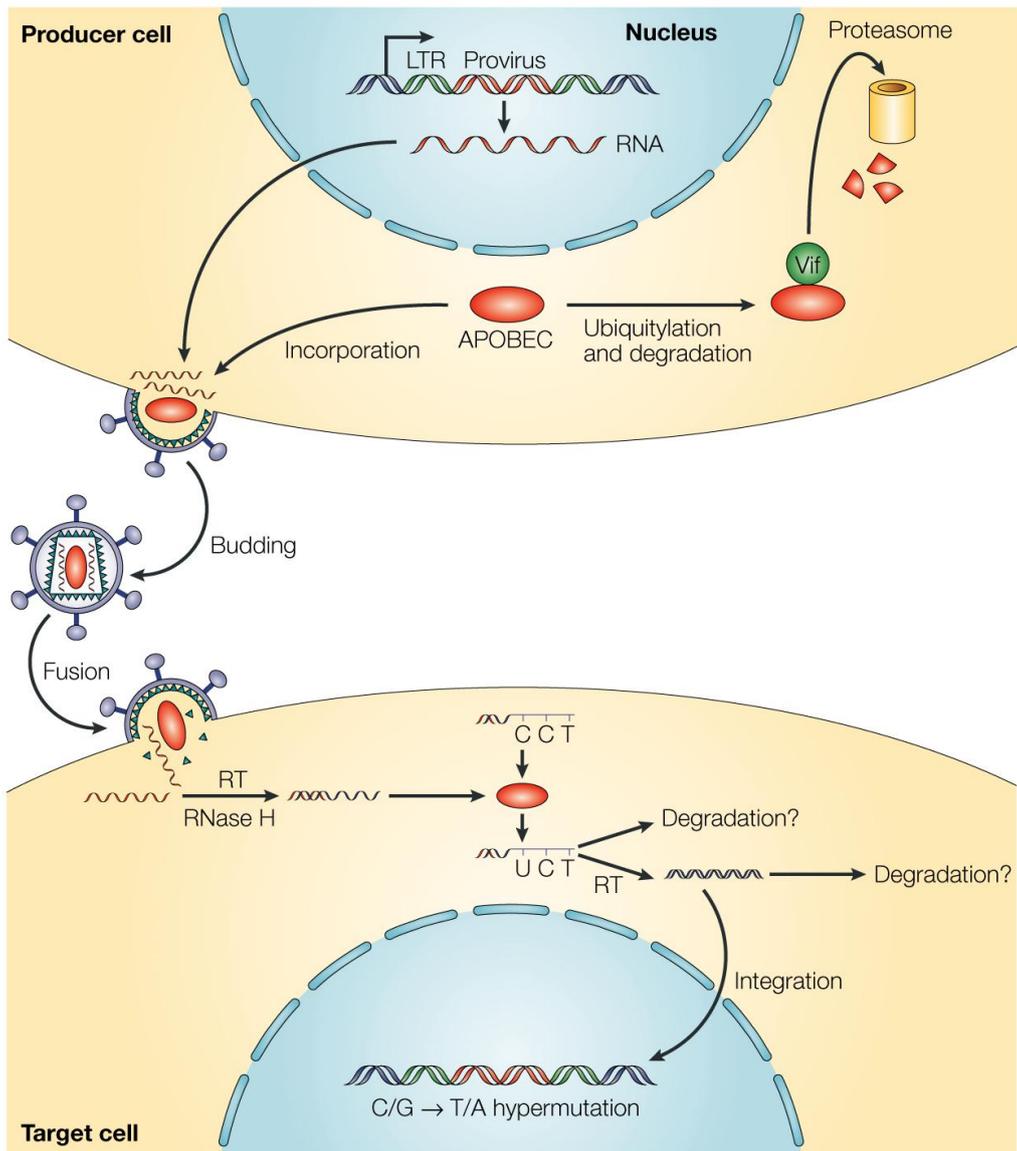


Figura 7 – Ação da proteína APOBEC3G. Modelo de ação da proteína APOBEC3G na replicação do HIV-1 (Harris & Liddament, 2004).

## 1.5 O Fator de Crescimento do Nervo

Fatores neurotróficos são moléculas fundamentais no desenvolvimento do sistema nervoso. O primeiro fator neurotrófico descoberto foi o fator de crescimento do nervo (NGF) através dos trabalhos pioneiros de Levi-Montalcini, Hamburger e Cohen no início da década de 50 (Cohen *et al.*, 1954; Levi-Montalcini & Hamburger, 1951). Hoje, sabemos que existe em mamíferos uma família de neurotrofinas composta pelo fator de crescimento do nervo, pelo fator de crescimento derivado do cérebro (*Brain-derived neurotrophic factor* - BDNF), pela neurotrofina 3 (NT-3) e pelas neurotrofinas 4 e 5 (NT-4/5) (Davies, 1994; Thoenen, 1991). Estas moléculas desempenham um importante papel no estabelecimento da população neuronal durante um período do desenvolvimento denominado de morte celular natural (Levi-Montalcini, 1987). De uma maneira global, as neurotrofinas são produzidas por neurônios e após sua liberação, mantêm os contatos axonais entre os neurônios alvo da sua atuação para a formação de sinapses. Através de mecanismos não totalmente conhecidos, estas moléculas permitem a sobrevivência dos neurônios que conseguem captar estes fatores (Levi-Montalcini, 1987).

O NGF é sintetizado numa forma precursora com 305 aminoácidos que é, então, clivada dando origem à forma básica madura de 118 aminoácidos. Esta exerce suas funções biológicas sob a forma de um dímero básico de subunidades de aproximadamente 13 KD (Covaceuszach *et al.*, 2004). A existência de RNAm para o NGF, bem como a presença de receptores para essa molécula em células de animais adultos, sugere que esta neurotrofina continua funcional ao longo de toda a vida do animal (Bjerre *et al.*, 1975).

Os mecanismos de sinalização celular das neurotrofinas compreendem a ativação de duas classes distintas de receptores: o receptor de baixa afinidade e os receptores de alta afinidade. Ao receptor de baixa afinidade, denominado p75, se ligam todas as neurotrofinas, e seus efeitos na sinalização neurotrófica são controversos em relação ao seu papel na sobrevivência neuronal (Miller & Kaplan, 1998). Os receptores de alta afinidade pertencem à família dos receptores tirosina-quinases (Trk) e são eles o TrkA, TrkB e o TrkC. A interação entre as neurotrofinas e estes receptores se dá da seguinte maneira: NGF ativa TrkA, BDNF e NT4/5 ativam TrkB e NT-3 ativa TrkC. No entanto, em situações singulares, a NT-3 é capaz de ativar os receptores TrkA e TrkB (Barbacid, 1993; Davies, 1994), como ilustrado na figura 8.

## Receptor de baixa afinidade

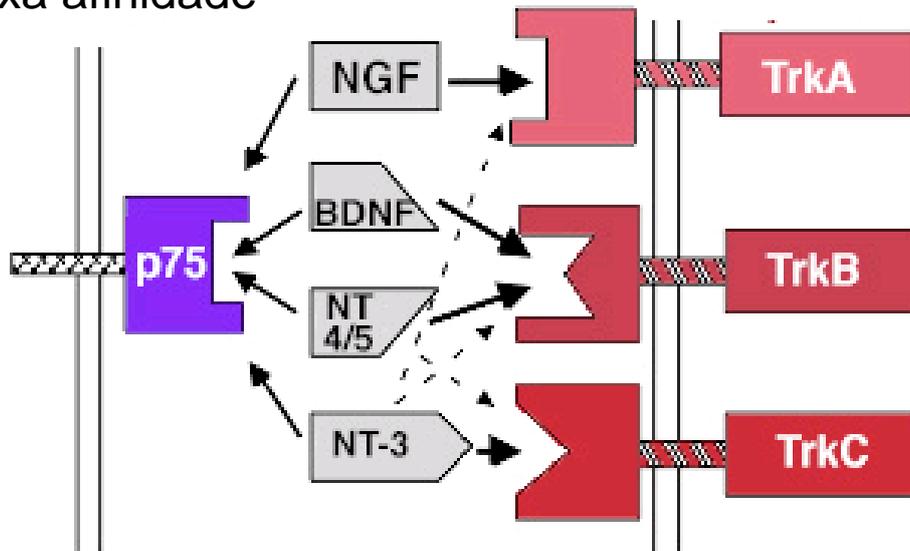


Figura 8 – Neurotrofinas e seus receptores. Esquema mostrando afinidade das neurotrofinas da família do NGF pelos seus receptores de baixa e alta afinidade. (Adaptado de visiscience.com)

Estudos vêm demonstrando que os efeitos biológicos do NGF não estão restritos apenas ao sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP). Muitos trabalhos mostram que esta neurotrofina desempenha papel relevante também em células do sistema imune e endócrino, reforçando a hipótese de que o NGF atue como uma molécula crítica na manutenção da homeostase do eixo neuro-imune-endócrino (Levi-Montalcini *et al.*, 1995).

Com relação ao sistema imune, o NGF já foi caracterizado como capaz de promover o crescimento e a maturação de precursores mielóides (Matsuda *et al.*, 1988), induzir a proliferação de linfócitos B e T, e a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos (Brodie & Gelfand, 1992; Otten *et al.*, 1989; Thorpe *et al.*, 1987), estimular produção de IgG4 (Kimata *et al.*, 1991), IgM e IgA (Otten *et al.*, 1989), modular a formação de mediadores lipídicos por basófilos maduros (Bischoff & Dahinden, 1992), aumentar a permeabilidade vascular, o efeito quimiotático para neutrófilos humanos, o acúmulo tecidual e degranulação de mastócitos e a indução do potencial citotóxico e diferenciação de monócitos (Otten *et al.*, 1994).

Em situações de estresse, a liberação de NGF induz a elevação dos níveis séricos de corticosteróides (Otten *et al.*, 1979), enquanto que, mediante estímulos inflamatórios ocorre aumento da produção de NGF induzida por de IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  (Hattori *et al.*, 1993; Lindholm *et al.*, 1987; Steiner *et al.*, 1991; Weskamp & Otten, 1987).

Em relação ao tema do nosso estudo, são poucos os trabalhos disponíveis na literatura relacionando o NGF com HIV/AIDS. Em 1994, Ensoli e colaboradores mostraram que o NGF é capaz de induzir a replicação do HIV-1 em células da glia (Ensoli *et al.*, 1994), sugerindo que o NGF possa ter papel importante nos efeitos deletérios da infecção pelo HIV-1 no SNC. Ainda na linha de patogênese das lesões nervosas secundárias à infecção pelo HIV-1, outros trabalhos mostram que a proteína viral Tat interfere com a sinalização intracelular induzida pelo NGF em neurônios, inibindo a fosforilação de proteínas cruciais para sobrevivência de células neuronais. Este efeito pode, contribuir para o desenvolvimento do quadro de demência em pacientes HIV-positivos (Bergonzini *et al.*, 2004; Darbinian-Sarkissian *et al.*, 2006; Darbinian *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2005). Outro produto viral capaz de gerar perda de células do sistema nervoso é a gp120, isto porque esta glicoproteína quando internalizada induz a morte de células cerebelares, efeito este revertido pela neurotrofina BDNF (Bachis *et al.*, 2003).

Garaci e colaboradores (1999), mostraram que a concentração de NGF em culturas de macrófagos infectados *in vitro* com HIV-1 é maior do que em culturas com células não infectadas, e ainda que o NGF parece ser crucial para sobrevivência desses macrófagos infectados, bem como para a replicação do HIV-1 nestes. Estes achados sugeriram pela primeira vez um papel do NGF diretamente sobre células do sistema imune no contexto da infecção pelo HIV-1. Porém, em contradição a eles, Titanji e colaboradores (2003) relatam que em pacientes HIV-positivos há uma queda da concentração de NGF circulante (Titanji *et al.*, 2003). Independente desta dicotomia, os achados de Garaci *et al.* trazem a tona a idéia de que o NGF pode estar diretamente envolvido com questões críticas para a modulação da carga viral em pacientes infectados com HIV-1, como por exemplo, a manutenção de reservatórios virais viáveis e os fatores que estimulam a replicação nestes.

## 1.6 Hipótese

Além do papel sobre o sistema nervoso central, o NGF também está envolvido na regulação do sistema imunológico (Bonini *et al.*, 2003). Em células periféricas, a secreção de NGF pode ser induzida por mediadores inflamatórios, como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  (Hattori *et al.*, 1993; Lindholm *et al.*, 1987; Steiner *et al.*, 1991; Weskamp & Otten, 1987), e a sua produção pode repercutir sobre a atividade de macrófagos e linfócitos. Em macrófagos o NGF participa na diferenciação celular, produção de citocinas, fagocitose e ativação de vias envolvidas com a destruição de patógenos intracelulares, etc (Torcia *et al.*, 1996). Em células T CD4<sup>+</sup> o NGF promove a síntese e liberação autócrina de mais NGF, resultando num aumento da sobrevivência linfocitária (Ehrhard *et al.*, 1993a). Partindo do princípio de que macrófagos e células T CD4<sup>+</sup> são células-alvo da infecção pelo HIV-1, que a replicação deste vírus pode ser aumentada por citocinas pro-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , e que a imuno-neutralização do NGF em cultura de macrófagos infectados pelo HIV-1 diminui a replicação viral (Garaci *et al.*, 1999), decidimos investigar o envolvimento do NGF no aumento da replicação do HIV-1 em macrófagos e PBMCs. A nossa hipótese, portanto, é que o NGF estimularia a replicação viral em macrófagos e linfócitos primários humanos infectados *in vitro* pelo HIV-1.

## **2. Objetivos**

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar se o fator de crescimento do nervo (NGF) aumenta a replicação viral em células primárias humanas infectadas *in vitro* pelo HIV-1, e os mecanismos envolvidos neste processo.

### **2.1 Objetivos específicos**

- Analisar se a adição de NGF em culturas de macrófagos e PBMCs infectados pelo HIV-1 aumenta a replicação viral.
- Verificar se o efeito do NGF sobre a replicação do HIV-1 é decorrente de eventos pré- ou pós-integração viral.
- Verificar quais vias de sinalização intracelular estão envolvidas com o aumento da replicação do HIV-1 induzido por NGF.
- Investigar se o NGF modula a expressão celular de APOBEC3G, fator endógeno de restrição à replicação do HIV-1.

### 3. Material e Métodos

**3.1 NGF e isolados virais e outros reagentes.** A neurotrofina NGF recombinante humana foi adquirida da empresa Peprotech (Rocky Hill, NJ, EUA). Os isolados virais de HIV-1 trópicos para CCR5, ADA e Ba-L foram cedidos pelo *NIH AIDS Research and Reference Reagent Program* (NIH, Bethesda, EUA), e usados tanto para infecções em PBMCs quanto em macrófagos. Este isolado viral foi expandido em culturas de PBMCs, como descrito abaixo, para obtenção de estoque suficiente para a execução do estudo. Reagentes diversos (citocinas recombinantes, anticorpos monoclonais, isotipos, inibidores de sinalização celular, “primers”, etc) e kits de ELISA foram adquiridos de fornecedores comerciais.

**3.2 Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs).** PBMCs foram purificados por centrifugação em gradiente de densidade (Histopaque, Sigma) a partir de “buffy coats” de indivíduos soronegativos para o HIV-1 (doados pelo Banco de Sangue do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ, Rio de Janeiro). Os PBMCs foram, então, estimulados por fitohemaglutinina (2 µg/mL; PHA, Sigma) durante dois a três dias, em RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino (Hyclone), e mantidos em meio de cultura suplementado com 5 u/ml de Interleucina-2 recombinante (IL-2r, Sigma) para os ensaios de infecção viral.

**3.3 Macrófagos Primários.** Macrófagos derivados de monócitos foram obtidos de PBMCs por aderência em plástico (Cirne-Santos *et al.*, 2006). Tais PBMCs foram distribuídos em placas de cultura de 48 poços (2 x 10<sup>6</sup> células/poço/500µL) e cultivados em meio Dulbecco (DMEM, Hyclone) com 10% de soro humano (Sigma), durante 7 a 9 dias. Em seguida, as células não-aderentes foram removidas, e meio DMEM com 10% de soro humano (Sigma) foi adicionado a mono camada remanescente. A pureza da preparação de macrófagos foi analisada por citometria de fluxo, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD3 (Pharmingen) e anti-CD16 (Pharmingen) (Cirne-Santos *et al.*, 2006).

**3.4 Infecção de PBMCs.** PBMCs estimulados com fitohemaglutinina e IL-2, foram incubados com HIV-1 (10ng/mL Ag p24) durante 2 hr a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS para remoção do vírus residual, ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino, e distribuídas em placas de 96 poços (2 X 10<sup>5</sup>/poço/200 µL). As células infectadas

foram cultivadas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, e sobrenadantes de cultura foram colhidos após sete dias para avaliação da replicação viral pela técnica de ELISA (p24) (Cirne-Santos *et al.*, 2006).

**3.5 Infecção de Macrófagos.** Macrófagos foram expostos ao HIV-1 (10ng/mL Ag p24) durante 18 hr, a 37°C e a 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS para remoção do vírus residual e realimentadas com meio DMEM fresco com 10% de soro humano. Sobrenadantes de cultura foram colhidos a cada sete dias, durante três semanas, para avaliação da replicação viral (Cirne-Santos *et al.*, 2006) em alguns experimentos o sobrenadante de cultura foi coletado 10 dias após a infecção.

**3.6 Avaliação da replicação do HIV-1.** A replicação do HIV-1 foi medida nos sobrenadantes de cultura das células infectadas pela detecção do antígeno p24, através de ensaio imunoenzimático (ELISA) em kits comerciais, de acordo com as instruções do fabricante. (Zeptometrix Inc. Buffalo, NY, USA)

**3.7 Análise do efeito de NGF sobre a replicação do HIV-1 em PBMCs e macrófagos.** Células infectadas pelo HIV-1 foram tratadas com diferentes concentrações de NGF imediatamente após a infecção, e sobrenadantes de cultura foram colhidos periodicamente, para avaliação da replicação viral.

**3.8 Avaliação de “binding” e entrada viral.** Para avaliação da modulação do “binding” viral, macrófagos foram tratados com NGF (10ng/mL) por uma hora a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, sendo posteriormente colocados a 4°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após 15 minutos, as células foram expostas ao HIV-1 (30ng/mL) por mais 3 horas a 4°C, sendo então lavadas com PBS e lisadas para posterior avaliação de P24 no sobrenadante como descrito no item 3.6. Para análise da entrada viral, macrófagos foram tratados com NGF (10ng/mL) por uma hora a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, infectados com HIV-1 (30ng/mL), mantidos por 3 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, lavados com PBS, tratados com tripsina a 0,25% e lisados para posterior avaliação de P24, como descrito no item 3.6.

**3.9 Detecção do DNA pró-viral total e integrado.** Para a verificação do DNA pró-viral total e do DNA pró-viral integrado, foram realizadas respectivamente as técnicas de *semi-nested* PCR e *nested* PCR adaptados do protocolo descrito por Calcaterra e colaboradores (2001). Resumidamente, macrófagos foram infectados com o isolado R5-trópico ADA (10ng/mL), seguindo o protocolo de infecção

conforme descrito no item 3.5 de Material e Métodos. As células foram, então, tratadas com 10 ng/mL de NGF e mantidas por 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub>, 37°C. O DNA foi extraído usando-se o kit de purificação do DNA Qiamp DNA Blood mini-kit (Quiagen, Alemanha). Parte do DNA extraído foi diluído em série 1:2, e a análise de sua quantidade foi expressa em número de células, o qual foi determinado assumindo que 6.6 ng de DNA correspondia a 10<sup>3</sup> células (Calcaterra *et al.*, 2001). Para obter as seqüências de DNA pró-viral total foram utilizados no primeiro *round* os *primers*: LTR-1 5´CACACACAAGGCTACTTCCCT-3´ e LTR-2 5´AGGCAAGCTTTATTGAGGCTTAAG-3´ e no segundo *round* os primers LTR-1 e LTR-3 5´GCCACTCCCCAGTCCCGCCC-3. Para obter as seqüências de DNA pró-viral integrado foram utilizados os primers ALU 5´TCCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGG-3´ e LTR-2. As condições de ciclagem foram: Ativação Taq Platinum a 94 °C, 5 min; 29 ciclos de amplificação: 95 °C/30 s; 60 °C/30 s; 72 °C/1 min. Extensão final: 72 °C/10 min. O produto final das reações foi visualizado por eletroforese em gel de agarose a 2% marcado com Brometo de Etídio. Em todos os experimentos foram utilizados controles positivos e negativos das reações.

**3.10 Análise da transcrição pró-viral.** Para a análise da transcrição pró-viral, avaliamos os níveis de transcrição de RNAm “Full Length”(FL) do HIV-1 e de RNAm “Multiply Spliced” (MS) do HIV-1 em macrófagos infectados e tratados com 10 ng/mL de NGF ou 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  por 48 horas por PCR em tempo real. O RNA total foi extraído por Trizol e utilizado a 400ng por variável em todos os ensaios. O ensaio de PCR em tempo real foi realizado pelo sistema SYBR Green, como descrito (Sundstrom *et al.*, 2007), com as seguintes condições de ciclagem: 95°C por 3 minutos, (94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto) x 40 ciclos, 4°C por 10 minutos. Os “primers” utilizados foram utilizados sempre a concentração final de 200nM e tiveram a seguinte seqüência; para FL (“sense”, 5´-CTGAAGCGCGCACGGCAA-3´, e “antisense”, 5´-GACGCTCTCGCACCCATCTC-3´), e para MS (“sense”, 5´-GACTCATCAAGTTTCTCTATCAAA-3´, e “antisense” 5´-GTCTCTCAAGCGGTGGT-3´).

**3.11 Análise das vias de sinalização celular.** Macrófagos infectados pelo HIV-1 foram mantidos em cultura por três dias, tratados com os inibidores farmacológicos descritos na tabela 1 por 15 minutos antes da adição de NGF (10ng/mL), e mantidos

por dois dias com os inibidores. A replicação viral foi medida com duas semanas após a infecção.

Inibidor/Quelante	Especificidade	[ ] utilizada
K252a	Inibidor do receptor TrkA	50 nM
BAPTA-AM	Quelante de cálcio intracelular	1,3 µM
Tapsigargina	Inibidor da Ca <sup>2+</sup> -ATPase do retículo endoplasmático	12,5 nM
EGTA	Quelante de cálcio extracelular	1,27 mM
SN50	Inibidor da translocação para o núcleo do complexo NF-κB	21 µM
JBD	Inibidor de Jun-quinase	1,0 µM
PD98059	Inibidor de MAP quinase quinase	2,0 µM
SB203580	Inibidor de p38 quinase	50 nM
H89	Inibidor de PKA	48 nM
Quelerritrina	Inibidor de PKC	0,7 µM
U73122	Inibidor de Fosfolipase C	4,0 µM

Tabela 1 – Nome, especificidade e concentrações dos fármacos utilizados para o estudo das vias de sinalização envolvidas com o efeito do NGF na replicação de HIV-1 em macrófagos.

### 3.12 Isolamento do RNA e efeitos do NGF sobre a expressão do APOBEC3G.

Para avaliação do efeito do NGF sobre a expressão do APOBEC3G, o RNA total de PBMCs não infectados foi obtido com o kit RNAeasy (Quiagen). Em seguida, 1µg do RNA total foi submetido ao GeneAmp RNA PCR (Perkin Elmer). Então, o cDNA para APOBEC3G foi amplificado (protocolo HS01043988\_G1 disponível *online* pela companhia *Applied Biosystems*). Foram realizados também ensaios de “Western blotting” para avaliar a expressão protéica de APOBEC3G em macrófagos não infectados. Assim, as proteínas foram extraídas em tampão de Laemli, submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, e transferidas para membrana de nitrocelulose, a qual foi exposta ao anticorpo primário policlonal anti-apobec3g (ABCAM; ab54257); a revelação foi feita com anticorpo secundário conjugado a peroxidase, e quimioluminescência.

**3.13 Análise Estatística.** A coleção de dados foi analisada pelo método do teste T de “*Student*” não-paramétrico, utilizando-se o software “GraphPad Prism 4”.

## 4. Resultados

### 4.1 NGF estimula a replicação de HIV-1 em macrófagos humanos infectados *in vitro*.

Em nossos primeiros estudos, tratamos macrófagos infectados com HIV-1 com diferentes concentrações de NGF recombinante. As concentrações de NGF de 1 ng/mL, 10 ng/mL e 100ng/mL induziram um aumento médio da replicação viral igual a, respectivamente, 4, 9 e 4 vezes, em relação a células infectadas não expostas ao NGF (Figura 9). Apesar da variação o aumento da replicação viral foi observado em todos os doadores (Figura 10). O efeito de estímulo da replicação causado pelo NGF atinge seu ponto máximo no décimo quarto dia pós-infecção, apresentando leve declínio no vigésimo primeiro dia (Figura 11).

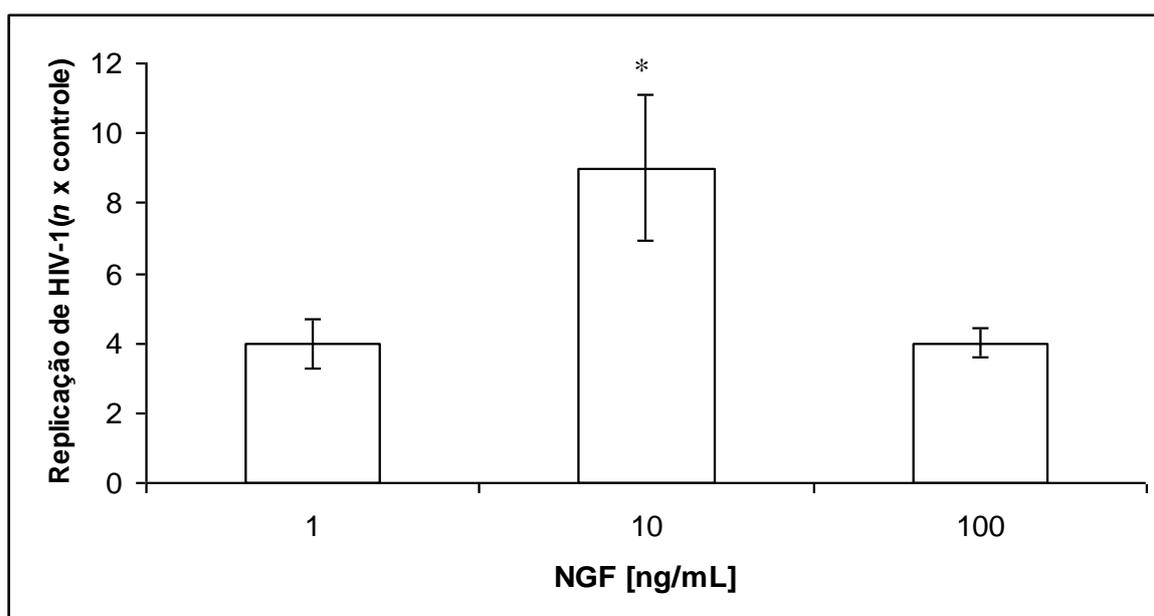


Figura 9 – Efeito da adição de NGF na replicação de HIV-1 em macrófagos. Macrófagos foram infectados com HIV-1 (CCR5 trópico) e tratados com NGF nas concentrações descritas. A carga viral foi medida 14 dias após a infecção pela técnica de ELISA (Ag HIV-1 p24), no sobrenadante de cultura. A figura mostra a replicação viral de células tratadas com NGF em relação ao controle  $\pm$  erro padrão (SEM). N=6;  $p < 0.05$ .

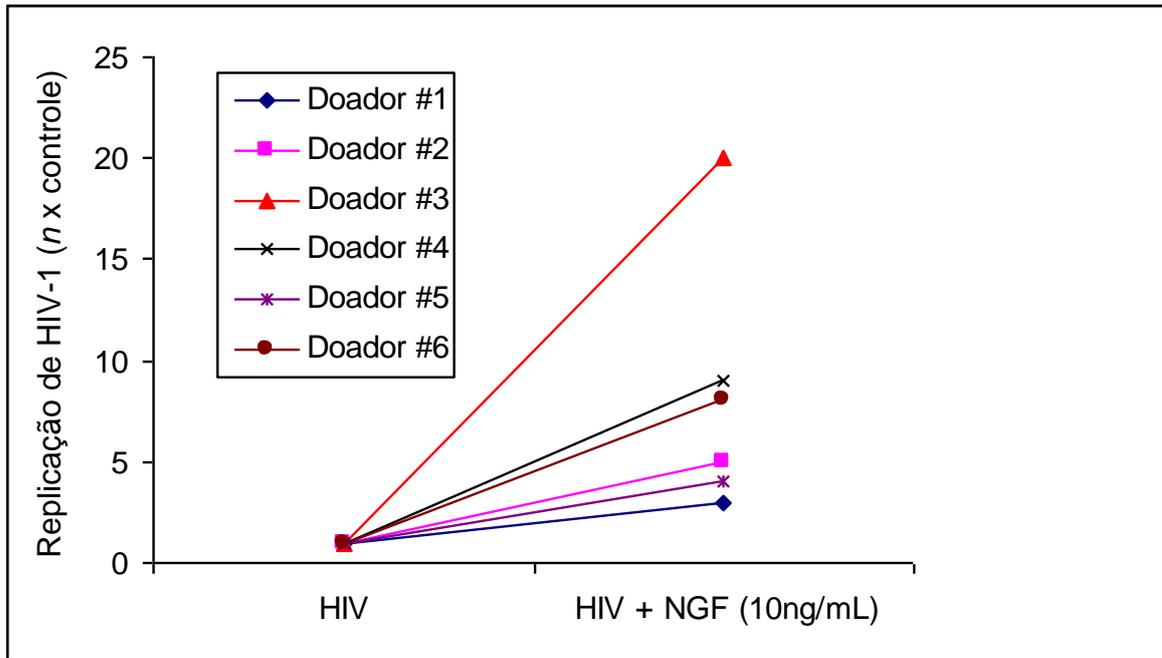


Figura 10 - Efeito da adição de NGF na replicação de HIV-1 em macrófagos. Macrófagos foram infectados com HIV-1 e a replicação viral avaliada como descrito na figura 9. A figura mostra a evolução da replicação viral individual para os doadores apresentados na figura 9.

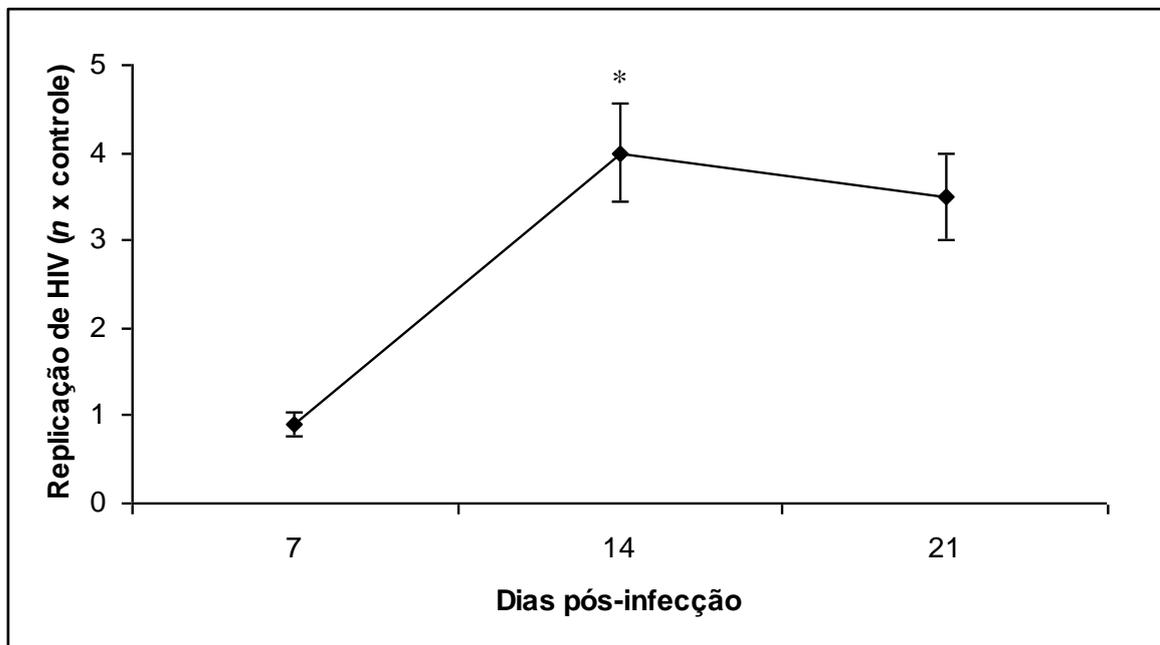


Figura 11 – Cinética da replicação viral nos macrófagos tratados com 1ng/mL dos doadores apresentados na figura 9. A figura mostra a replicação viral em relação ao controle  $\pm$  SEM. N=6;  $p < 0.05$ .

## 4.2 NGF não altera a replicação de HIV-1 em PBMCs humanos infectados *in vitro*.

Uma vez visto que o NGF induz um forte aumento na replicação do HIV-1 em macrófagos humanos infectados *in vitro*, avaliamos se haveria efeito similar em PBMCs. De forma interessante, o NGF não apresentou capacidade de estimular o aumento da produção viral em PBMCs de forma significativa em nenhuma das concentrações testadas (Figura 12). Não observamos modulação da replicação viral mesmo quando analisamos o crescimento do HIV-1 em diferentes momentos pos a infecção (Figura 13).

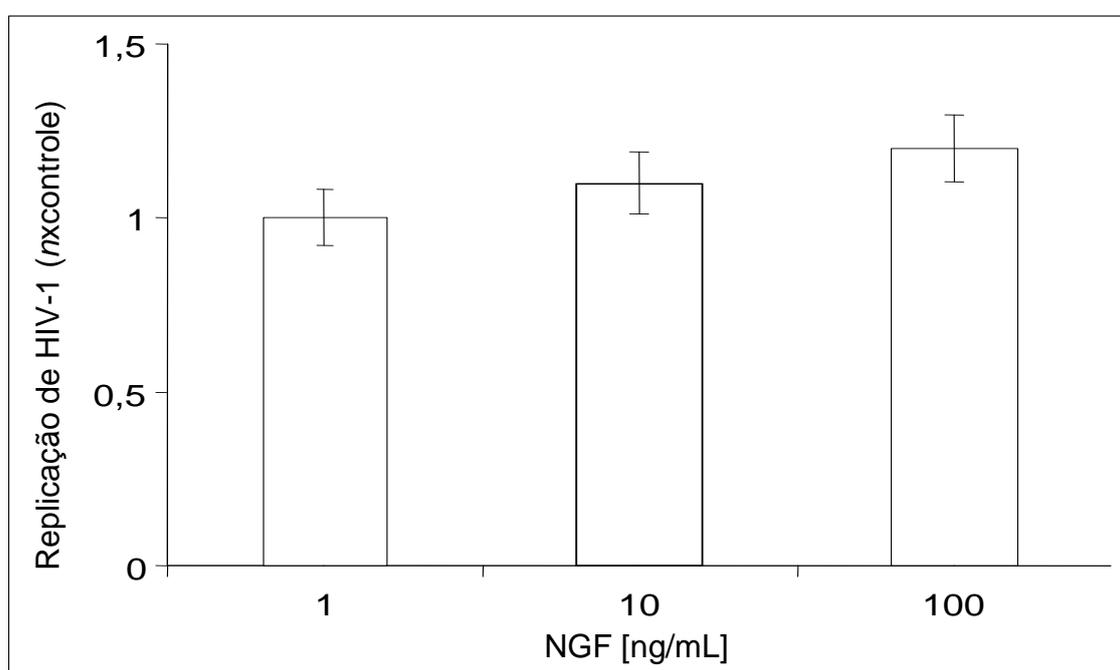


Figura 12 – Efeito da adição de NGF na replicação de HIV-1 em PBMCs. PBMCs foram infectados com HIV-1 (CCR5 trópico) e tratados com NGF na concentração de 10ng/mL. A replicação de HIV-1 foi medida após 7 dias da infecção pela detecção do Ag do HIV-1 p24, por ELISA, nos sobrenadantes de cultura. A figura mostra a replicação viral em relação ao controle  $\pm$  SEM. N=4.

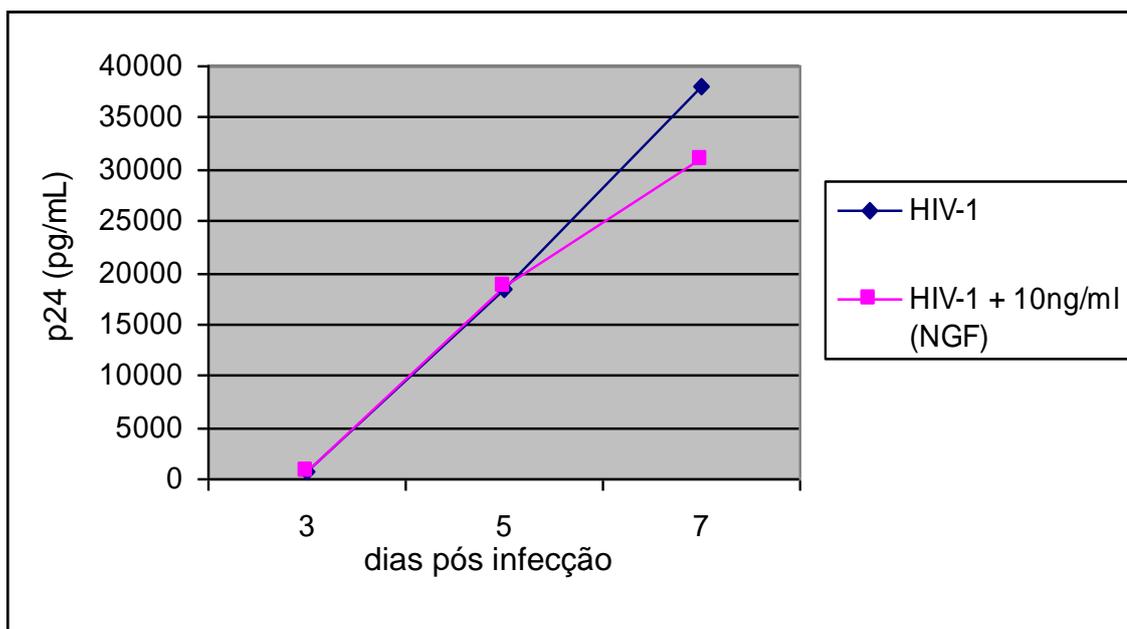


Figura 13 – Produção viral em diferentes dias pós infecção de PBMCs. PBMCs foram infectados com HIV-1 (CCR5 trópico) e tratados com NGF na concentração de 10ng/mL. A replicação de HIV-1 foi medida 3, 5 e 7 dias após a infecção como descrito na figura 12. Figura mostra um experimento representativo de um total de 4.

#### 4.3 O NGF não modula a captura nem a entrada de HIV-1 em macrófagos humanos infectados *in vitro*.

O primeiro questionamento que fizemos sobre como o NGF estimula a replicação do HIV-1 em macrófagos foi se esta neurotrofina favoreceria o vírus em algum estágio pré-integração viral. Para começar a responder tal pergunta, realizamos um experimento funcional, com o intuito de observar se o NGF aumentaria a captura de vírions e/ou facilitaria a entrada destes nos macrófagos. Observamos que, aparentemente, o NGF não incrementa a permissividade de macrófagos à infecção pelo HIV-1 através do aumento da captura de vírions (Figura 14), nem por uma possível facilitação na entrada viral (Figura 15), tendo em vista que os níveis de p24 detectado nos sobrenadantes de cultura de células tratadas e não tratadas com a neurotrofina não apresentaram diferença significativa.

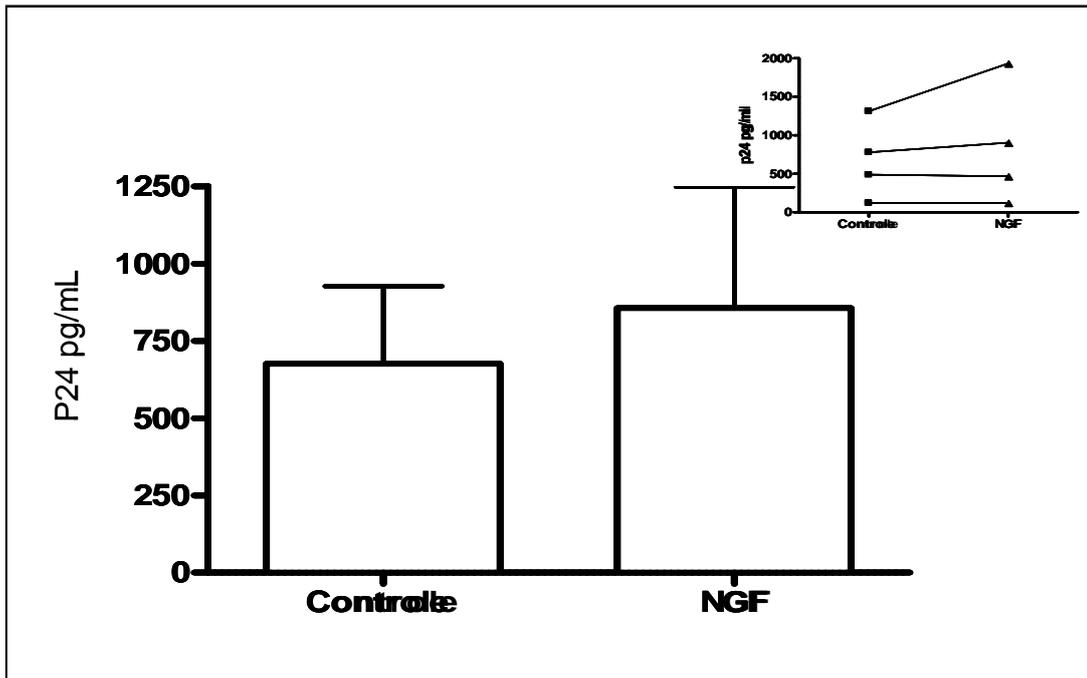


Figura 14 – Ensaio de *Binding* do HIV-1 em macrófagos tratados com NGF. Macrófagos foram tratados com NGF (10 ng/mL) por uma hora, infectados com HIV-1 (CCR5 trópico; 30 ng/mL de p24) a 4°C por 3 horas, lavados com PBS e lisados para quantificação de p24 no sobrenadante. N=4. Quadrante direito superior: dados dos experimentos mostrados individualmente.

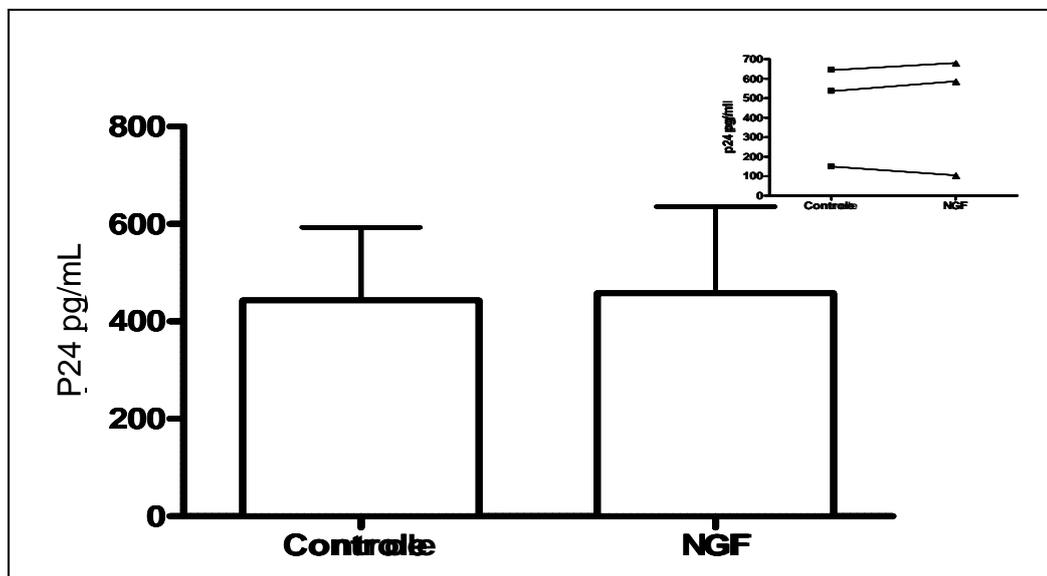


Figura 15 – Ensaio de entrada do HIV-1 em macrófagos tratados com NGF. Macrófagos foram tratados com NGF (10 ng/mL) por uma hora, infectados com HIV-1 (CCR5 trópico; 30 ng/mL) a 37°C por 3 horas, lavados com PBS, tratados com tripsina a 0,25% e lisados para quantificação de p24 no sobrenadante. N=3. Quadrante direito superior: dados dos experimentos mostrados individualmente.

#### 4.4 O NGF não altera a integração do DNA pró-viral em macrófagos humanos infectados *in vitro*.

Ainda com o intuito de avaliar os possíveis impactos do NGF em passos pré-integração viral, averiguamos se a quantidade de DNA pró-viral encontrada em macrófagos tratados com NGF (10ng/mL) era diferente das células não tratadas. Para tal análise utilizamos a técnica do ALU-PCR (Calcaterra *et al.*, 2001), que utiliza “primers” para os LTRs do HIV-1 e para a seqüência humana ALU, o que nos permite inferir sobre quantidade do DNA pró-viral total e a de DNA pró-viral integrado respectivamente. Observando a semelhança do padrão de bandas mesmo em concentrações não saturantes de DNA, tanto das células tratadas como no grupo controle não tratado (Figura 16), temos o indício que o NGF não aumenta a síntese e/ou integração pró-viral em macrófagos infectados pelo HIV-1.

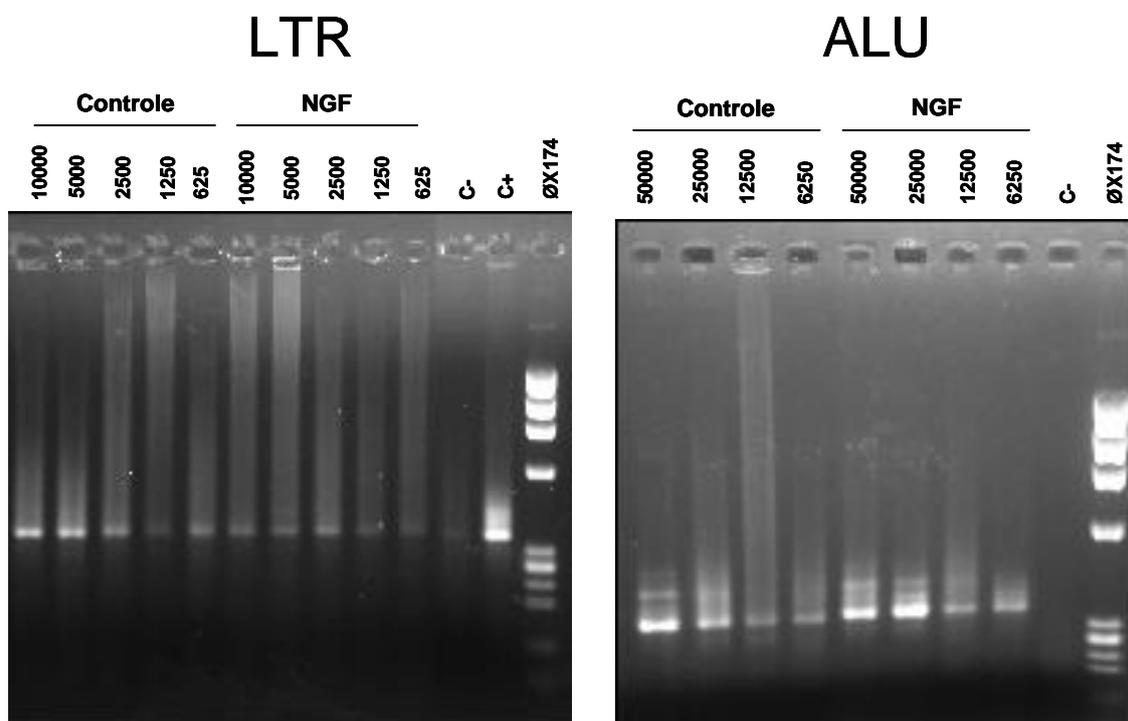


Figura 16 – Análise da síntese/integração pró-viral. Macrófagos foram infectados com HIV-1 (CCR5 trópico) e tratados ou não com 10ng/mL de NGF por 24 horas. Posteriormente, o DNA total foi extraído e diluído em série (1:2) para análise de DNA pró-viral total (LTR) e DNA pró-viral integrado (ALU) pela técnica de PCR convencional. Dados expressos em número estimado de células, considerando a razão de 6,6ng de DNA correspondendo a  $10^3$  células. N=2

#### 4.5 NGF induz o aumento da transcrição pró-viral em macrófagos.

Com o intuito de estudar se o efeito de modulação da replicação viral causado pelo NGF decorria do aumento na transcrição viral, analisamos a modulação da transcrição de RNAm “Full Length” (FL) e “Multiply Spliced” (MS) do HIV-1 por PCR em tempo real. Como controle utilizamos o TNF- $\alpha$  um clássico fator de estimulação da transcrição do HIV (Vicenzi *et al.*, 1997). Nossos resultados preliminares sugerem que o NGF, induz a transcrição, tanto de RNAm FL quanto de MS, em níveis mais elevados que o efeito mediado pelo TNF- $\alpha$  (Figura 17 A e B). Estes resultados apontam para o grande potencial do NGF em favorecer a replicação do HIV-1 através do estímulo da transcrição do genoma viral.

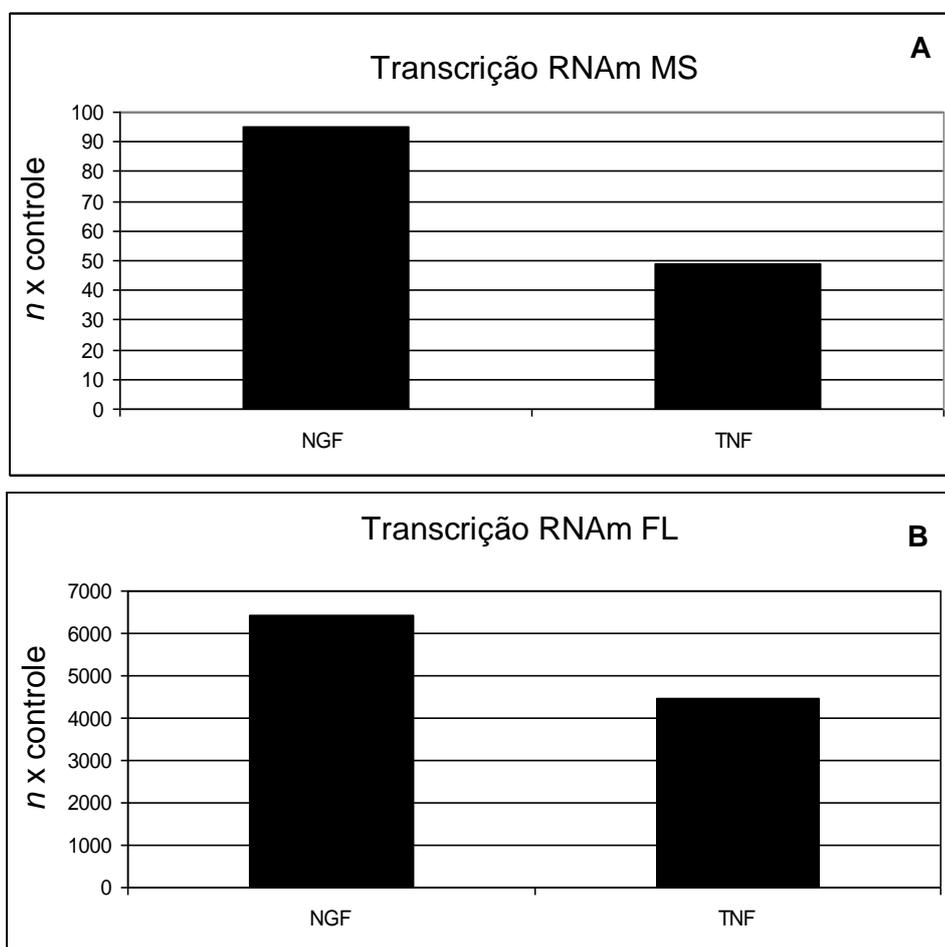


Figura 17 – Análise da transcrição viral em macrófagos tratados com NGF. A) Macrófagos infectados pelo HIV-1 foram tratados com NGF (10ng/mL) ou TNF- $\alpha$  (10ng/mL) por 48 horas para avaliação da transcrição do RNAm “Multiply Slipced”. O RNA foi extraído por Trizol e o ensaio de PCR em tempo real foi realizado por SYBR Green. N=1. B) Macrófagos infectados pelo HIV-1 sofreram o mesmo tratamento que na figura A para avaliação da transcrição do RNAm “Full Length”. N =2.

#### 4.6 O aumento da replicação de HIV-1 em macrófagos estimulados por NGF é dependente do receptor TrkA .

Em seguida, avaliamos quais vias de sinalização intracelular poderiam estar relacionadas com o fenômeno de aumento da replicação do HIV-1 em macrófagos. Para tal, o primeiro passo foi identificar se o receptor de alta afinidade TrkA (K252a) é importante para o efeito mediado pelo NGF. Observamos que em macrófagos infectados tratados com um inibidor farmacológico específico para o receptor TrkA (K252a), o aumento da replicação viral causado pelo NGF foi completamente abolido (Figura 18). Este resultado nos leva a concluir que o efeito de aumento da replicação do HIV-1 em macrófagos estimulados por NGF é dependente do receptor TrkA. Curiosamente, a adição do inibidor de TrkA na ausência de NGF exógeno, foi capaz de inibir a replicação em relação às células não tratadas, efeito devido, provavelmente, ao bloqueio da atividade natural NGF liberado pelas células. É válido ressaltar que ao final desses experimentos a viabilidade celular era invariavelmente alta, isto é, semelhante ao do controle, como avaliado por azul de Trypan .

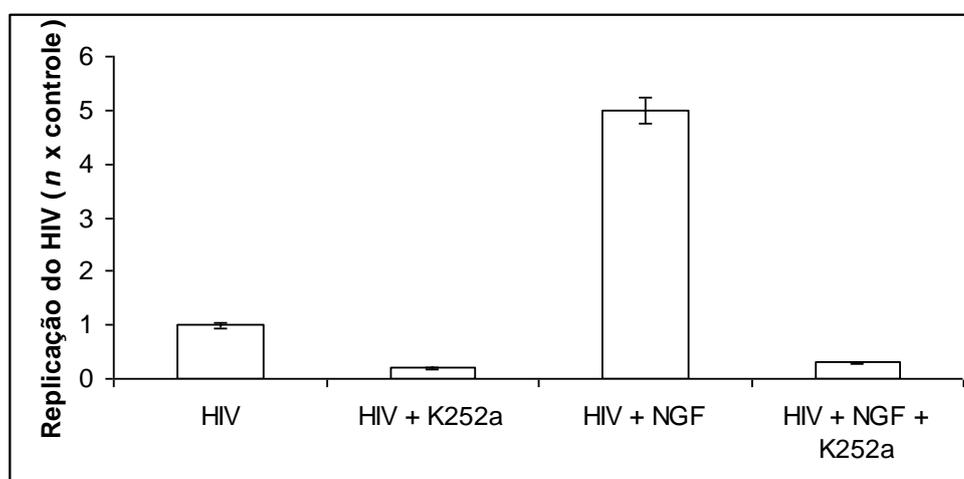


Figura 18 – Análise da participação do receptor TrkA no efeito do NGF na replicação do HIV-1 em macrófagos. Macrófagos infectados com HIV-1 (CCR5 trópico) foram mantidos em cultura por 3 dias e, em seguida, tratados com K252a por 15 minutos antes da adição de NGF (10ng/mL). As células foram mantidas por 48 horas em cultura com o inibidor e o NGF. A replicação viral foi medida duas semanas após a infecção pela detecção do Ag do HIV-1 p24, por ELISA, nos sobrenadantes da cultura. A figura mostra a replicação viral em relação ao controle não tratado  $\pm$  SEM. N=4.

#### 4.7 Análise de vias de sinalização intracelular envolvidas no efeito do NGF na replicação do HIV-1 em macrófagos humanos infectados *in vitro*.

Seguindo com os estudos de identificação de vias de sinalização envolvidas com o efeito do NGF na replicação do HIV-1 em macrófagos, realizamos diversos ensaios nos quais macrófagos infectados foram tratados com quelantes de cálcio intracelular inespecífico (BAPTA-am) e específico de retículo (Tapsigargina), e de cálcio extracelular (EGTA). Macrófagos infectados foram também expostos aos inibidores farmacológicos SN50, JBD, PD98059, SB, H89, Queleritina e U73122 que, respectivamente, inibem NF- $\kappa$ B, JNK, ERK, P38, PKA, PKC e PLC (Tabela 1). Observamos que os quelantes de cálcio intracelular inespecífico e o específico de retículo anularam o efeito do NGF sobre a replicação do HIV-1. Da mesma forma, os inibidores farmacológicos de NF- $\kappa$ B, ERK, P38, PKC e PLC também eliminaram o estímulo na replicação do HIV-1 causado pelo NGF, sugerindo que o cálcio contido no retículo, assim como NF- $\kappa$ B, ERK, P38, PKC e PLC participam do efeito mediado pelo NGF na replicação do HIV-1 em macrófagos humanos *in vitro* (Figura 19).

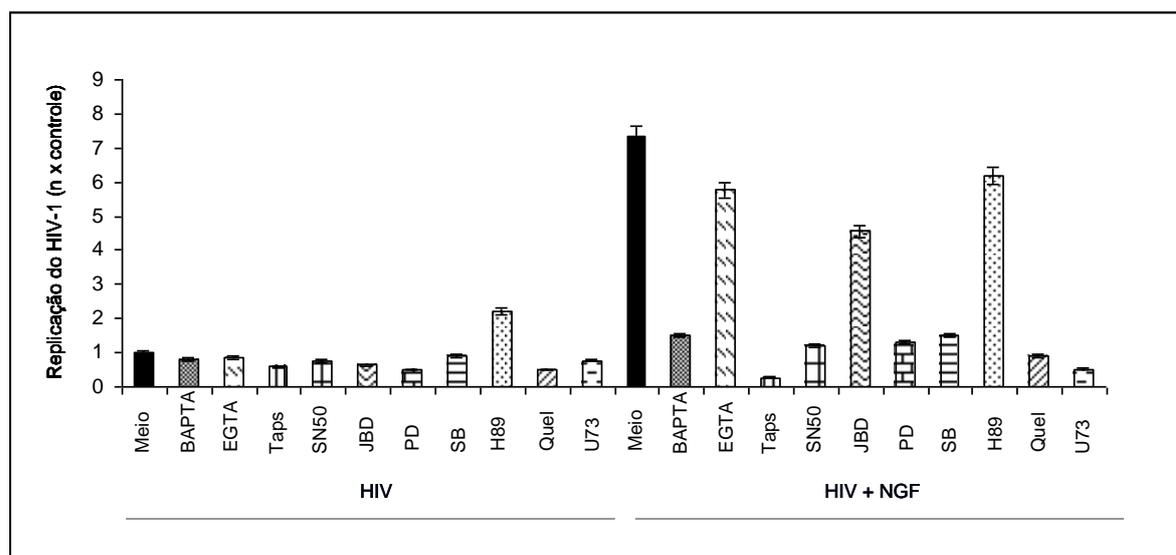


Figura 19 – Análise das vias de sinalização intracelular. Macrófagos infectados com HIV-1 (CCR5 trópico) foram mantidos em cultura por 3 dias, e em seguida tratados por 15 minutos com os inibidores farmacológicos acima mostrados antes da adição de NGF (10ng/mL). As células foram mantidas em cultura por 48 horas com os inibidores e o NGF. A replicação viral foi medida duas semanas após a infecção pela detecção do Ag do HIV-1 p24, por ELISA, nos sobrenadantes de cultura. A figura mostra a replicação viral em relação ao controle  $\pm$  SEM. N=4.

#### 4.8 O NGF regula negativamente a produção de APOBEC3G ao nível transcricional.

Procurando elucidar os mecanismos pelos quais o NGF amplifica a replicação do HIV-1, verificamos um possível efeito regulador do NGF sobre a proteína APOBEC3G, um importante fator endógeno celular de restrição à replicação do HIV-1 (Peng *et al.*, 2007). Como controle positivo as células foram tratadas com IFN- $\gamma$ , um conhecido indutor da síntese desta proteína (Peng *et al.*, 2007). Vimos que PBMCs tratados com NGF (10ng/mL) apresentaram uma acentuada diminuição na síntese de RNAm em relação a células tratadas com IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) ou apenas mantidas em meio de cultura (Figura 20).

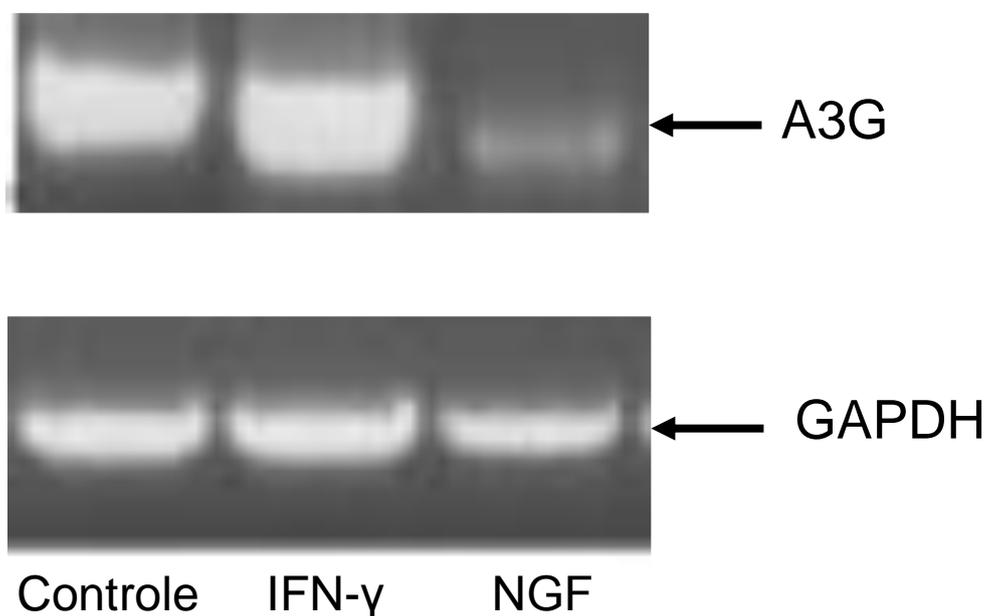
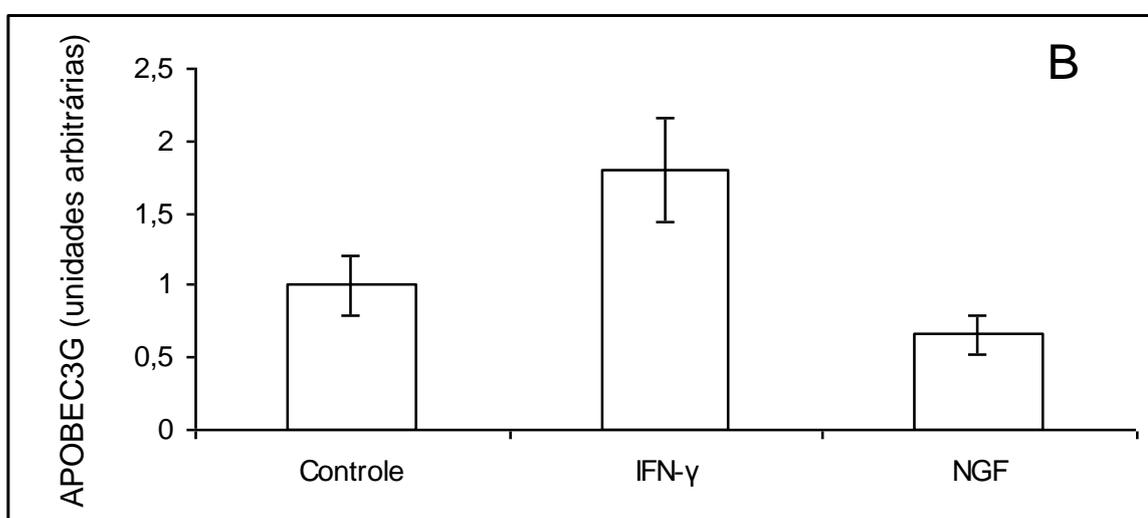
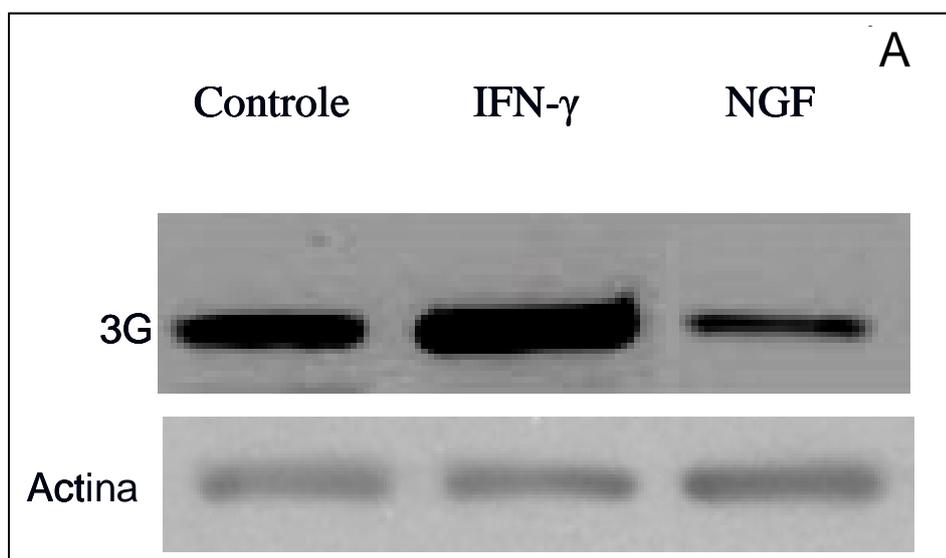


Figura 20 – Análise da expressão de RNAm para APOBEC3G. PBMCs não infectados foram tratados com NGF (10 ng/mL) ou IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) por 24 horas. O RNA total foi extraído com o kit RNeasy (Quiagen). Em seguida 1  $\mu$ g do RNA total foi transcrito reversamente utilizando-se o kit GeneAmp RNA PCR (Perkin Elmer). O cDNA para APOBEC3G foi amplificado de acordo com as condições descritas no protocolo HS01043988\_G1( disponível on-line em Applied Biosystems). A figura mostra um experimento representativo de 3 com resultados semelhantes.

#### 4.9 O NGF regula negativamente a síntese protéica de APOBEC3G.

Buscando confirmar o efeito de inibição causado pelo NGF sobre a síntese do fator de restrição à replicação viral, APOBEC3G, analisamos por “Western blotting” a produção desta proteína em macrófagos tratados com NGF na presença ou ausência do estímulo de IFN- $\gamma$ . Macrófagos tratados com 1 ng/mL e com 10 ng/mL de NGF na presença de IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) apresentaram clara diminuição na produção da proteína APOBEC3G, quando comparados com células tratadas apenas com IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) (Figura 21 A). Da mesma forma, macrófagos tratados somente com NGF (10 ng/mL) também apresentaram diminuição da síntese de APOBEC3G em relação ao grupo tratado com IFN- $\gamma$  (10ng/mL) e apenas em meio de cultura (Figura 21 C). Estes resultados corroboram assim os achados de inibição na síntese de RNAm descritos no item 4.8.



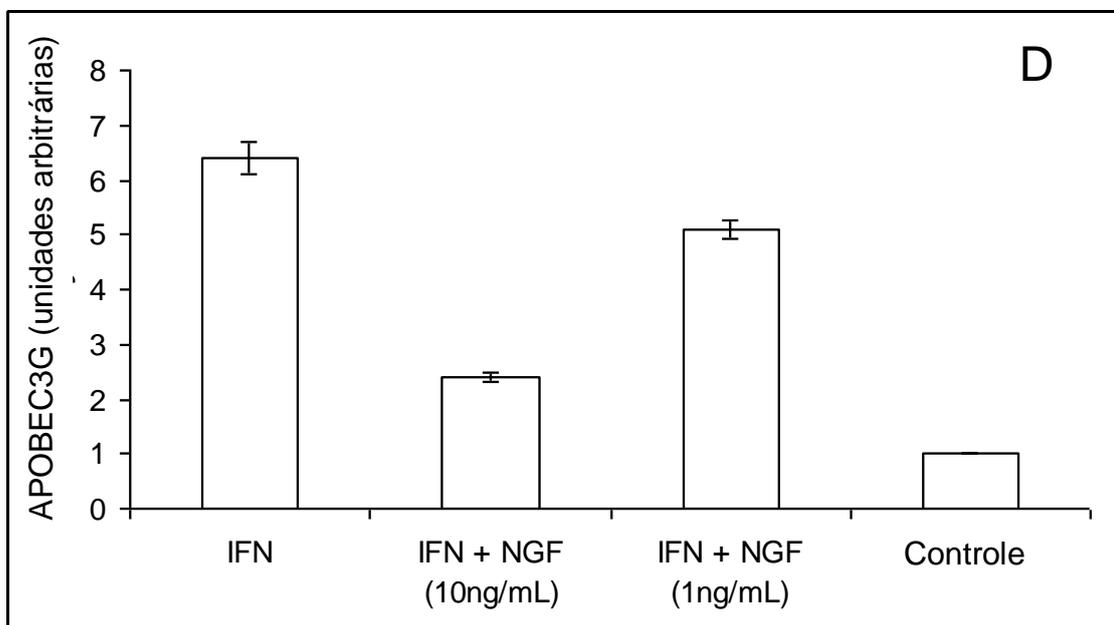
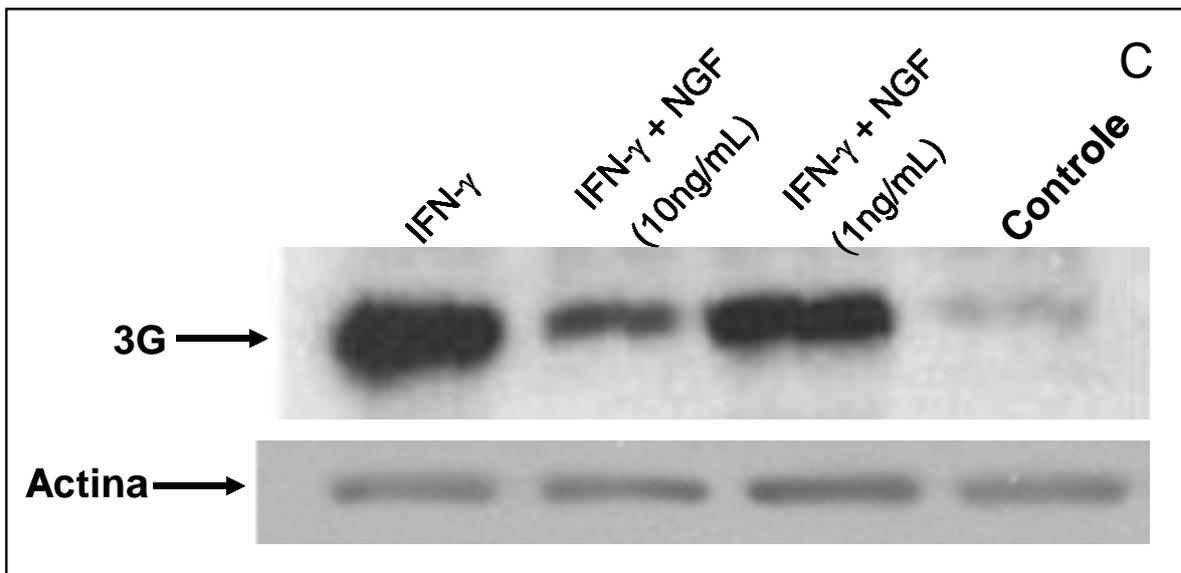


Figura 21 - Análise da síntese de APOBEC3G em macrófagos tratados com NGF. A) Macrófagos não infectados foram tratados com IFN- $\gamma$  (10ng/mL) ou com NGF (10 ng/mL) por 48 horas. Em seguida foram lisados em tampão de Leammli e analisadas por “western blot”. Figura mostra um experimento representativo de 4 com resultados semelhantes. B) Densitometria realizada no software EagleSight (versão 3.21; Stratagene; La Jolla, CA, USA) relativa aos “western blots” da figura 21 A. C) Macrófagos não infectados foram tratados com IFN- $\gamma$  (10ng/mL) na ausência e na presença de 1ng/mL e de 10 ng/mL de NGF por 48 horas. Em seguidas processados como descrito acima. Figura mostra um experimento representativo de 3 com resultados semelhantes. D) Densitometria realizada no software EagleSight (versão 3.21; Stratagene; La Jolla, CA, USA) relativa aos “western blots” da figura 21 C.

## 5. Discussão

Estudos que buscam um melhor entendimento dos fatores que compõem a relação entre o sistema imunológico e o HIV-1 causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) tem sido objeto dos esforços de diversos grupos de pesquisa por todo mundo. Esta mobilização é motivada pela gravidade da pandemia causada pelo HIV, de acordo com os números do último levantamento realizado pelo UNAIDS/WHO em 2008 (figuras 1 e 2), e também pela dificuldade em se entender toda a complexa rede de interações entre o HIV e o sistema imune humano.

Dentro deste grande arcabouço que caracteriza a deficiência do sistema imune causada pelo HIV-1, diversos fatores endógenos e exógenos têm sido destacados como peças-chave na modulação do ciclo replicativo deste vírus (Wahl *et al.*, 2003). Dentre estes, fatores solúveis como citocinas, por exemplo, desempenham papel bastante relevante no contexto da infecção pelo HIV-1 (Alfano *et al.*, 2008). Um exemplo bem consolidado de efeito de citocinas neste contexto é o Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ), cujo nível sérico está aumentado na infecção pelo HIV-1, e ainda induz uma maior replicação viral *in vitro* (Ito *et al.*, 1989; Roux-Lombard *et al.*, 1989).

Em 1999, Garaci e colaboradores chamaram atenção para um outro grupo de moléculas solúveis que também poderiam estar envolvidas na modulação da replicação do HIV-1, as neurotrofinas. Neste trabalho os autores demonstraram que a inibição dos efeitos da neurotrofina NGF sobre macrófagos infectados *in vitro* pelo HIV-1 (por meio da adição de anticorpos neutralizantes), reduzia a níveis muito baixos a produção viral em comparação com a dos macrófagos infectados expostos apenas ao meio de cultura (Garaci *et al.*, 1999).

Curiosamente, mesmo após a publicação deste estudo poucos grupos se interessaram pela análise mais profunda estudo de um possível efeito modulatório do NGF sobre a replicação do HIV, sendo a única publicação com este perfil a de Samah e colaboradores (2009) que, de forma conflitante com o mostrado por Garaci *et al.* (1999), mostra uma ausência de regulação positiva na produção de NGF em macrófagos infectados pelo HIV-1, e a não modulação da replicação viral pela adição de NGF (Samah *et al.*, 2009). As demais publicações disponíveis na literatura são majoritariamente relacionadas com a importância do NGF e das vias intracelulares disparadas por este fator (principalmente a via das MAPK/Erk) em neurônios, e as implicações que a proteína do HIV-1 Tat gera nesse sistema. Alguns autores mostram que Tat provoca um desequilíbrio da cascata gerada pelo NGF, e

conseqüente indução de apoptose em neurônios de sinalização, fenômeno crítico para o desencadeamento de uma das facetas mais graves da infecção pelo HIV-1, a demência relacionada à AIDS (Bergonzini *et al.*, 2004; Darbinian-Sarkissian *et al.*, 2006; Darbinian *et al.*, 2008).

Baseados então nos achados de Garaci *et al.* (1999), nas evidências de que fatores solúveis são importantes na história natural da infecção pelo HIV-1, e na carência de trabalhos que exploram o mecanismo pelo qual o NGF poderia estar envolvido com a modulação da replicação do HIV-1, nós decidimos realizar um estudo com o intuito de avaliar se a adição de NGF em culturas de PBMCs e macrófagos teria a capacidade de alterar a replicação viral nestas células, e quais fenômenos poderiam estar relacionados com tal possível modulação.

O primeiro resultado obtido por nós veio em complemento aos dados obtidos por Garaci e colaboradores, tendo em vista que eles demonstraram que a neutralização do NGF naturalmente produzido por macrófagos diminuía a replicação do HIV-1 em cultura. Nosso grupo, por nossa vez, mostrou que não só a presença do NGF endógeno é importante para a replicação do HIV-1, como a adição de NGF exógeno tem a capacidade de aumentar os níveis de produção viral em macrófagos infectados *in vitro* (figura 9). A diferença entre nossos achados e os de Samah *et al.* (2009) talvez se deva a diferenças no protocolo, já que, nós diferentemente daqueles autores, tratamos as células logo após a infecção pelo HIV-1, enquanto eles primeiro tratam as células com a neurotrofina e só então as infectam. O aumento da carga viral causado pela adição de NGF exógeno à cultura, observado pelo nosso grupo, não apresenta uma curva dose-reposta, já que a maior concentração testada (100ng/mL) possui a mesma capacidade estimulatória da replicação viral que a menor concentração utilizada (1ng/mL), enquanto que a concentração de NGF de maior efeito para a replicação do HIV-1 no nosso modelo foi a de 10ng/mL (figura 9). Esta característica é bastante comum em diversos fenômenos biológicos, principalmente quando envolve moléculas com grande potencial de ativação, como PAF (*platelet-activating factor*), por exemplo, que, quando em concentrações acima das ideais, se torna menos potente quanto ao seu efeito sobre ativação das plaquetas e sobre a estimulação de PBMCs (Chao & Olson, 1993; Lacasse & Rola-Pleszczynski, 1991).

Houve grande variação do efeito de aumento da replicação viral causado pelo NGF entre os doadores, com estimulações que variaram de cerca de 3 vezes a até 20 vezes em relação ao controle não tratado (figura 10). Duas conclusões devem ser

salientadas desse resultado: a primeira, que em todos os doadores o efeito esteve presente, demonstrando com isso a consistência do fenômeno; a segunda, que o NGF possui um robusto potencial de estimulação da replicação do HIV-1 em macrófagos, uma vez que foi capaz de induzir em até expressivas 20 vezes a produção viral nessas células.

A curva temporal do efeito de estimulação da replicação do HIV-1 em macrófagos *in vitro* pelo NGF seguiu o mesmo perfil costumeiramente observado em culturas mantidas apenas em meio de cultura. Detectamos uma taxa baixa de produção viral no sétimo dia após a infecção, com pico de replicação viral por volta do décimo-quarto dia, e uma ligeira tendência de queda deste ponto em diante (Figura 11), como visto em outros estudos (Lima *et al.*, 2002; Samah *et al.*, 2009).

É de se notar que, o efeito de aumento da replicação do HIV-1 observado em macrófagos não se repetiu em PBMCs. Não vimos qualquer modulação da produção viral, independentemente das concentrações testadas (figura 12), e uma aparente tendência à inibição da replicação em tempos mais tardios (figura 13). Este resultado provavelmente não é devido a uma possível ausência de sensibilidade de linfócitos ao NGF, tendo em vista que, trabalhos do final da década de 1980 já demonstravam a presença de efeito das neurotrofinas sobre a ativação de linfócitos (Dean *et al.*, 1987; Otten *et al.*, 1989; Thorpe & Perez-Polo, 1987). Esta evidência se consolidou com a demonstração, no início da década de 1990, que os linfócitos não só apresentavam receptores para o NGF e outras neurotrofinas, como também possuíam a capacidade de sintetizar e liberar tais neurotrofinas (Ehrhard *et al.*, 1993a; Ehrhard *et al.*, 1994). Estes achados trouxeram à luz a idéia de que os linfócitos não só eram suscetíveis aos efeitos do NGF, como estes efeitos provavelmente ocorriam de forma parácrina e autócrina (Levi-Montalcini *et al.*, 1995), bem como ocorre em macrófagos (Ehrhard *et al.*, 1993b). Tais conclusões jogam por terra uma possível suspeita de que a discrepância entre os resultados de macrófagos e PBMCs seja devido a uma diferença no perfil de expressão dos receptores de alta afinidade TrkA, ou mesmo de sensibilidade ao efeito da neurotrofina entre estes dois tipos celulares. Cogitamos, então, que esta ausência de efeito do NGF na replicação do HIV-1 em PBMCs possa estar relacionada com o modelo experimental utilizado. Isto porque para a obtenção de linfócitos T infectados pelo HIV-1 produtivos é crucial que estas células estejam ativadas e em estado proliferativo (Stevenson, 2003) e, para tal, é comumente utilizado o agente ativador mitótico PHA (fitohemaglutinina). É possível que o potente efeito de ativação desta

lectina possa estimular estas células de tal forma que não possibilite a ação de outro agente, tal como o NGF. Porém, uma conclusão definitiva sobre esta hipótese somente será possível com a execução de experimentos adicionais. Entre estes, cogitamos verificar se a adição do inibidor farmacológico de TrkA à cultura de PBMCs infectados pelo HIV-1 resulta em queda da replicação viral, o que seria resultado do bloqueio do efeito do NGF endógeno sobre a ativação linfocitária.

Uma vez demonstrado que a adição de NGF exógeno é capaz de regular positivamente a replicação de HIV-1 em macrófagos infectados *in vitro*, iniciamos estudos com o objetivo de entender de que forma tal fenômeno ocorre. O primeiro passo nesse sentido foi avaliar se o NGF exercia um papel facilitador em alguma etapa do ciclo replicativo do HIV-1. Avaliamos inicialmente uma possível modulação do *binding* viral pelo NGF, através de um protocolo no qual os macrófagos foram tratados com NGF por 1 hora a 37°C, com o intuito de permitir uma possível mudança no perfil de expressão de receptores membranares; posteriormente, as células foram transferidas para 4°C a fim de interromper a fluidez membranar e evitar o “turnover” de receptores e manter o perfil de expressão adquirido pelo tratamento com a neurotrofina. Só então acrescentamos o HIV-1 na cultura, de forma que os vírions pudessem se ligar aos receptores CD4/CCR5, mas não conseguissem entrar na célula pela ausência de fluidez da membrana. Com isso, conseguimos mensurar a quantidade de vírions que se ligaram aos receptores celulares necessários para o *uptake* viral na presença e na ausência do tratamento com NGF, e desta forma avaliar se esta neurotrofina tinha o potencial de facilitar a ligação dos vírions aos macrófagos. Como observado na figura 14, a diferença na quantidade de p24 obtida no lisado das células tratadas com NGF e das células não tratadas não foi estatisticamente relevante, indicando que o efeito de aumento da replicação viral obtido pelo tratamento com NGF não ocorre em razão de uma facilitação do *binding* viral. Outro resultado que também aponta na direção de que o efeito do NGF não é devido a uma facilitação nas primeiras etapas do ciclo do HIV-1 é o observado na figura 15. Neste experimento, concluímos que o NGF tampouco influenciou a entrada do HIV-1 nos macrófagos. Para tal, utilizamos um protocolo muito semelhante ao experimento anterior, sendo a diferença principal o fato de que as células não são submetidas a baixas temperaturas, o que permite a fusão entre as membranas do vírion e da célula hospedeira e, por conseguinte, a entrada da partícula viral na célula.

Com o intuito de analisar se mesmo não tendo um papel facilitador no *binding* e entrada o NGF poderia favorecer algum outro evento pré-integração, como a transcrição reversa, transporte do pró-vírus para o núcleo ou integração, avaliamos a quantidade de DNA pró-viral total e de DNA pró-viral integrado em macrófagos tratados e não tratados com NGF. Para este estudo utilizamos um protocolo adaptado de Calcaterra e colaboradores (2001) no qual, para avaliar o DNA pró-viral integrado realiza-se um primeiro round de PCR com *primers* para a região ALU humana e para o LTR do HIV-1, e um segundo apenas com *primers* para região LTR do HIV. A utilização de *primers* desenhados para anelar com regiões muito conservadas e com alta taxa de repetição do genoma humano, como a região ALU, em conjunto com *primers* específicos para as regiões do HIV, como a região LTR, permite avaliar a presença de DNA pró-viral integrado ao genoma das células do hospedeiro (Kumar *et al.*, 2002). Todavia, por se tratar de uma técnica de PCR convencional, só nos permitiria uma interpretação qualitativa do resultado, ou seja, se havia ou não integração viral nos macrófagos tratados. Tal interpretação responderia apenas parcialmente esta pergunta, uma vez que nosso interesse consistia na análise de uma possível modulação do fenômeno, e não em um efeito absoluto. Tentando minimizar esta limitação realizamos, como proposto por Calcaterra *et al.* (2001), uma diluição seriada do DNA obtido de macrófagos tratados ou não com NGF, a fim de comparar a intensidade de bandas mesmo em concentrações não saturantes de DNA. Para o estudo do DNA pró-viral total, que consiste não só do integrado, como também nas três formas encontradas de DNA pró-viral extra-cromossomal (linear, 1-LTR e 2-LTR) (Kumar *et al.*, 2002), utilizamos dois *rounds* de PCR apenas com *primers* específicos para a região LTR do HIV-1, e a mesma estratégia de diluição do DNA aplicada no estudo do DNA pró-viral integrado (Calcaterra *et al.*, 2001). Vimos que, de uma forma geral, mesmo em concentrações não saturantes de DNA, não houve aumento na intensidade das bandas nos grupos tratados com NGF em relação aos grupos controle (figura 16). Portanto, os resultados obtidos com essa estratégia experimental sugerem que, aparentemente, o tratamento com NGF não regula positivamente passos pré-integração do ciclo replicativo do HIV-1.

De forma a seguir com o objetivo de elucidar em que ponto do ciclo replicativo do HIV-1, a adição de NGF exógeno estaria sendo importante para o aumento da replicação viral, realizamos um PCR quantitativo em tempo real para analisar o perfil de expressão de RNAm “Full Length” e “Multiply Spliced”, com ou sem a adição de

NGF à cultura de macrófagos infectados (figura 17). Apesar do número de amostras reduzido, observamos uma clara tendência ao aumento na transcrição de ambos os tipos de RNAm. Este dado indica que o NGF tem o potencial de aumentar não só replicação como um todo, como também a eficiência e patogenicidade da infecção, por estimular os RNAm que codificam as proteínas acessórias Tat e Rev (RNAm MS) (Pasternak *et al.*, 2008; Sonza *et al.*, 2002). Esta análise será realizada mais algumas vezes, com o objetivo de se obter um *n* que permita a comparação estatística.

Os resultados obtidos até este ponto do trabalho indicam que o NGF provavelmente favorece a replicação do HIV-1 da mesma maneira que outros fatores solúveis o fazem. Citocinas classicamente conhecidas como potentes estimuladores da replicação do HIV-1, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, têm como característica a participação em passos transcricionais e pós-transcricionais do ciclo replicativo do HIV-1, não tendo qualquer efeito descrito em passos pré-integração (Cassol *et al.*, 2009). Dos mecanismos moleculares conhecidos pelos quais as citocinas favorecem a replicação do HIV-1 ao nível transcricional, o mais estudado é a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Este fator tem a peculiaridade de, uma vez ativado no citoplasma, migrar para o núcleo e se ligar em sítios próximos ao do gene promotor da replicação do HIV (LTR), podendo com isso iniciar ou aumentar a expressão das proteínas virais e a conseqüente produção do HIV-1 (Breen, 2002).

Portanto, considerando que o NGF aumenta a replicação do HIV-1 sem influenciar passos pré-integração, que esta neurotrofina, aparentemente, é capaz de estimular a transcrição pró-viral do HIV-1, que seu perfil funcional pleiotrópico é similar à das citocinas, e que existem relatos na literatura que demonstram a capacidade do NGF de ativar o LTR do HIV-1 (Recio & Aranda, 1997), nós hipotetizamos que, assim como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , o NGF poderia estimular a replicação através do disparo de vias de sinalização intracelular que, em última instância, acarretariam o aumento transcricional do HIV pela ativação do seu promotor, o LTR.

Para avaliar esta hipótese, o primeiro passo foi identificar qual receptor era responsável pela transdução do efeito mediado pelo NGF na replicação viral: se o de alta afinidade, TrkA, o de baixa afinidade, p75, ou ambos. Esta resposta era crítica para a continuidade do estudo proposto, pois as vias intracelulares disparadas por esses dois receptores, apesar de estimuladas pelo mesmo fator, em geral são bastante distintas, gerando muitas vezes efeitos opostos na fisiologia da célula. O TrkA é classicamente associado a estimulação da sobrevivência, diferenciação,

atividade e plasticidade neural, ao iniciar uma cascata que inclui, entre outros fatores, fosfolipase C, PKC, P13, AKT e a via das MAPK-Ras-Erk (Micera *et al.*, 2007). Por outro lado, sabe-se que o p75, apesar de trabalhos apontarem um efeito sinérgico ao do TrkA (Clary & Reichardt, 1994) e a aparente característica pró-sobrevivência via a ativação de NF- $\kappa$ B (Rao *et al.*, 1995), tem como efeito clássico garantir uma rápida e eficiente apoptose de neurônios neonatais e transmitir sinais de morte a neurônios danificados (Nykjaer *et al.*, 2005). As vias de sinalização disparadas pelo p75 incluem TRAF6, Caspase, BAX, citocromo C e Jun quinase (Micera *et al.*, 2007). Os efeitos e vias disparadas tanto pelo TrkA quanto pelo p75 são classicamente relacionadas a células neurais porque a grande maioria dos trabalhos visando entender os seus mecanismos de ação e características são realizados no modelo de células Feocromocitoma 12 (PC12), uma célula de linhagem neural tumoral que se divide e se diferencia por completo quando tratada com NGF (Greene & Tischler, 1976). Todavia, outros trabalhos mostram que o perfil funcional desses receptores, observado nos neurônios, se repete em outros tipos celulares, inclusive do sistema imune. Em macrófagos, por exemplo, sua ativação por tratamento com LPS em conjunto com a neutralização de NGF da cultura, acarreta um aumento da expressão de p75 e um conseqüente encaminhamento dessas células para apoptose (Caroleo *et al.*, 2001), enquanto que o aumento de expressão de TrkA em monócitos está correlacionado com a sua maior ativação (Ehrhard *et al.*, 1993b).

A nossa estratégia para avaliar o papel dos receptores p75 e TrkA no contexto da estimulação da replicação do HIV-1 em macrófagos, foi a adição do inibidor farmacológico específico para o TrkA (K252a) a culturas de células previamente infectadas e tratadas ou não com NGF. Desta forma pudemos comparar se houve modulação da replicação viral, quando na ausência de atividade do receptor de alta afinidade, em comparação com as células que possuíam TrkA não bloqueado. O que observamos foi uma completa anulação do efeito estimulatório do NGF no grupo de células tratado com o fármaco (figura 18). Concluimos que o receptor TrkA é fundamental para que ocorra o fenômeno de estímulo da replicação do HIV-1, e que o receptor p75, apesar de ter a capacidade de estimular NF- $\kappa$ B, um fator intimamente relacionado com a ativação da transcrição do HIV-1, não consegue sustentar o efeito do NGF sem a presença do receptor TrkA. A queda da replicação de HIV-1 mesmo em macrófagos não expostos ao NGF exógeno, sugere assim

como Garaci *et al.*, (1999), que o NGF naturalmente produzido é um importante componente na manutenção da replicação viral basal em macrófagos.

Para o estudo das vias de sinalização intracelular que poderiam estar envolvidas com o efeito gerado pelo NGF na replicação do HIV-1, utilizamos a mesma estratégia experimental que foi aplicada ao estudo dos receptores, modificando apenas os inibidores farmacológicos de acordo com a via a ser analisada. Utilizamos inibidores de fatores que integram as principais vias ativadas pelo TrkA e p75, como fosfolipase C (PLC) (U73122), PKC (Quelitrina), PKA (H89), ERK (PD98059), p38 (SB), NFκB (SN50) e Jun quinase (JNK) (JBD) (Huang & Reichardt 2003; Reichardt, 2006), além dos quelantes de íons cálcio intracelular (BAPTA-am) e extracelular (EGTA) e específico de retículo endoplasmático (Tapsigargina). Novamente comparando a replicação viral entre os grupos tratados com NGF+Inibidor ou só com NGF, pudemos avaliar quais desses fatores descritos acima eram críticos para o efeito desencadeado pela neurotrofina. Vimos, então, que o cálcio intracelular, mais especificamente contido no retículo endoplasmático, juntamente com PLC, PKC, P38, ERK e NF-κB eram fundamentais para o efeito do NGF (Figura 19). De posse destes resultados sugerimos uma cascata de eventos (figura 22) que teria início com a ligação do NGF nos receptores TrkA e p75, com o TrkA ativando PLC, que catalisaria a hidrólise de fosfatilinositol (Steinman *et al.*) nos dois segundos mensageiros, inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG); IP3 se ligaria a seus receptores no retículo endoplasmático sinalizando para a abertura dos canais que permitem a liberação de  $Ca^{2+}$  no citoplasma, e DAG, juntamente com o  $Ca^{2+}$  liberado no citosol, ativaria PKC. Uma vez ativado, PKC fosforilaria duas proteínas da família das MAPK, ERK e p38, que então migrariam para o núcleo e ativariam a transcrição celular. A participação de NFκB observada provavelmente não se deve somente à ligação de NGF ao p75, já que, como visto pelo ensaio com o inibidor do TrkA, só a atividade de p75 não é capaz de gerar aumento na replicação viral. Desta forma, possivelmente PKC esteja gerando também um co-estimulo crítico para a atividade de NFκB no efeito mediado pelo NGF. Esta coleção de resultados permite-nos cogitar sobre um dos possíveis mecanismos para o aumento da replicação viral gerado pela ligação de NGF a células infectadas pelo HIV-1. Isto porque a via de NFκB é classicamente descrita como importante fator na replicação do HIV-1 via modulação da transcrição do LTR viral (Duh *et al.*, 1989), e as MAPK sabidamente aumentam a expressão gênica celular, resultando em um aumento da produção do

genoma pró-viral e estimulando a síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias, também importantes no contexto da patogénia do HIV-1 (Mangino *et al.*, 2007).

Outro possível mecanismo estudado por nós pelo qual o NGF poderia favorecer a replicação do HIV-1 em macrófagos, foi a análise da sua capacidade em modular a expressão celular de fatores endógenos de restrição à replicação do HIV-1, como a proteína APOBEC3G (A3G) (Peng *et al.*, 2007). Vimos que o tratamento com NGF foi capaz de diminuir de forma drástica tanto a produção de RNAm (figura 20) quanto a síntese proteica de APOBEC3G (figura 21), inclusive apresentado um efeito capaz de contrapor a ação do IFN- $\gamma$ , um potente agente indutor da produção desta proteína (Peng *et al.*, 2007). Relatos na literatura apontam ainda que, além da capacidade de inibir a síntese proteica do APOBEC3G aqui mostrada, o NGF possivelmente também atua diminuindo a eficiência enzimática de APOBEC3G que ainda assim foi produzido. Assim entendemos porque trabalhos demonstram que o NGF aumenta a atividade do fator regulador de transcrição C/EBP $\beta$  (também conhecido como NF-IL6, (Sterneck & Johnson, 1998), que, por sua vez, é relacionado com a inibição da atividade do APOBEC3G no contexto da replicação do HIV-1 (Kinoshita & Taguchi, 2008). Tal conjunto de informações traz à luz a idéia que o NGF exerce um papel de forte modulação negativa sobre um dos fatores endógenos de restrição à replicação do HIV-1 mais potentes e estudados atualmente (Wahl *et al.*, 2006).

Este resultado, juntamente com os demais obtidos neste trabalho, ganha um peso adicional por tratar da replicação do HIV-1 em macrófagos, células que exercem um papel-chave na imunopatogénese da infecção pelo HIV-1 por sua peculiar capacidade de produzir grandes quantidades de vírions sem sofrer efeito citopático. Esta característica lhes confere a possibilidade de servir como reservatórios virais, mantendo o vírus abrigado no organismo contra as ações do sistema imune e das drogas da terapia antiretroviral, representando com isso uma formidável barreira para a completa erradicação da infecção pelo HIV-1 do organismo (Stevenson, 2003). Portanto, são cada vez mais necessários esforços que visem um melhor entendimento das nuances que montam o cenário da interação entre o HIV-1 e o macrófago. É justamente neste contexto que o NGF parece se incluir, dado a sua capacidade de influenciar de diversas maneiras o ciclo replicativo do HIV-1 em uma célula crítica para a evolução da história natural e clínica da AIDS.

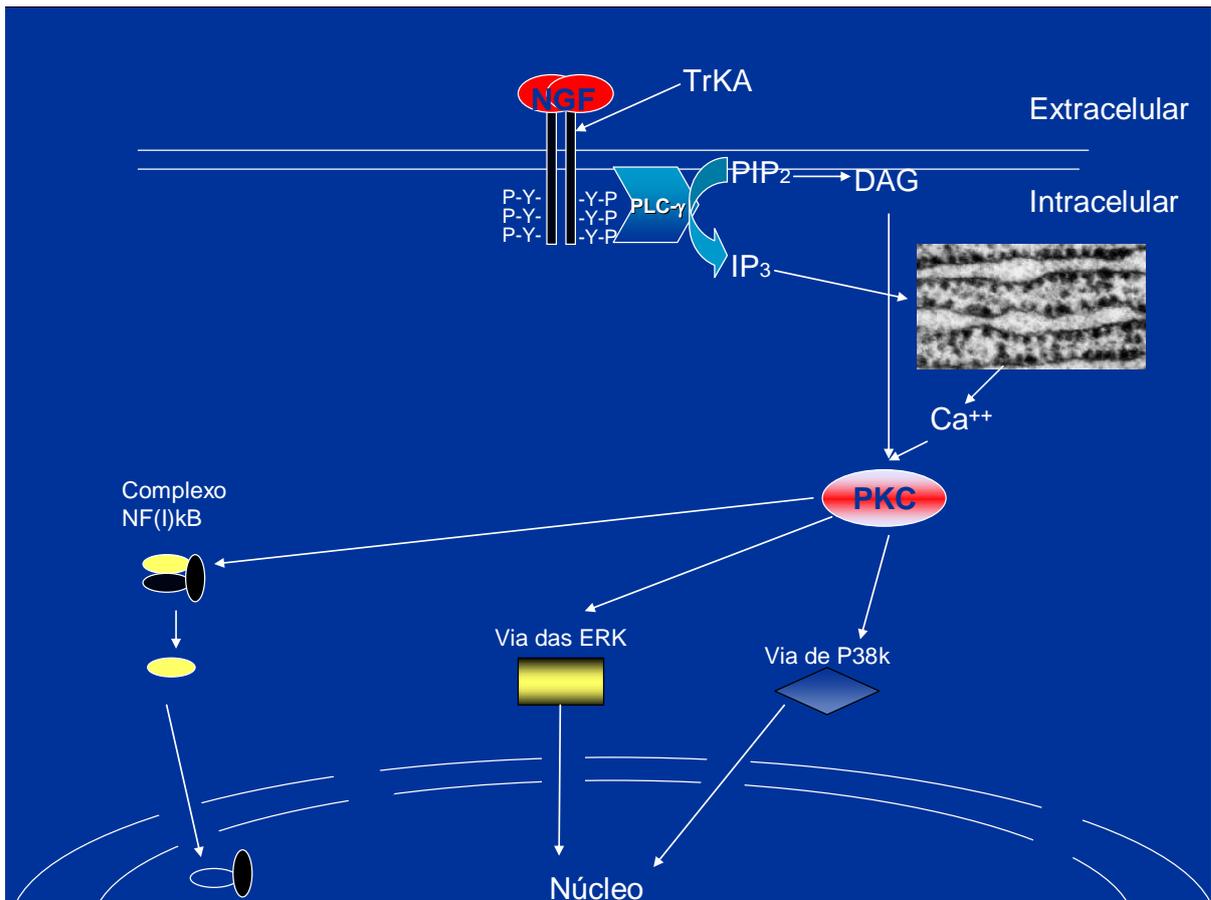


Figura 22 – Via de sinalização envolvida com o efeito de NGF. Proposta de via de sinalização disparada pelo NGF envolvida com o aumento da replicação do HIV-1 em macrófagos humanos infectados *in vitro*.

## 6. Conclusões e Perspectivas

De maneira geral, o corpo de resultados apresentados nesta dissertação nos permite concluir que:

- O NGF tem a propriedade de estimular a replicação do HIV-1 em macrófagos primários humanos infectados *in vitro*.

- O efeito mediado pelo NGF na replicação do HIV-1 aparentemente não se deve ao favorecimento de passos pré-integração no ciclo replicativo do vírus, como *binding* ou entrada.

- O efeito mediado pelo NGF na replicação do HIV-1 provavelmente também decorra da ativação da transcrição pró-viral.

- A ação de NGF na replicação do HIV-1 requer a participação do receptor de alta afinidade TrkA, a mobilização de íons cálcio contidos no retículo endoplasmático, além da ativação de PLC, PKC, p38K, ERK e NFκB.

- O efeito do NGF na replicação do HIV-1 pode ser devido a uma diminuição da síntese do fator de restrição endógeno APOBEC3G.

E como perspectivas em curto prazo para a continuação desse estudo, podemos citar:

- A análise por multiplex da modulação causada pelo NGF na produção de citocinas classicamente descritas como importantes na regulação da replicação do HIV-1.

- Confirmação dos dados de integração pró-viral por PCR em tempo real.

- Confirmação da regulação negativa do APOBEC3G por PCR em tempo real.

- Aumentar o número de amostras da quantificação do efeito do NGF na transcrição viral do HIV-1 por *real-time* PCR.

- Realização de ensaio funcional, utilizando uma cepa viral deficiente da proteína acessória Vif, a fim de definirmos a real importância da regulação negativa da proteína APOBEC3G no efeito na replicação do HIV-1 mediado pelo NGF.
- Sequenciamento do genoma do HIV-1 a partir de cDNA obtido de vírus produzidos por macrófagos tratados com NGF, e quantificações de hipermutações C/G→T/A.

## 7. Referências Bibliográficas

Alfano M, Poli G. Role of cytokines and chemokines in the regulation of innate immunity and HIV infection. *Mol Immunol*. 2005 Feb;42(2):161-82.

Alfano M, Crotti A, Vicenzi E, Poli G. New players in cytokine control of HIV infection. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2008 Feb;5(1):27-32.

Andreasson PA, Dias F, Naucner A, Andersson S, Biberfeld G. A prospective study of vertical transmission of HIV-2 in Bissau, Guinea-Bissau. *Aids*. 1993 Jul;7(7):989-93.

Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol*. 2008 Jan;214(2):231-41.

Arts EJ, Wainberg MA. Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and early events in reverse transcription. *Adv Virus Res*. 1996;46:97-163.

Bachis A, Major EO, Mocchetti I. Brain-derived neurotrophic factor inhibits human immunodeficiency virus-1/gp120-mediated cerebellar granule cell death by preventing gp120 internalization. *J Neurosci*. 2003 Jul 2;23(13):5715-22.

Bahbouhi B, Landay A, Al-Harthi L. Dynamics of cytokine expression in HIV productively infected primary CD4+ T cells. *Blood*. 2004 Jun 15;103(12):4581-7.

Barbacid M. Nerve growth factor: a tale of two receptors. *Oncogene*. 1993 Aug;8(8):2033-42.

Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983 May 20;220(4599):868-71.

Bello G, Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Guimaraes ML, Chequer-Fernandez SL, Teixeira SL, et al. Demographic history of HIV-1 subtypes B and F in Brazil. *Infect Genet Evol*. 2007 Mar;7(2):263-70.

Bergonzini V, Delbue S, Wang JY, Reiss K, Prisco M, Amini S, et al. HIV-Tat promotes cellular proliferation and inhibits NGF-induced differentiation through mechanisms involving Id1 regulation. *Oncogene*. 2004 Oct 7;23(46):7701-11.

Bischoff SC, Dahinden CA. Effect of nerve growth factor on the release of inflammatory mediators by mature human basophils. *Blood*. 1992 May 15;79(10):2662-9.

Bjerre B, Bjorklund A, Mobley W, Rosengren E. Short- and long-term effects of nerve growth factor on the sympathetic nervous system in the adult mouse. *Brain Res*. 1975 Aug 29;94(2):263-77.

Bonini S, Rasi G, Bracci-Laudiero ML, Procoli A, Aloe L. Nerve growth factor: neurotrophin or cytokine? *Int Arch Allergy Immunol*. 2003 Jun;131(2):80-4.

Breen EC. Pro- and anti-inflammatory cytokines in human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *Pharmacol Ther*. 2002 Sep;95(3):295-304.

Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*. 2006 Dec;12(12):1365-71.

Briggs JA, Grunewald K, Glass B, Forster F, Krausslich HG, Fuller SD. The mechanism of HIV-1 core assembly: insights from three-dimensional reconstructions of authentic virions. *Structure*. 2006 Jan;14(1):15-20.

Brodie C, Gelfand EW. Functional nerve growth factor receptors on human B lymphocytes. Interaction with IL-2. *J Immunol*. 1992 Jun 1;148(11):3492-7.

Brown A, Zhang H, Lopez P, Pardo CA, Gartner S. In vitro modeling of the HIV-macrophage reservoir. *J Leukoc Biol*. 2006 Nov;80(5):1127-35.

Calcaterra S, Cappiello G, Di Caro A, Garbuglia AR, Benedetto A. Comparative analysis of total and integrated HIV-1 DNA in peripheral CD4 lymphocytes and monocytes after long treatment with HAART. *J Infect*. 2001 Nov;43(4):239-45.

Caroleo MC, Costa N, Bracci-Laudiero L, Aloe L. Human monocyte/macrophages activate by exposure to LPS overexpress NGF and NGF receptors. *J Neuroimmunol.* 2001 Feb 15;113(2):193-201.

Cassol E, Cassetta L, Rizzi C, Alfano M, Poli G. M1 and M2a polarization of human monocyte-derived macrophages inhibits HIV-1 replication by distinct mechanisms. *J Immunol.* 2009 May 15;182(10):6237-46.

Chao W, Olson MS. Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem J.* 1993 Jun 15;292 ( Pt 3):617-29.

Chehimi J, Starr SE, Frank I, D'Andrea A, Ma X, MacGregor RR, et al. Impaired interleukin 12 production in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Exp Med.* 1994 Apr 1;179(4):1361-6.

Chehimi J, Ma X, Chouaib S, Zyad A, Nagashunmugam T, Wojcik L, et al. Differential production of interleukin 10 during human immunodeficiency virus infection. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1996 Aug 10;12(12):1141-9.

Chiu YL, Soros VB, Kreisberg JF, Stopak K, Yonemoto W, Greene WC. Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nature.* 2005 May 5;435(7038):108-14.

Cirne-Santos CC, Teixeira VL, Castello-Branco LR, Frugulhetti IC, Bou-Habib DC. Inhibition of HIV-1 replication in human primary cells by a dolabellane diterpene isolated from the marine algae *Dictyota paffii*. *Planta Med.* 2006 Mar;72(4):295-9.

Clary DO, Reichardt LF. An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Nov 8;91(23):11133-7.

Clerici M, Balotta C, Meroni L, Ferrario E, Riva C, Trabattoni D, et al. Type 1 cytokine production and low prevalence of viral isolation correlate with long-term nonprogression in HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1996 Jul 20;12(11):1053-61.

Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*. 1995 Dec 15;270(5243):1811-5.

Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, et al. Human immunodeficiency viruses. *Science*. 1986 May 9;232(4751):697.

Coffin JM, Hughes SH, Varmus H. *Retroviruses*. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.

Cohen J. HIV. Escape artist par excellence. *Science*. 2003 Mar 7;299(5612):1505-8.

Cohen S, Levi-Montalcini R, Hamburger V. A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcom as 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1954 Oct;40(10):1014-8.

Covaceuszach S, Cassetta A, Cattaneo A, Lamba D. Purification, crystallization, X-ray diffraction analysis and phasing of a Fab fragment of monoclonal neuroantibody alphaD11 against nerve growth factor. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2004 Jul;60(Pt 7):1323-7.

Creery D, Weiss W, Graziani-Bowering G, Kumar R, Aziz Z, Angel JB, et al. Differential regulation of CXCR4 and CCR5 expression by interleukin (IL)-4 and IL-13 is associated with inhibition of chemotaxis and human immunodeficiency Virus (HIV) type 1 replication but not HIV entry into human monocytes. *Viral Immunol*. 2006 Summer;19(3):409-23.

Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*. 1984 Dec 20-1985 Jan 2;312(5996):763-7.

Darbinian-Sarkissian N, Czernik M, Peruzzi F, Gordon J, Rappaport J, Reiss K, et al. Dysregulation of NGF-signaling and Egr-1 expression by Tat in neuronal cell culture. *J Cell Physiol*. 2006 Sep;208(3):506-15.

Darbinian N, Darbinyan A, Czernik M, Peruzzi F, Khalili K, Reiss K, et al. HIV-1 Tat inhibits NGF-induced Egr-1 transcriptional activity and consequent p35 expression in neural cells. *J Cell Physiol.* 2008 Jul;216(1):128-34.

Davies AM. The role of neurotrophins in the developing nervous system. *J Neurobiol.* 1994 Nov;25(11):1334-48.

Dean DH, Hiramoto RN, Ghanta VK. Modulation of immune response. A possible role for murine salivary epidermal and nerve growth factors. *J Periodontol.* 1987 Jul;58(7):498-500.

Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science.* 1996 Sep 27;273(5283):1856-62.

Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature.* 1996 Jun 20;381(6584):661-6.

DeVico AL, Gallo RC. Control of HIV-1 infection by soluble factors of the immune response. *Nat Rev Microbiol.* 2004 May;2(5):401-13.

Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature.* 1996 Jun 20;381(6584):667-73.

Duh EJ, Maury WJ, Folks TM, Fauci AS, Rabson AB. Tumor necrosis factor alpha activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF-kappa B sites in the long terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Aug;86(15):5974-8.

Dybul M FA. Immunology of HIV infection in: *Fundamental Immunology*. In: Paul WE, editor. *Fundamental Immunology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincot-Raven Publishers; 2003. p. 1285-318.

Ehrhard PB, Erb P, Graumann U, Otten U. Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase Trk in activated CD4-positive T-cell clones. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993a Dec 1;90(23):10984-8.

Ehrhard PB, Ganter U, Stalder A, Bauer J, Otten U. Expression of functional trk protooncogene in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993b Jun 15;90(12):5423-7.

Ehrhard PB, Erb P, Graumann U, Schmutz B, Otten U. Expression of functional trk tyrosine kinase receptors after T cell activation. *J Immunol*. 1994 Mar 15;152(6):2705-9.

Embretson J, Zupancic M, Ribas JL, Burke A, Racz P, Tenner-Racz K, et al. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature*. 1993 Mar 25;362(6418):359-62.

Ensoli F, Ensoli B, Thiele CJ. HIV-1 gene expression and replication in neuronal and glial cell lines with immature phenotype: effects of nerve growth factor. *Virology*. 1994 May 1;200(2):668-76.

Fakruddin JM, Lempicki RA, Gorelick RJ, Yang J, Adelsberger JW, Garcia-Pineres AJ, et al. Noninfectious papilloma virus-like particles inhibit HIV-1 replication: implications for immune control of HIV-1 infection by IL-27. *Blood*. 2007 Mar 1;109(5):1841-9.

Fauci AS. HIV and AIDS: 20 years of science. *Nat Med*. 2003 Jul;9(7):839-43.

Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*. 1996 May 10;272(5263):872-7.

Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Griffin DE. *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.

Finkel TH, Tudor-Williams G, Banda NK, Cotton MF, Curiel T, Monks C, et al. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nat Med.* 1995 Feb;1(2):129-34.

Frankel AD, Young JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:1-25.

Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science.* 1984 May 4;224(4648):500-3.

Garaci E, Caroleo MC, Aloe L, Aquaro S, Piacentini M, Costa N, et al. Nerve growth factor is an autocrine factor essential for the survival of macrophages infected with HIV. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Nov 23;96(24):14013-8.

Geleziunas R, Xu W, Takeda K, Ichijo H, Greene WC. HIV-1 Nef inhibits ASK1-dependent death signalling providing a potential mechanism for protecting the infected host cell. *Nature.* 2001 Apr 12;410(6830):834-8.

Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *The New England journal of medicine.* 1981 Dec 10;305(24):1425-31.

Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976 Jul;73(7):2424-8.

Greene WC, Peterlin BM. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med.* 2002 Jul;8(7):673-80.

Groot F, van Capel TM, Kapsenberg ML, Berkhout B, de Jong EC. Opposing roles of blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in HIV-1 infection of T cells: transmission facilitation versus replication inhibition. *Blood.* 2006 Sep 15;108(6):1957-64.

Haase AT. Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts. *Nat Rev Immunol.* 2005 Oct;5(10):783-92.

Harris RS, Liddament MT. Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat Rev Immunol.* 2004 Nov;4(11):868-77.

Hasegawa A, Liu H, Ling B, Borda JT, Alvarez X, Sugimoto C, et al. The level of monocyte turnover predicts disease progression in the macaque model of AIDS. *Blood.* 2009 Apr 21.

Hattori A, Tanaka E, Murase K, Ishida N, Chatani Y, Tsujimoto M, et al. Tumor necrosis factor stimulates the synthesis and secretion of biologically active nerve growth factor in non-neuronal cells. *J Biol Chem.* 1993 Feb 5;268(4):2577-82.

Hope TJ. Viral RNA export. *Chem Biol.* 1997 May;4(5):335-44.

Hottiger M, Hubscher U. Human Immunodeficiency Virus type 1 reverse transcriptase. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1996 Feb;377(2):97-120.

Igarashi T, Brown CR, Endo Y, Buckler-White A, Plishka R, Bischofberger N, et al. Macrophage are the principal reservoir and sustain high virus loads in rhesus macaques after the depletion of CD4+ T cells by a highly pathogenic simian immunodeficiency virus/HIV type 1 chimera (SHIV): Implications for HIV-1 infections of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jan 16;98(2):658-63.

Ito M, Baba M, Sato A, Hirabayashi K, Tanabe F, Shigeta S, et al. Tumor necrosis factor enhances replication of human immunodeficiency virus (HIV) in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989 Jan 16;158(1):307-12.

Kanki PJ, Travers KU, S MB, Hsieh CC, Marlink RG, Gueye NA, et al. Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. *Lancet.* 1994 Apr 16;343(8903):943-6.

Kimata H, Yoshida A, Ishioka C, Kusunoki T, Hosoi S, Mikawa H. Nerve growth factor specifically induces human IgG4 production. *Eur J Immunol.* 1991 Jan;21(1):137-41.

Kinoshita SM, Taguchi S. NF-IL6 (C/EBPbeta) induces HIV-1 replication by inhibiting cytidine deaminase APOBEC3G. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 30;105(39):15022-7.

Klatzmann D, Barre-Sinoussi F, Nugeyre MT, Danquet C, Vilmer E, Griscelli C, et al. Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes. *Science*. 1984 Jul 6;225(4657):59-63.

Kumar R, Vandegraaff N, Mundy L, Burrell CJ, Li P. Evaluation of PCR-based methods for the quantitation of integrated HIV-1 DNA. *J Virol Methods*. 2002 Sep;105(2):233-46.

Lacasse C, Rola-Pleszczynski M. Immune regulation by platelet-activating factor: II. Mediation of suppression by cytokine-stimulated endothelial cells in vitro. *J Leukoc Biol*. 1991 Mar;49(3):245-52.

Levi-Montalcini R, Hamburger V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool*. 1951 Mar;116(2):321-61.

Levi-Montalcini R. The nerve growth factor: thirty-five years later. *EMBO J*. 1987 May;6(5):1145-54.

Levi-Montalcini R, Dal Toso R, della Valle F, Skaper SD, Leon A. Update of the NGF saga. *J Neurol Sci*. 1995 Jun;130(2):119-27.

Lima RG, Van Weyenbergh J, Saraiva EM, Barral-Netto M, Galvao-Castro B, Bou-Habib DC. The replication of human immunodeficiency virus type 1 in macrophages is enhanced after phagocytosis of apoptotic cells. *J Infect Dis*. 2002 Jun 1;185(11):1561-6.

Lindholm D, Heumann R, Meyer M, Thoenen H. Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature*. 1987 Dec 17-23;330(6149):658-9.

Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*. 1996 Aug 9;86(3):367-77.

MacNeil A, Sarr AD, Sankale JL, Meloni ST, Mboup S, Kanki P. Direct evidence of lower viral replication rates in vivo in human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infection than in HIV-1 infection. *J Virol*. 2007 May;81(10):5325-30.

Mangino G, Percario ZA, Fiorucci G, Vaccari G, Manrique S, Romeo G, et al. In vitro treatment of human monocytes/macrophages with myristoylated recombinant Nef of human immunodeficiency virus type 1 leads to the activation of mitogen-activated protein kinases, I $\kappa$ B kinases, and interferon regulatory factor 3 and to the release of beta interferon. *J Virol*. 2007 Mar;81(6):2777-91.

Marin M, Rose KM, Kozak SL, Kabat D. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med*. 2003 Nov;9(11):1398-403.

Matsuda H, Coughlin MD, Bienenstock J, Denburg JA. Nerve growth factor promotes human hemopoietic colony growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Sep;85(17):6508-12.

Meier A, Alter G, Frahm N, Sidhu H, Li B, Bagchi A, et al. MyD88-dependent immune activation mediated by human immunodeficiency virus type 1-encoded Toll-like receptor ligands. *J Virol*. 2007 Aug;81(15):8180-91.

Meyaard L, Otto SA, Jonker RR, Mijster MJ, Keet RP, Miedema F. Programmed death of T cells in HIV-1 infection. *Science*. 1992 Jul 10;257(5067):217-9.

Micera A, Lambiase A, Stampachiacchiere B, Bonini S, Bonini S, Levi-Schaffer F. Nerve growth factor and tissue repair remodeling: trkA(NGFR) and p75(NTR), two receptors one fate. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007 Jun-Aug;18(3-4):245-56.

Miller FD, Kaplan DR. Life and death decisions: a biological role for the p75 neurotrophin receptor. *Cell Death Differ*. 1998 May;5(5):343-5.

Miyoshi I, Kubonishi I, Yoshimoto S, Akagi T, Ohtsuki Y, Shiraishi Y, et al. Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells. *Nature*. 1981 Dec 24;294(5843):770-1.

Montagnier L. Historical essay. A history of HIV discovery. *Science (New York, NY)*. 2002 Nov 29;298(5599):1727-8.

Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*. 2008 Jan 24;451(7177):425-30.

Nykjaer A, Willnow TE, Petersen CM. p75<sup>NTR</sup>--live or let die. *Curr Opin Neurobiol*. 2005 Feb;15(1):49-57.

Orenstein JM, Meltzer MS, Phipps T, Gendelman HE. Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-1-treated human monocytes: an ultrastructural study. *J Virol*. 1988 Aug;62(8):2578-86.

Otten U, Baumann JB, Girard J. Stimulation of the pituitary-adrenocortical axis by nerve growth factor. *Nature*. 1979 Nov 22;282(5737):413-4.

Otten U, Ehrhard P, Peck R. Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Dec;86(24):10059-63.

Otten U, Scully JL, Ehrhard PB, Gadiant RA. Neurotrophins: signals between the nervous and immune systems. *Prog Brain Res*. 1994;103:293-305.

Pandrea I, Silvestri G, Onanga R, Veazey RS, Marx PA, Hirsch V, et al. Simian immunodeficiency viruses replication dynamics in African non-human primate hosts: common patterns and species-specific differences. *J Med Primatol*. 2006 Aug;35(4-5):194-201.

Pasternak AO, Adema KW, Bakker M, Jurriaans S, Berkhout B, Cornelissen M, et al. Highly sensitive methods based on seminested real-time reverse transcription-PCR for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 unspliced and multiply spliced RNA and proviral DNA. *J Clin Microbiol*. 2008 Jul;46(7):2206-11.

Peng G, Greenwell-Wild T, Nares S, Jin W, Lei KJ, Rangel ZG, et al. Myeloid differentiation and susceptibility to HIV-1 are linked to APOBEC3 expression. *Blood*. 2007 Jul 1;110(1):393-400.

Peterlin BM, Trono D. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol*. 2003 Feb;3(2):97-107.

Picker LJ, Watkins DI. HIV pathogenesis: the first cut is the deepest. *Nat Immunol*. 2005 May;6(5):430-2.

Picker LJ. Immunopathogenesis of acute AIDS virus infection. *Curr Opin Immunol*. 2006 Aug;18(4):399-405.

Poulsen AG, Aaby P, Larsen O, Jensen H, Naucler A, Lisse IM, et al. 9-year HIV-2-associated mortality in an urban community in Bissau, west Africa. *Lancet*. 1997 Mar 29;349(9056):911-4.

Rao P, Hsu KC, Chao MV. Upregulation of NF-kappa B-dependent gene expression mediated by the p75 tumor necrosis factor receptor. *J Interferon Cytokine Res*. 1995 Feb;15(2):171-7.

Raposo G, Moore M, Innes D, Leijendekker R, Leigh-Brown A, Benaroch P, et al. Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic*. 2002 Oct;3(10):718-29.

Recio JA, Aranda A. Activation of the HIV-1 long terminal repeat by nerve growth factor. *J Biol Chem*. 1997 Oct 24;272(43):26807-10.

Requejo HI. Worldwide molecular epidemiology of HIV. *Revista de saude publica*. 2006 Apr;40(2):331-45.

Roux-Lombard P, Modoux C, Cruchaud A, Dayer JM. Purified blood monocytes from HIV 1-infected patients produce high levels of TNF alpha and IL-1. *Clin Immunol Immunopathol*. 1989 Mar;50(3):374-84.

Rowland-Jones SL, Whittle HC. Out of Africa: what can we learn from HIV-2 about protective immunity to HIV-1? *Nat Immunol*. 2007 Apr;8(4):329-31.

Samah B, Porcheray F, Dereuddre-Bosquet N, Gras G. Nerve growth factor stimulation promotes CXCL-12 attraction of monocytes but decreases human immunodeficiency virus replication in attracted population. *J Neurovirol*. 2009 Jan;15(1):71-80.

Sarngadharan MG, Popovic M, Bruch L, Schupbach J, Gallo RC. Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. *Science*. 1984 May 4;224(4648):506-8.

Schupbach J, Popovic M, Gildea RV, Gonda MA, Sarngadharan MG, Gallo RC. Serological analysis of a subgroup of human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS. *Science*. 1984 May 4;224(4648):503-5.

Sheehy AM, Gaddis NC, Malim MH. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med*. 2003 Nov;9(11):1404-7.

Simon V, Ho DD, Abdool Karim Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet*. 2006 Aug 5;368(9534):489-504.

Sonza S, Mutimer HP, O'Brien K, Ellery P, Howard JL, Axelrod JH, et al. Selectively reduced tat mRNA heralds the decline in productive human immunodeficiency virus type 1 infection in monocyte-derived macrophages. *J Virol*. 2002 Dec;76(24):12611-21.

Soros VB, Greene WC. APOBEC3G and HIV-1: strike and counterstrike. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2007 Feb;4(1):3-9.

Stahl RE, Friedman-Kien A, Dubin R, Marmor M, Zolla-Pazner S. Immunologic abnormalities in homosexual men. Relationship to Kaposi's sarcoma. *Am J Med*. 1982 Aug;73(2):171-8.

Steiner P, Pfeilschifter J, Boeckh C, Radeke H, Otten U. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha synergistically stimulate nerve growth factor synthesis in rat mesangial cells. *Am J Physiol.* 1991 Nov;261(5 Pt 2):F792-8.

Steinman RM, Granelli-Piperno A, Pope M, Trumpheller C, Ignatius R, Arrode G, et al. The interaction of immunodeficiency viruses with dendritic cells. *Current topics in microbiology and immunology.* 2003;276:1-30.

Sterneck E, Johnson PF. CCAAT/enhancer binding protein beta is a neuronal transcriptional regulator activated by nerve growth factor receptor signaling. *J Neurochem.* 1998 Jun;70(6):2424-33.

Stevenson M. HIV-1 pathogenesis. *Nat Med.* 2003 Jul;9(7):853-60.

Sundstrom JB, Ellis JE, Hair GA, Kirshenbaum AS, Metcalfe DD, Yi H, et al. Human tissue mast cells are an inducible reservoir of persistent HIV infection. *Blood.* 2007 Jun 15;109(12):5293-300.

Swingler S, Morris A, Easton A. Tumour necrosis factor alpha and interleukin-1 beta induce specific subunits of NFkB to bind the HIV-1 enhancer: characterisation of transcription factors controlling human immunodeficiency virus type 1 gene expression in neural cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Aug 30;203(1):623-30.

Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med.* 2008 Apr 10;358(15):1590-602.

Thoenen H. The changing scene of neurotrophic factors. *Trends Neurosci.* 1991 May;14(5):165-70.

Thorpe LW, Perez-Polo JR. The influence of nerve growth factor on the in vitro proliferative response of rat spleen lymphocytes. *J Neurosci Res.* 1987;18(1):134-9.

Thorpe LW, Werrbach-Perez K, Perez-Polo JR. Effects of nerve growth factor on the expression of interleukin-2 receptors on cultured human lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 1987;496:310-1.

Titanji K, Nilsson A, Morch C, Samuelsson A, Sonnerborg A, Grutzmeier S, et al. Low frequency of plasma nerve-growth factor detection is associated with death of memory B lymphocytes in HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol.* 2003 May;132(2):297-303.

Torcia M, Bracci-Laudiero L, Lucibello M, Nencioni L, Labardi D, Rubartelli A, et al. Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell.* 1996 May 3;85(3):345-56.

Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *Journal of molecular biology.* 1999 Jan 8;285(1):1-32.

UNAIDS. AIDS Epidemic Update: World Health Organization (WHO)

2008.

van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2003 Sep;3(9):697-709.

Vicenzi E, Biswas P, Mengozzi M, Poli G. Role of pro-inflammatory cytokines and beta-chemokines in controlling HIV replication. *J Leukoc Biol.* 1997 Jul;62(1):34-40.

Wahl SM, Greenwell-Wild T, Peng G, Ma G, Orenstein JM, Vazquez N. Viral and host cofactors facilitate HIV-1 replication in macrophages. *J Leukoc Biol.* 2003 Nov;74(5):726-35.

Wahl SM, Greenwell-Wild T, Vazquez N. HIV accomplices and adversaries in macrophage infection. *J Leukoc Biol.* 2006 Nov;80(5):973-83.

Weiss CD, Levy JA, White JM. Oligomeric organization of gp120 on infectious human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol.* 1990 Nov;64(11):5674-7.

Welman M, Lemay G, Cohen EA. Role of envelope processing and gp41 membrane spanning domain in the formation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) fusion-competent envelope glycoprotein complex. *Virus Res.* 2007 Mar;124(1-2):103-12.

Weskamp G, Otten U. An enzyme-linked immunoassay for nerve growth factor (NGF): a tool for studying regulatory mechanisms involved in NGF production in brain and in peripheral tissues. *J Neurochem.* 1987 Jun;48(6):1779-86.

Wong K, Sharma A, Awasthi S, Matlock EF, Rogers L, Van Lint C, et al. HIV-1 Tat interactions with p300 and PCAF transcriptional coactivators inhibit histone acetylation and neurotrophin signaling through CREB. *J Biol Chem.* 2005 Mar 11;280(10):9390-9.

## 8. Anexos

8.1 Artigos científicos publicados durante a realização do mestrado sem relação com a dissertação.

8.1.1- Characterization of HIV-1 enzyme reverse transcriptase inhibition by the compound 6-Chloro-1,4-Dihydro-4-Oxo-1-( $\beta$ -D-Ribofuranosyl) Quinoline-3-Carboxylic acid through kinetic and *in silico* studies.

Current HIV Research, 2009, 7, 000-000

1

### Characterization of HIV-1 Enzyme Reverse Transcriptase Inhibition by the Compound 6-Chloro-1,4-Dihydro-4-Oxo-1-( $\beta$ -D-Ribofuranosyl) Quinoline-3-Carboxylic Acid Through Kinetic and *In Silico* Studies

Thiago Moreno L. Souza<sup>\*1</sup>, Diego Q. Rodrigues<sup>2</sup>, Vitor F. Ferreira<sup>3</sup>, Isakelly Pereira Marques<sup>3</sup>, Maria Cecília Bastos Vieira de Souza<sup>3</sup>, Izabel Chistina de Palmer Paixão Frugulhetti<sup>4</sup>, Dumith Chequer Bou-Habib<sup>2</sup> and Carlos Frederico L. Fontes<sup>\*5</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Virus Respiratórios e do Sarampo, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

<sup>2</sup>Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; <sup>3</sup>Laboratório de Nucleosídeos, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brazil; <sup>4</sup>Laboratório de Virologia Molecular, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brazil; <sup>5</sup>Laboratório de Estrutura e Regulação de Proteínas, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

**Abstract:** We recently described that the chloroquinolinic ribonucleoside 6-chloro-1,4-dihydro-4-oxo-1-( $\beta$ -D-ribofuranosyl) quinoline-3-carboxylic acid (compound **A**) inhibits the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) enzyme reverse transcriptase (RT), and its replication in primary cells. Based on these findings, we performed kinetic studies to investigate the mode of inhibition of compound **A** and its aglycan analog (compound **B**). We found that both molecules inhibited RT activity independently of the template/primer used. Nevertheless, compound **A** was 10-fold more potent than compound **B**. Compound **A** inhibited the RNA-dependent DNA polymerase (RDDP) activity of RT with an uncompetitive and a noncompetitive mode of action with respect to dTTP incorporation and to template/primer (TP) uptake, respectively. The kinetic pattern of the inhibition displayed by compound **A** was probably due to its greater affinity for the ternary complex (RT-TP-dNTP) than the enzyme alone or the binary complex (RT-TP). Besides, by means of molecular modeling, we show that compound **A** bound on the NNRTI binding pocket of RT. However, our molecule targets such a site by making novel interactions with the enzyme RT, when compared to NNRTIs. These include a hydrogen bridge between the 2'-OH of our compound and the Tyr675 of the enzyme RT's chain B. Therefore, compound **A** is able to synergize with both a NRTI (AZT-TP) and a NNRTI (efavirenz). Taken together, our results suggest that compound **A** displays a novel mechanism of action, which may be different from classical NRTIs and NNRTIs.

**Keywords:** AIDS, HIV-1, reverse transcriptase, chloroquinolinic acid.

#### 1. INTRODUCTION

The reverse transcriptase (RT) is a critical enzyme for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication, the etiological agent of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). The enzyme RT is a heterodimer composed of two subunits, p66 (66 kDa) and p51 (51 kDa). RT belongs to the family of type B DNA polymerases [1] and is a multifunctional enzyme able to catalyze RNA-dependent DNA polymerase (RDDP), DNA-dependent DNA polymerase (DDDP), and RNase H activities [2,3]. The combination of these different catalytic activities is required to convert the viral genomic RNA into a double-stranded cDNA [4,5]. In order to perform these reactions, RT follows a high standardized sequence of reactions: initially, free RT binds

to the template-primer (TP), forming a binary complex (RT-TP); next, this complex binds to the incoming deoxynucleotides (dNTP), forming a ternary complex (RT-TP-dNTP) [6,7].

Antiretroviral agents that target RT are categorized as nucleoside/nucleotide RT inhibitors (NRTIs) and as nonnucleoside RT inhibitors (NNRTIs). The NRTIs, after following phosphorylation steps, bind the binary complex and act as chain terminators, being therefore competitive inhibitors of the dNTP incorporation [8]. The NNRTIs, on the other hand, are noncompetitive inhibitors of RT, because they interact with the allosteric site at the palm region of the RT [9]. Due to this interaction, NNRTIs might target any catalytic form of the RT [6].

In order to control HIV-1 replication and clinical progress to AIDS, diverse classes of antiretrovirals can be employed, and the enzyme RT is aimed by most of these drugs. Several problems are associated with the long-term use of antiretroviral agents, such as metabolic disorders and emergence of drug-resistant viruses [10-12]. Regarding the emergence of multi-resistant strains of HIV-1, mutations in the amino acid sequence of RT may emerge due to selective pressure of the antiretroviral drugs, allowing HIV-1 virions to escape from the therapeutic regime [11].

\*Address correspondence to these authors at the (TMLS) Laboratório de Virus respiratórios e do Sarampo, Laboratório de Referência Nacional e da OMS para Influenza e Vírus Exantemáticas, Pavilhão Helio e Peggy Pereira, sala B105, Rua Leopoldo Bulhões 1480, Mangueiras, Rio de Janeiro, RJ 21041-210, Brazil; Tel: +55 21 2562-1801; E-mail: tmoreno@ioc.fiocruz.br, (CFLF) Laboratório de Estrutura e Regulação de Proteínas, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rua César Pimenta, 400, Bloco H-2 sala 026, Prédio do CCS, Cidade Universitária Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil; Tel: 55-21-2562-6784 E-mail: cfontes@bioqmed.ufrj.br

Together, these observations motivate the search for novel molecules endowed either with new mechanisms of action and/or with the ability inhibit multi-resistant strains of HIV-1 [13]. Since we have previously described that the chloroquinolinic compound 6-chloro-1,4-dihydro-4-oxo-1-( $\beta$ -D-ribofuranosyl) quinoline-3-carboxylic acid (compound **A**; Fig. 1) inhibits HIV-1 replication in primary cells by targeting the enzyme RT [14], we decided to further analyze its effects towards the inhibition of this enzyme. Here, we report, by means of kinetic assays, that compound **A** probably presents a novel mechanism of RT inhibition, different from that of the classical NRTIs and NNRTIs. Our molecule blocked the RT catalysis by an uncompetitive mechanism of action, with respect to dTTP incorporation, and targeted preferentially the ternary complex of this enzyme. Although this compound aimed the NNRTIs binding pocket of RT, it seems to use different amino acid residues for its docking, when compared to the NNRTI efavirenz (EFZ). Another feature of our molecule is its ability to synergize with NRTI and NNRTI compounds in a cell-free based assay.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Reagents

The compound **A** (Fig. 1) was synthesized as previously described [15]. The NRTI 3'-azido-3'-deoxythymidine 5'-triphosphate (AZT-TP) was from Sierra Bioresearch (Tucson, AZ). The NNRTIs nevirapine (NVP) and efavirenz were kindly donated by Dr. Nubia Boechat (Department of Organic Synthesis, Farmanguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). The negative control acyclovir triphosphate (ACV-TP) was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The recombinant HIV-1 enzyme reverse transcriptase was obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program, NIAID, NIH: Reverse Transcriptase from the University of Alabama at Birmingham, Center for AIDS Research, Gene Expression Core Facility. The template-primers were purchased from Amersham Pharmacia, Biotech, Inc., Piscataway, NJ).

### 2.2. Effect of Compound **A** on the Activity of the HIV-1 Enzyme RT

The inhibitory effect of compound **A** on RDDP activity of RT was evaluated using a solution containing 25 mM

Tris-HCl (pH 7.8), 75 mM KCl, 8 mM MgCl<sub>2</sub> and 2 mM DTT at final volume of 25  $\mu$ L (buffer A). To analyze the dTTP incorporation, saturating concentrations of poly(rA)o(dT)<sub>12-18</sub> (100 nM) and various concentrations of dTTP (ranging from 0 – 30  $\mu$ M) were added to buffer A. Inversely, to analyze the TP uptake, a saturating concentration of dTTP (60  $\mu$ M) and various concentrations of poly(rA)o(dT)<sub>12-18</sub> (ranging from 0 – 100 nM) were added to buffer A. The isotopic dilutions were performed with the ratio of 2  $\mu$ Ci [<sup>3</sup>H]dTTP (49 Ci/mmol) / 2.7  $\mu$ M dTTP, and all reactions were performed according steady-state kinetics by using 3 U (equivalent to 50 nM) of recombinant HIV-1 RT (1U is defined as the amount of enzyme necessary to catalyze 1 pmol of radiolabeled dTTP per min per mg of enzyme) at 37°C for 30 min. Reactions were stopped by the addition of 10  $\mu$ L of 0.5 M EDTA and the entire volume was filtered through Whatman DE81 filters to collect the new synthesized strand of DNA. Then, filters were washed three times with sodium phosphate (100 mM), and incorporated nucleotides were measured by liquid scintillation counting (Packard, model TRI-CARB 2100 TR, Downers Grove, IL, USA). The  $K_m$  and  $V_{max}$  values were calculated by Lineweaver-Burk plot and the  $K_{cat}$  by dividing the  $V_{max}$  by the amount of total RT used.

Alternatively, we used different template/primers, poly(rC)o(dG) or denaturated salmon sperm DNA. For the first primer, we followed the methodology described above substituting the cold and radio-labeled substrate dTTP for dGTP. On the other hand, to measure the DDDP activity of RT, 12.5  $\mu$ g/mL of salmon sperm DNA were employed in a reaction mixture composed of 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT, 0.5  $\mu$ g/mL bovine serum albumin, 100  $\mu$ M of each nucleotide (dATP, dGTP, dCTP and [<sup>3</sup>H]-dTTP—0.5  $\mu$ Ci/nmol), and 3 U/mL of the enzyme RT. These reaction mixtures were incubated with the test compound at 37 °C for 30 min, and the reaction was stopped by the addition of 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA). The resulting radioactive DNAs were adsorbed onto GF/C fiberglass membranes (Whatman) and counted by liquid scintillation.

### 2.3. Evaluation of the Effect of Compound **A** on Different Catalytic Forms of RT

To evaluate the affinity of compound **A** towards different catalytic forms of RT, 3 U of enzyme was diluted in buffer A

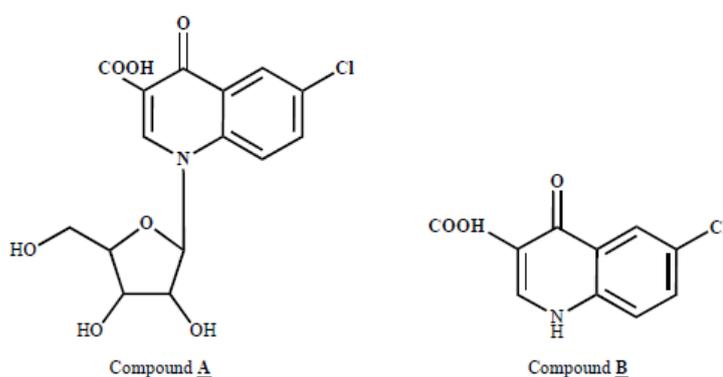


Fig. (1). Chemical structure of compound **A** (6-chloro-1,4-dihydro-4-oxo-1-( $\beta$ -D-ribofuranosyl) quinoline-3-carboxylic acid) and compound **B** (6-chloro-1,4-dihydro-4-oxo-1H-quinoline-3-carboxylic acid).

containing various concentrations of compound **A**. This mixture was incubated with different concentrations of TP and dTTP to study interactions between our molecule with the free enzyme, with the binary or with the ternary complexes [6]. In summary, the free enzyme is the major catalytic form of RT in reaction mixtures with low concentration of TP (1 nM) and with high concentration of dTTP (60  $\mu$ M). The binary complex is the major structure when preparations were incubated with high concentration of TP (100 nM) and with low concentration of dTTP (0.5  $\mu$ M). The ternary complex is induced when high concentrations of both TP (100 nM) and dTTP (60  $\mu$ M) are used. All data were plotted according to Dixon's model using equation (1) for uncompetitive inhibitors [16]. For comparison, the obtained  $K_d$  values with equation (1) were also calculated for efavirenz and nevirapine using the same formula.

$$V_0 = [V_m/[K_m/[S]] + (1 + [I]/K_d)] \quad (1)$$

#### 2.4. Kinetic Studies of the Combination of Compound **A** with Other RT Inhibitors

To analyze a possible synergy between compound **A** with a NRTI (AZT-TP) or a NNRTI (efavirenz), kinetic assays were performed according to interaction index described by Greco *et al.* [17]. Briefly, dose-response curves of compound **A** alone or in combination with either AZT-TP or efavirenz were performed in buffer A with 60  $\mu$ M dTTP and 100 nM of TP. These reactions were assumed to follow Hill's model for cooperativity and were generated by fitting the experimental data to the equation (2):

$$E = [E_{con}([I]/D_{50})^m]/[1 + (D_{50}/[I])^m] \quad (2)$$

where  $E$  is the enzyme activity in percentage, and  $E_{con}$  means the absolute control activity in the absence of the inhibitor. Effective inhibitor concentrations at different fractional inhibition levels were measured from the parameters  $D_{50}$ ,  $[EI]_{con}$  and  $m$ . The  $D_{50}$  represents the median effective dose of a given drug or of a combination in constant ratio (equivalent to the  $IC_{50}$  of this drug or combination); the  $[EI]_{con}$  parameter means the absolute enzyme activity in the presence of a given concentration of the inhibitor; and the  $m$  corresponds to the slope for a given drug or for a combination of molecules in a constant ratio. These three last kinetic parameters were measured according to the equation (3):

$$Dx = D_{50} [E/(E_{con} - E)]^{1/m} \quad (3)$$

where  $Dx$  refers to the dose of drug giving a particular percent inhibition. The equation (4) was used to measure combinatory efficiency:

$$I = (D_1/D_{x1}) + (D_2/D_{x2}) \quad (4)$$

where  $I$  represents the combinatory efficiency,  $D_1$  and  $D_2$  are the concentrations of the drugs in combination, and  $D_{x1}$  and  $D_{x2}$  mean the predicted inhibitory concentration of each drug. Giving the observed effect of the combination  $D_1/D_2$ ,  $I < 1$ ,  $I > 1$  or  $I$  equal to 1 indicate synergy, antagonism, or additive effects, respectively.

#### 2.5. Alignment of Genetically Diverse Polymerases and *In Silico* Docking of Compound **A**

In order to compare the relevance of RT residues for resistance to compound **A** with its equivalent amino acids on both HSV-1 DNA polymerase and human alpha-DNA po-

lymerase, we made alignments using ClustalW. We have chosen to align the sequence of the human  $\alpha$ -DNA polymerase (NCBI code, AAA16459), the HSV-1 DNA polymerase (NCBI code, BAB64293) and the RT (NCBI code, NP\_789739) using the ClustalW feature of the CLC Free Workbench Version 4.0.

To perform the docking studies, we used the crystal structure of the wild-type RT 1FK9 (Protein Data Bank, PDB). We selected the file 1FK9 because it already has an EFZ molecule bound on the crystal structure of the enzyme RT. Thus, the area occupied by amino acid residues involved in the docking of EFZ was considered the actual NNRTIs bind site (see Appendix). In order to perform *in silico* docking, we used the software ArgusLab 4.0 (Planaria Software LLC), which allows the docking of multiple compounds without interference of one molecule on others. Therefore, as a control, we bound a virtual EFZ to the 1FK9 file. We observed only a small difference (0.5 angstroms) between the EFZ already bound in the crystal structure and the virtual EFZ. After that, we used the set up parameters to perform the same sort of assays with compound **A**.

### 3. RESULTS

#### 3.1. Effects of Chloroquinolinic Analogs on RT Activity

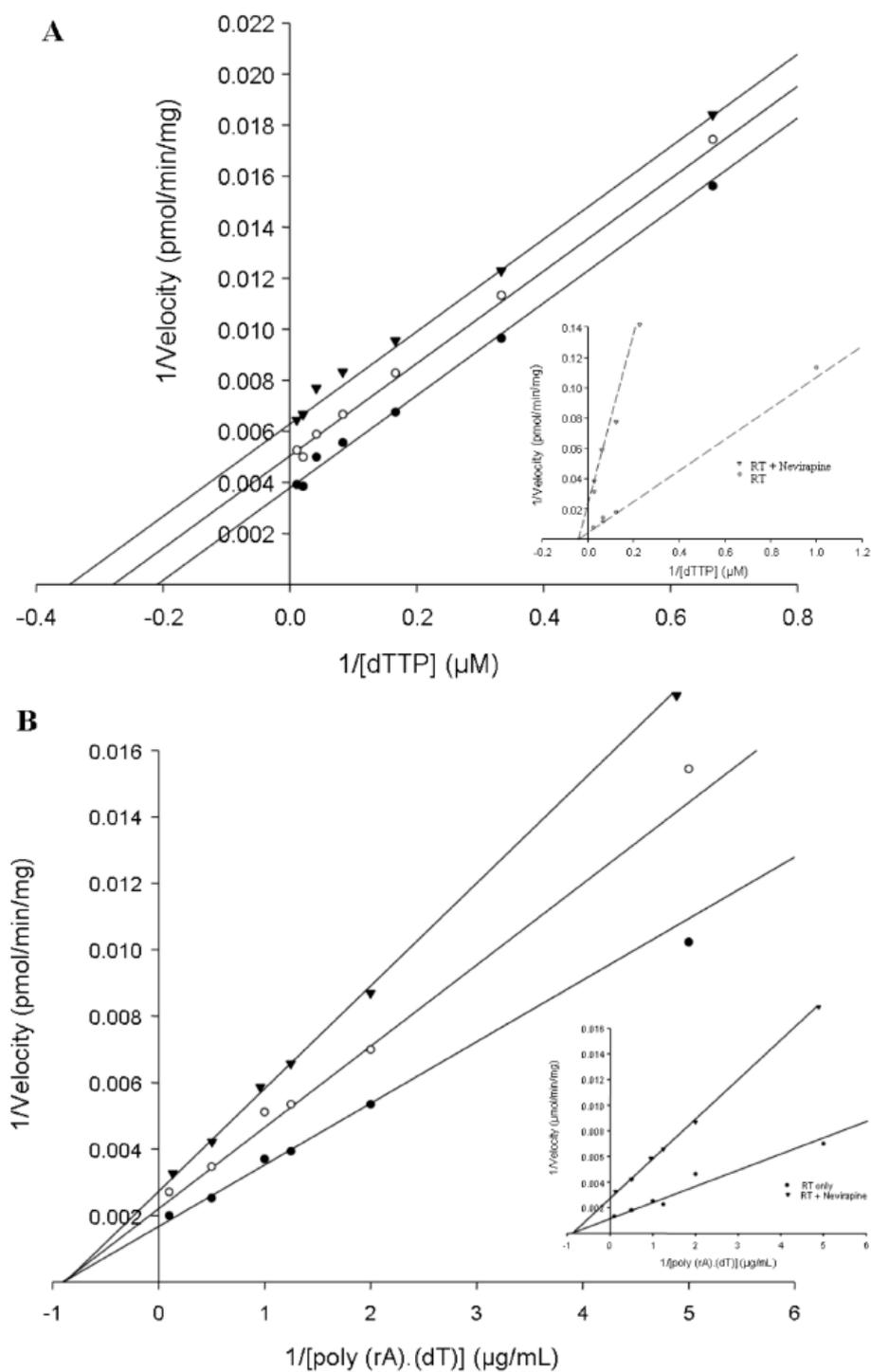
We have previously reported that the compound 6-chloro-1,4-dihydro-4-oxo-1-( $\beta$ -D-ribofuranosyl) quinoline-3-carboxylic acid (compound **A**) inhibits HIV-1 replication by targeting the enzyme RT [14]. Here, to further investigate compound **A**'s mode of inhibition, we compared the effects of this molecule, and its aglycan analog (compound **B**), towards RT using different template/primers. As we can see in Table 1, the  $K_i$ s for compound **A** were comparable to those observed for nevirapine (NVP). On the other hand, compound **A**'s  $K_i$ s were higher than those seen for AZT-TP and efavirenz (EFZ) [14]. Interestingly, compound **A** was ten-fold more potent in inhibiting RT activity than compound **B**, showing that the ribosyl moiety contributes to the compound **A** activity. Differently from AZT-TP, but similar to NVP and EFZ, both compounds, **A** and **B**, inhibited RT activity independently of the template/primer used (Table 1), indicating that our molecules do not compete with a specific nucleotide and that they inhibit both RDDP and DDDP activities of RT at similar concentrations range. As a negative control, we used ACV-TP and, as expected, we observed no inhibition of the enzyme RT.

**Table 1.** Effects of Compounds **A** and **B** on the Activity of the HIV-1 Enzyme RT Using Different Template/Primers

Inhibitor	$K_i$ ( $\mu$ M)		
	Poly(rA)o(dT)	Poly(rC)o(dG)	Sperm Salmon DNA
Compound <b>A</b>	0.5 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.5 $\pm$ 0.01	0.7 $\pm$ 0.04
Compound <b>B</b>	5 $\pm$ 0.3	5.3 $\pm$ 0.1	6.2 $\pm$ 0.7
AZT-TP	0.01 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>	NE	NE
NVP	0.5 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.3 $\pm$ 0.01	0.37 $\pm$ 0.03
EFZ	0.01 $\pm$ 0.02	0.01 $\pm$ 0.003	0.02 $\pm$ 0.001
ACV-TP	>20	>20	>20

NE - Not evaluated.

<sup>a</sup> These values were withdrawn from our previous publication (Souza *et al.*, 2008).



**Fig. (2).** Effect of compound **A** on kinetic parameters of HIV-1 enzyme RT. The enzyme RT was incubated in the absence of compound **A** ( $\bullet$ ), or with five-fold the  $K_i$  ( $2.5 \mu\text{M}$ ;  $\circ$ ) or with ten-fold the  $K_i$  ( $5 \mu\text{M}$ ;  $\blacktriangledown$ ) for this molecule. Data were analyzed with respect to dTTP (A) or template-primer incorporation (B), according to Materials and Methods. Data represent the average of five independent experiments, and the lineweaver-burk plots were generated by SigmaPlot 8.0. The insets (A and B) show the effect of nevirapine on the same kinetic parameters.

Table 2. Kinetic Parameters of dTTP Incorporation and Template/Primer Uptake of RT Upon Compound **A** Treatment

Conditions	dTTP Incorporation			
	K <sub>m</sub> (μM)	V <sub>max</sub> (pmol/min)	K <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	K <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub>
RT	5.8 ± 0.7	320 ± 2.4	106 ± 0.8	18.28
RT + compound <b>A</b> <sup>b</sup>	2.3 ± 0.2	187 ± 5.3	62 ± 0.6	27
Conditions	Template/Primer Uptake			
	K <sub>m</sub> (nM)	V <sub>max</sub> (pmol/min)	K <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	K <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub>
RT	13 ± 0.2	667.8 ± 2.2	51.36 ± 0.7	3.95
RT + compound <b>A</b> <sup>b</sup>	17 ± 0.4	334.4 ± 4.3	19.67 ± 0.4	1.15

<sup>b</sup> These values were obtained with compound **A** at concentration of 2.5 μM.

### 3.2. Effects of Compound **A** on RT dTTP Incorporation and Template/Primer Uptake

Since both compounds (**A** and **B**) inhibited RT activity using different template/primers and, considering that compound **A** was more potent than compound **B** in inhibiting RT activity, we focused our studies on the effects of compound **A** with respect to dTTP incorporation and template/primer [poly(rA)o(dT)] uptake. Compound **A** presented a potent dose-dependent inhibition of dTTP incorporation (Fig. 2A) and template/primer uptake (Fig. 2B). Differently from nevirapine, which is a noncompetitive inhibitor with respect to both substrates (Fig. 2, insets), compound **A** inhibited the dTTP incorporation and TP uptake with an uncompetitive and noncompetitive mode of action, respectively. Table 2 also shows the information mentioned in this last sentence. It is also possible to see (Table 2) that the catalytic efficiency (K<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>) of RT diminished due to compound **A** treatment with respect to TP uptake. On the other hand, this efficiency increased when the dTTP incorporation was analyzed, because the decrease of the K<sub>m</sub> values, presumed in the uncompetitive mode of action, produces such an artifact. However, the decrease in the catalytic efficiency with respect to TP uptake becomes clear after the treatment with compound **A**.

Together, these data suggest that compound **A** targets preferentially the complex enzyme-substrate (ES) of our kinetic assays. Considering that the enzyme RT binds firstly to the TP and then to the dTTP [6] and, taking into account that better inhibitions were achieved with high concentrations of dTTP or TP, we might be able to suggest that our molecule shall target the RT in its ternary complex (TR-TP-dTTP), blocking, thereafter, the product formation [6].

### 3.3. Effects of Compound **A** on RT Dissociation Constants

Since our data suggest that compound **A** targets the ternary complex, we decided to further investigate this issue. Therefore, we applied Dixon plots to RT incubations with different concentrations of template/primer and dTTP. The generated graphics were used to calculate the K<sub>d</sub> values for compound **A** towards the catalytic forms of RT [6]. We can observe that compound **A** targets the free enzyme and the

binary complex with similar affinities, i.e. K<sub>d</sub> (RT) ≅ K<sub>d</sub> (RT-TP) (Table 3). Importantly, compound **A**'s affinity for the ternary complex is over 5-fold higher than those observed for the RT alone or RT-TP complex [K<sub>d</sub> (RT) ≅ K<sub>d</sub> (RT-TP) > K<sub>d</sub> (RT-TP-dNTP)] (Table 3). The compound **A**'s K<sub>d</sub> value for the ternary complex and its K<sub>i</sub> showed good correlation (Tables 1 and 3), suggesting that the conversion of RT-TP-dNTP complex into product might be the main event inhibited by compound **A**. The comparison of these results with those obtained with efavirenz and nevirapine (Table 3) shows that compound **A** may act differently from these inhibitors, at the kinetic level. For example, nevirapine has the same affinity for the three catalytic forms of RT [K<sub>d</sub> (RT) ≅ K<sub>d</sub> (RT-TP) ≅ K<sub>d</sub> (RT-TP-dNTP)], whereas efavirenz affinity gradually increases due to binding of TP and dTTP to the enzyme RT [K<sub>d</sub> (RT) > K<sub>d</sub> (RT-TP) > K<sub>d</sub> (RT-TP-dNTP)] (Table 3).

Table 3. Dissociation Constant of the Different Catalytic Forms of RT with Compound **A**

Drugs	K <sub>d</sub> Values for RT (nM)		
	RT	RT-TP	RT-TP-dTTP
Compound <b>A</b>	2500 ± 280	2000 ± 160	497 ± 63
EFZ	170 ± 13	30 ± 8	4 ± 0.7
NVP	400 ± 10	401 ± 9	398 ± 21

### 3.4. In Silico Docking of Compound **A** on RT Structure

Although the mechanism of action of compound **A** seems to be unique at the kinetic level, it closely resembles the NNRTIs effects [14]. Besides that, we have published a low-degree of cross-resistance between compound **A** and clinically available NNRTIs [14]. Thus, we performed *in silico* studies with our compound, or with EFZ, towards the crystal structure of RT (file 1FK9 from PDB) (Fig. 3A), using the NNRTIs binding pocket as the main target of compound **A** on the wild-type RT structure (Fig. 3B). As we can see in Fig. (3C, D) compound **A** (pink colored) and EFZ (yellow colored) showed a small overlap between their structures. This was observed when molecules were presented as stick

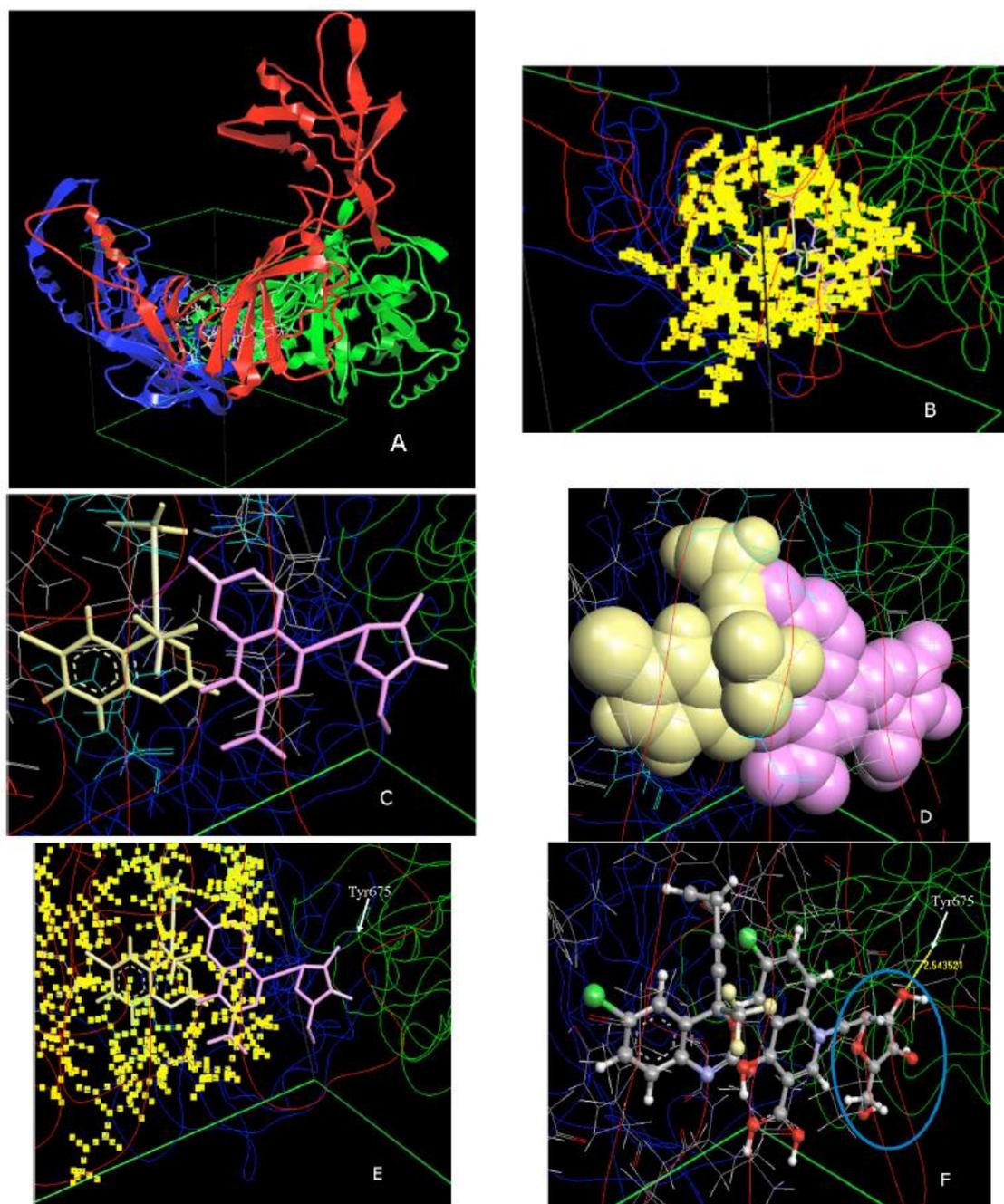


Fig. (3). In silico analysis of compound **A** bound to the HIV-1 enzyme RT. Using the crystal structure of RT and the ARGUSLAB 4.0 software, we made *in silico* studies. The crystal structure of RT 1FK9 (A) and the selected NNRTIs binding pocket (B) were used to dock compound **A**. Efavirenz and compound **A** are displayed in yellow and pink, respectively. We can observe these molecules within the NNRTIs binding site as stick structures (C) or by their Van der Waals radius (D). From another angle we can observe EFZ camouflaged within NNRTIs binding site and the ribosyl moiety of compound **A** spiked towards the other region of RT allosteric site (E). In panel F, the colored atoms of the reference and tested molecules reveal the interaction of the ribosyl moiety of compound **A** (circulated in blue) with the Tyr 675 of the chain B of the enzyme RT (white) by a hydrogen bond (yellow). The number next to the hydrogen bond represents the distance in angstroms between the compound **A** and Tyr 675.

structures (Fig. 3C) or by their Van der Waals radius (Fig. 3D). This result suggests that classical NNRTIs and compound **A** might target the same allosteric region of RT, but they may be sorted by different amino acid residues during their docking. Intriguingly, when we highlighted the amino acid residues involved in the NNRTIs binding pocket (Fig. 3E), we noticed that the ribosyl moiety of compound **A** spiked towards the outer region of the NNRTIs binding site, suggesting a possible explanation for the difference in potency between compounds **A** and **B**. In order to better highlight the importance of this ribosyl moiety in the structure of compound **A**, we colored differently each radical of the analyzed compounds (Fig. 3F). We can observe that the 2'-OH of the compound **A** interacts, by a hydrogen bond, with Tyr 675, an amino acid residue of the chain B of the enzyme RT (also noted as Tyr 115 of subunit p51 of the enzyme RT).

### 3.5. Comparison of Compound **A** Effects Towards Genetically Different Polymerases

Viral and some cellular eukariotic DNA polymerases belong to the family of Type B polymerases [1]. We have previously described that compound **A** is able to inhibit HSV-1 DNA polymerase, but it does not inhibit alpha DNA polymerase [18]. Thus, considering our docking and cross-resistance studies [14], we performed multiple alignments with the amino acid sequence of the enzymes RT (NP\_789739), HSV-1 polymerase (BAB64293) and alpha DNA polymerase (AAA16459). We display in Table 4 some amino acid residues of the enzyme RT, which represent the Tyr115 of the subunit p51 (as mentioned above), those studied during our cross-resistance assays [18], as well as the equivalent amino acids residues of the other polymerases. As we can notice, we studied a number of residues involved in a broad range resistance to NNRTIs [19], and saw that the RT amino acids 101 and 181 are similar in all three enzymes, residue 103 is not similar to its equivalent on the HSV-1 DNA polymerase, and 188 represents a gap, suggesting that these residues might not be critical for compound **A**'s effects. A similar conclusion can also be drawn for RT residues 103 and 188 from our previous cross-resistance assays [14]. Regarding the RT residue 106, this amino acid might be important for the antiretroviral activity of compound **A**, since a considerable degree of similarity is shared between RT and HSV-1 DNA polymerase but not with alpha-DNA pol (Table 4). Finally, RT residue 115 might be more important for compound **A** binding on RT structure than for its antiretroviral activity, since its equivalent amino acids on alpha-DNA polymerase and HSV-1 DNA polymerase are neither able to support a hydrogen bridge or possesses homology with RT (Table 4).

Table 4. Analysis of the Genetically Diverse Polymerases and the Effect of Compound **A** Towards these Enzymes

Enzyme	Amino Acid Residues						Compound <b>A</b> Ki ( $\mu$ M)
RT	101K	103K	106V	115Y	181Y	188Y	0.5
HSV	233K	235S	238A	247H	395S	GAP	0.1
Alpha	122K	124A	127T	136S	221T	GAP	6.0

### 3.6. Compound **A** Showed Synergistic Effects with AZT-TP and Efavirenz

Since both, at kinetic and structural levels, compound **A** seems to inhibit the enzyme RT in a different manner than NRTIs and NNRTIs, we performed combination studies to evaluate possible synergistic effects between compound **A** and reference antiretroviral agents. Comparison of the observed  $D_{50}$  values with the corresponding  $D1$  and  $D2$  values showed an apparent 4- to 10-fold increase in the potency of compound **A** when combined with efavirenz or AZT-TP (Table 5). These data indicate that combined treatments employing compound **A** is able to produce strong synergistic effects with a NRTI and a NNRTI.

Table 5. Calculated Interactions Parameters for Combinations of Compound **A**, AZT-TP and Efavirenz

Drug(s)	$D_{50}$ (nM)	$d_1$ (nM)	$d_2$ (nM)	$d_1 + d_2$ (nM)
Comp A	$18 \pm 3$	NA	NA	NA
AZT-TP	$21 \pm 2$	NA	NA	NA
Enfavirenz	$13 \pm 1$	NA	NA	NA
Comp A + AZT-TP	NA	$3.6 \pm 0.04$	$2.2 \pm 0.05$	5.8
Comp A + Enf	NA	$3.1 \pm 0.30$	$4.0 \pm 0.03$	7.1

NA - Not applicable.

## 4. DISCUSSION

We have previously described that the chloroquinolinic compound 6-chloro-1,4-dihydro-4-oxo-1-( $\beta$ -D-ribofuranosyl) quinoline-3-carboxylic acid (compound **A**) inhibits the replication of HIV-1 in human primary cells [14]. The suppression of HIV-1 infection was dependent of a distinctive ability of compound **A** to inhibit the HIV-1 enzyme RT with a  $K_i$  of  $0.5 \mu$ M and, differently from the majority of nucleoside analogs, without the requirement of any prior phosphorylation. Here, we further investigated compound **A**'s mechanism of action and showed that our molecule seems to act differently from NNRTIs and NRTIs, both at kinetic and structural levels. Compound **A** targeted preferentially the enzyme RT in its ternary complex and, consequently, inhibited dTTP incorporation in an uncompetitive fashion. Compound **A** was able to synergize with the two different classes of RT inhibitor, since it targeted the allosteric site of RT in a very distinctive way.

Many compounds currently in clinical use inhibit HIV-1 replication and delay the clinical progress of the infection by targeting the HIV-1 enzyme RT, but they differ in their mechanism of action [20]. While NRTIs, such as AZT, are competitive inhibitors, NNRTIs, such as efavirenz and nevirapine, are noncompetitive inhibitors of dTTP incorporation [20,21]. We found in this report that the compound **A** inhibits both RDDP and DDDP activities of RT independently of the template/primer used. This result, together with the observation that compound **A** does not require a phosphorylation step to be active [14], suggests that our molecule possesses a mechanism of action similar to that observed for

classical NNRTIs. These observations prompted us to think that the chloroquinolinic ring of our antiretroviral is the main component of compound **A** structure endowed with anti-RT activity. Interestingly, compound **B**, which represents the aglycan form of compound **A**, was less potent in inhibiting the RDDP and DDDP activities of RT than its analog, suggesting a pivotal role of the ribosyl moiety of our compound.

In order to further investigate the kinetic behavior of compound **A**, we performed Lineweaver-Burk assays. They revealed that, differently from NRTIs and NNRTIs [22], compound **A** inhibited the enzyme RT in an uncompetitive and a noncompetitive manner with respect to dTTP incorporation and TP uptake, respectively. Once more, these changes in substrate incorporation are consistent with the mechanism of action of compounds that do not require any prior phosphorylation step to become active. Besides, when we measured the  $K_d$  values of our compound towards different catalytic forms of RT, we observed that it targeted preferentially the ternary complex. Thus, the nature of inhibition promoted by compound **A** [ $K_d(\text{RT}) \equiv K_d(\text{RT-TP}) > K_d(\text{RT-TP-dNTP})$ ] is different from that observed for nevirapine [ $K_d(\text{RT}) \equiv K_d(\text{RT-TP}) \equiv K_d(\text{RT-TP-dNTP})$ ] and for efavirenz [ $K_d(\text{RT}) > K_d(\text{RT-TP}) > K_d(\text{RT-TP-dNTP})$ ]. These results mean that compound **A** would target the fully catalytic RT enzymes and, thus, impairing the product formation.

Together, our results suggest that compound **A** effect is original at the kinetic level, especially for a nucleoside analog [6]. Therefore, and as suggested by cross-resistance assays [14], to get insight whether this rare mode of inhibition is due to a differential interaction in the NNRTI binding site, we performed *in silico* studies. Since compound **A** and other NNRTIs share a low-degree of cross-resistance [14], we choose to dock our compound in the allosteric site of the enzyme RT. We found that compound **A** binds to this allosteric site with a free binding energy, comparable to that observed for EFZ (-6 and -12 kcal/mol for compound **A** and EFZ, respectively). Importantly, since compound **A** and EFZ showed only a very small degree of overlap, they might be sorted by different amino acids in the NNRTI binding site.

Interestingly, compound **A** was not entirely inside the allosteric site of RT, since its ribose was projected towards the outer part of this region. Due to this characteristic, the 2'-OH of our compound interacted, by a hydrogen bond, with Tyr 675 of the chain B of the RT enzyme (also noted as Tyr115 of the RT subunit p51). This result might shed some light in the differences in potency observed for compounds **A** and **B**. Thus, the lack of the ribosyl moiety in the latter compound may create instability for its docking on the RT's allosteric site.

Since collectively our data suggest that compound **A** presents a novel mechanism of action at the kinetic and structural levels and, considering that we have shown that compound **A** is able to inhibit other virus polymerases [14], we decided to compare the amino acid sequence of RT, HSV-1 DNA polymerase and alpha DNA polymerase. We noticed, as suggested before [14], that amino acid 106 on the RT structure might play a key role for the antiretroviral activity of our compound. Besides that, the ability of the amino acid Tyr115 to support a hydrogen bridge is shared with its

equivalent amino acid on the alpha DNA polymerase sequence. This observation, together with the absence of p51 catalytic activity, suggests that the residue 675 might be important for anchoring compound **A**, rather than for its anti-RT effect. If this is true, it would also explain why compound **B** still inhibits the enzyme RT activity, although less efficiently. Further studies, such as making several passages of HIV-1 in presence of our compound, and the crystallization of the enzyme RT with our molecule, are in progress in our laboratories to better understand the interactions compound **A** with the enzyme RT. It is noteworthy that RT residue Tyr 115 is crucial for many relevant processes. For example, this residue, as well as 166, makes bridges between cations – such as  $\text{Mg}^{++}$  – for dNTP selection [23]. Thus, we expect that mutations that confer resistance to our compound may reduce RT fitness.

Finally, the current search for novel antiviral molecules focuses on the development of compounds endowed with novel mechanisms of action and/or able to synergize with existing antiretroviral drugs [24]. We showed that the effects compound **A** seems to be unique, both at the kinetic and structural levels. Besides, we also revealed an important synergistic effect between compound **A** and other classes of RT inhibitors in both HIV-1-infected cells [14] and in cell-free based assays. These observations strengthen our conclusion that compound **A** may be a promising formulation for future antiviral design [14,18], encouraging us to perform pharmacokinetic studies with our molecule.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (Division of AIDS, NIAID, NIH, and Dr. Stuart Le Grice) for providing the HIV-1 enzyme RT. Thanks are also due to FAPERJ for providing a PhD fellowship for TMLS (Programa nota 10). FAPERJ, CNPq and PAPES/Fiocruz are acknowledged for having provided grants for this study.

#### APPENDIX

S. No.	Ligand	Atom Type	Information
1.	(7747)	CL :	Hydrophobic
2.	(7748)	F1 :	Polar
3.	(7749)	F2 :	Polar
4.	(7750)	F3 :	Polar
5.	(7751)	O1 :	Polar
6.	(7752)	O2 :	H-bond acceptor
7.	(7753)	N :	H-bond acceptor
8.	(7754)	C1 :	Polar
9.	(7755)	C2 :	Hydrophobic
10.	(7756)	C3 :	Hydrophobic
11.	(7757)	C4 :	Hydrophobic
12.	(7758)	C5 :	Hydrophobic
13.	(7759)	C6 :	Hydrophobic
14.	(7760)	C7 :	Polar

15.	(7761)	C8 :	Hydrophobic
16.	(7762)	C9 :	Hydrophobic
17.	(7763)	C10 :	Hydrophobic
18.	(7764)	C11 :	Hydrophobic
19.	(7765)	C12 :	Hydrophobic
20.	(7766)	C13 :	Hydrophobic
21.	(7767)	C14 :	Polar
22.	(7768)	H :	atom type none
23.	(7769)	H :	atom type none
24.	(7770)	H :	atom type none
25.	(7771)	H :	atom type none
26.	(7772)	H :	atom type none
27.	(7773)	H :	atom type none

## REFERENCES

- [1] Braithwaite DK, Ito J. Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 1993; 25: 787-802.
- [2] Arts EJ, Ma J, Kleiman L, Wainberg MA. Mature reverse transcriptase (p66/p51) is responsible for low levels of viral DNA found in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Leukemia* 1994; 1: S175-S178.
- [3] Hottiger M, Hubscher U. Human Immunodeficiency Virus type 1 reverse transcriptase. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1996; 377: 97-120.
- [4] Telesnitsky A, Goff SP. Reverse transcriptase and the generation of retroviral DNA. In: Coffin JW, Hughes SH, Varmus HE, eds. *Retroviruses*. Plainview. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1997; pp 121-160.
- [5] Butler SL, Johnson EP, Bushman FD. Human immunodeficiency virus cDNA metabolism: notable stability of two-long terminal repeat circles. *J Virol* 2002; 76: 3739-47.
- [6] Maga G, Ubiali D, Salvetti R, Pregnolato M, Spadari S. Selective interaction of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase nonnucleoside inhibitor efavirenz and its thio-substituted analog with different enzyme-substrate complexes. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1186-1194.
- [7] Westby M, Nakayama G, Butler SL, Blair WS. Cell-based and biochemical screening approaches for the discovery of novel HIV-1 inhibitors. *Antiviral Res* 2005; 67: 121-140.
- [8] White KL, Margot NA, Wrinn T, Petropoulos CJ, Miller MD, Naegele LK. Molecular mechanisms of resistance to human immunodeficiency virus type 1 with reverse transcriptase mutations K65R and K65R+M184V and their effects on enzyme function and viral replication capacity. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3437-3446.
- [9] Zhou Z, Lin X, Madura JD. HIV-1 RT nonnucleoside inhibitors and their interaction with RT for antiviral drug development. *Infect Disord Drug Targets* 2006; 6: 391-413.
- [10] Richman DD. AZT resistance in isolates of HIV. *Immunodeficiency Rev* 1991; 2: 315-318.
- [11] Ren J, Esnouf RM, Hopkins AL, et al. 3'-Azido-3'-deoxythymidine drug resistance mutations in HIV-1 reverse transcriptase can induce long range conformational changes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9518-9523.
- [12] Zhang, Z, Walker M, Xu W, et al. Novel nonnucleoside inhibitors that select nucleoside inhibitor resistance mutations in human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2772-81.
- [13] De Clercq E. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs): past, present, and future. *Chem Biodivers* 2004; 1: 44-64.
- [14] Souza TML, Cirne-Santos CC, Fontes CFL, et al. The compound 6-chloro-1,4-dihydro-4-oxo-1-( $\beta$ -D-ribofuranosyl) quinoline-3-carboxylic acid inhibits HIV-1 replication by targeting the enzyme Reverse Transcriptase. *Curr HIV Res* 2008; 6: 209-217.
- [15] Matta AD, Santos CVB, Pereira HS, et al. Synthesis of Novel Nucleosides of 4-Oxoquinoline-3-Carboxylic Acid Analogues. *Heteroatom Chem* 1999; 10: 197-202.
- [16] Dixon M, Webb EC. *Enzymes*. Academic Press 1979; NY, 3rd ed.
- [17] Greco WH, Bravo G, Parsons JC. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol Rev* 1995; 47: 331-385.
- [18] Souza TML, Santos MCV, Ferreira VF, et al. Inhibition of HSV-1 replication and HSV DNA polymerase by the chloroquinolinic ribonucleoside 6-chloro-1,4-dihydro-4-oxo-1-( $\beta$ -D-ribofuranosyl) quinoline-3-carboxylic acid and its aglycone. *Antiviral Res* 2008; 77: 20-27.
- [19] Podzamczar D, Fumero E. The role of nevirapine in the treatment of HIV-1 disease. *Expert Opin Pharmacother*. 2001; 2: 2065-2078.
- [20] Castro HC, Loureiro NI, Pujol-Luz M, et al. HIV-1 reverse transcriptase: a therapeutic target in the spotlight. *Curr Med Chem* 2006; 13: 313-324.
- [21] Huang H, Chopra R, Verdine GL, Harrison SC. Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science* 1998; 27: 1669-1675.
- [22] Squires KE. An introduction to nucleoside and nucleotide analogues. *Antivir Ther* 2001; 6: 1-14.
- [23] Cases-González CE, Menéndez-Arias L. Nucleotide specificity of HIV-1 reverse transcriptases with amino acid substitutions affecting Ala-114. *Biochem J* 2005; 387: 221-229.
- [24] Vandamme AM, Van Vaerenbergh K, De Clercq E. Anti-human immunodeficiency virus drug combination strategies. *Antivir Chem Chemother*. 1998; 9: 187-203.

Received: January 14, 2009

Accepted: January 14, 2009

## 8.1.2 – Synthesis, HIV-RT inhibitory activity and SAR of 1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazole derivatives of carbohydrates.



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



European Journal of Medicinal Chemistry 44 (2009) 373–383

EUROPEAN JOURNAL OF  
MEDICINAL  
CHEMISTRY

<http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Original article

### Synthesis, HIV-RT inhibitory activity and SAR of 1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazole derivatives of carbohydrates

Fernando de C. da Silva<sup>a</sup>, Maria Cecília B.V. de Souza<sup>a</sup>, Izabel I.P. Frugulhetti<sup>b</sup>,  
Helena C. Castro<sup>b</sup>, Silmara L. de O. Souza<sup>b</sup>, Thiago Moreno L. de Souza<sup>b</sup>,  
Diego Q. Rodrigues<sup>b</sup>, Alessandra M.T. Souza<sup>a</sup>, Paula A. Abreu<sup>b</sup>,  
Fabiana Passamani<sup>c</sup>, Carlos R. Rodrigues<sup>c,\*</sup>, Vitor F. Ferreira<sup>a,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal Fluminense, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Outeiro de São João Baptista, CEP 24020-141, Niterói, RJ, Brazil

<sup>b</sup> Universidade Federal Fluminense, LABioMol, Departamento de Biologia Geral e Celular, Outeiro de São João Baptista, CEP 24020-150, Niterói, RJ, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Modelagem Molecular e QSAR (ModMolQSAR), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CEP 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Received 26 November 2007; received in revised form 25 February 2008; accepted 29 February 2008

Available online 16 March 2008

#### Abstract

This paper describes the synthesis of several 1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazoles attached to different carbohydrate templates and their *in vitro* inhibitory profile against HIV-1 reverse transcriptase. In addition a theoretical comparison of the most active compounds with other classical antivirals was also performed. Our results showed **2a**, **2d** and **2g** as the most active compounds that inhibited the HIV-1 reverse transcriptase catalytic activity with cytotoxicity lower than AZT and SI higher than DDC and DDI. The overall theoretical analysis of the molecular descriptors of **2a**, **2d** and **2g** revealed that their HOMO energy is similar to other antivirals in use (AZT, DDC, DDI and 3TC) and together with the volume may contribute for the biological profile as they may allow new interactions with the target. In fact the 1,2,3-triazole compounds presented more lipophilicity and higher molecular volume and weight than the antivirals studied, which suggested that these features might not only contribute for new interactions with the HIV-RT but also influence the specificity and consequently the low cytotoxicity profile of these compounds. Thus these data point them as promising leading compounds for generating new anti-HIV-RT compounds.

© 2008 Published by Elsevier Masson SAS.

**Keywords:** HIV-RT; 1,2,3-Triazole; Anti-HIV; Antiviral

#### 1. Introduction

Acquired immune deficiency syndrome (AIDS) is the first pandemic disease of the molecular biology era, which killed over 20 million people worldwide [1,2]. The human immunodeficiency virus (HIV) is the AIDS causative agent and its reverse transcriptase (HIV-TR) is the main target of AIDS

treatment [3,4]. This enzyme plays an essential and multifunctional role in the virus replication. It allows the transcription of HIV-single-stranded RNA genome into a DNA double helix capable of integration into host cell chromosomes [5–9].

The combination of HIV reverse transcriptase and protease inhibitors in the highly active antiretroviral therapies (HAART) against HIV infection led to a decline in morbidity and mortality [5–9]. Nonetheless, viral replication is still persisting as lymphatic system and central nervous system acts as reservoir for the virus [5], and where in some antivirals, more particularly the protease inhibitors (PIs), do not penetrate at an efficient inhibitory level [10]. In addition the emergence of drug-resistant

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author. Tel.: +55 21 26292345.

E-mail addresses: [rangel@pharma.ufrj.br](mailto:rangel@pharma.ufrj.br) (C.R. Rodrigues), [cegvito@vm.uff.br](mailto:cegvito@vm.uff.br) (V.F. Ferreira).

virus strains due to high HIV mutation rate continues to restrain the long-term clinical efficacy of these molecules [11–14] whereas side effects limit the use of some of these antivirals (*i.e.* AZT) demanding new options [14–21]. Therefore despite the advances in therapy, the progression of AIDS in HIV-positive individuals remains a major health problem in the world today.

1,2,3-Triazoles are an important class of heterocyclic compounds due to their wide range of applications as pharmaceutical agents [22]. Among the pharmaceutical uses, 1,2,3-triazoles are known as antiplatelets [23], dopamine D2 receptor ligands (related to Schizophrenia) [24],  $\beta$ -lactamase inhibitors [25], anticonvulsants [26], antimicrobials [27–29], and anti-inflammatory [30,31] agents, but the potential of this class as antivirals against HIV is poorly described in literature. Alvarez and coworkers described the series of [2,5-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)- $\beta$ -D-ribofuranosyl]-3-spiro-5'-(4'-amino- and 4'-(*N*-acetylamino)-1',2'-oxathiole 2',2'-dioxide) (TSAO) derivatives in which the pyrimidinelpurine moiety of the molecule was replaced by a 1,2,3-triazole ring with various substitutions at C-4 or C-5 [32]. These authors showed several members of this class of compounds with potent anti-HIV-1 activities, pointing the promising profile of 1,2,3-triazoles for generating leading compounds [32].

In order to identify a 1,2,3-triazole lead compound against HIV-RT, our research efforts have been directed towards the discovery of new chemical entities that are effective antivirals with low cytotoxicity. This paper describes the synthesis and *in vitro* activity against HIV-RT of several 1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazoles attached to different carbohydrate templates. A theoretical comparison of the most active 1,2,3-triazole compounds and some of the current antivirals in use was also performed.

## 2. Chemistry

The diversity of chemical structures of the 1,2,3-triazole family and their useful biological activities made these compounds attractive targets in synthetic organic chemistry. Many studies have been reported on the synthesis of the 1,2,3-triazole ring system [33–42]. The potential of this heterocycle led us to develop a synthetic route for preparing glycoconjugate-triazoles and examine their antiviral activity (Fig. 1). The syntheses of compounds **3a–g** were started by the preparation of enamines **1a–g** by the procedure previously described by us [43]. The preparation of triazoles **2a–g** was performed by the [2N + 1N] method, as early described by Arnold and our group [44–47], performing the transference of the diazo group to enamines **1a–g**.

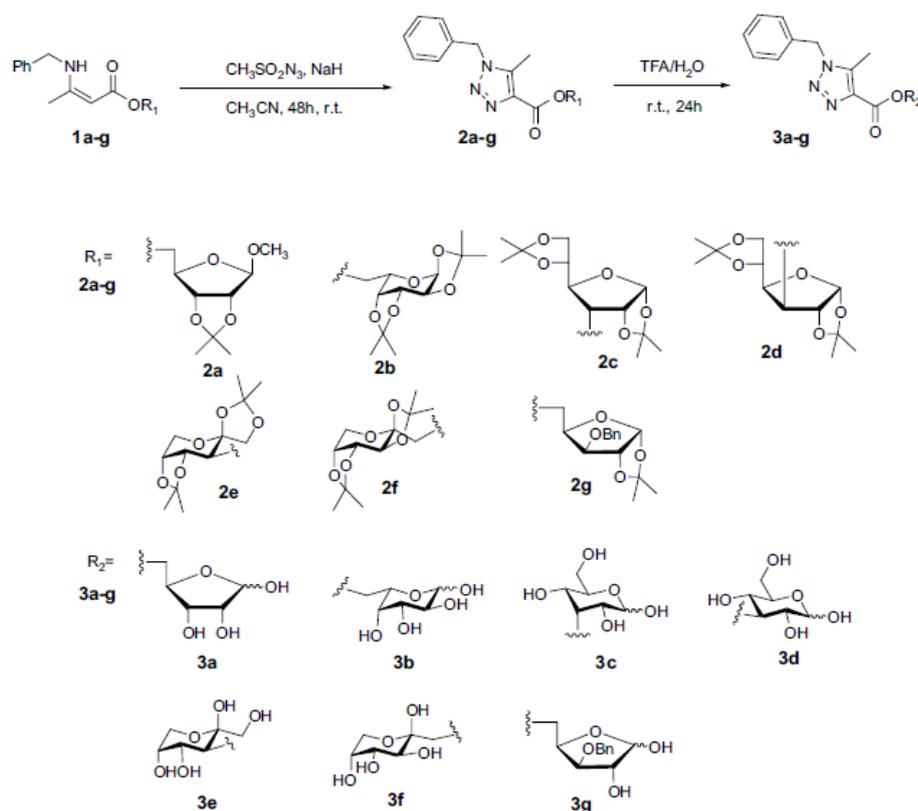


Fig. 1. Structures of 1*H*-1,2,3-Triazole derivatives **2a–g** and **3a–g**.

Thus, the isopropylidene group from carbohydrate moiety was hydrolyzed through the reaction with a solution of TFA/H<sub>2</sub>O (1:1) at room temperature during 24 h [48] producing the corresponding D-glycoconjugated 1,2,3-triazoles **3a–g** containing as carbohydrate units ribose, galactose, fructose, alose, glucose, xylose in their native form, in excellent yields (Fig. 1). Triazoles **3a–g** were obtained as a mixture of  $\alpha$  and  $\beta$  anomers for **3c** and **3f** (1,2,3-triazoles from D-glucose and D-alose, respectively, were obtained in the  $\alpha$  and  $\beta$ -pyranoside forms). All the triazoles were fully characterized by <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, IR spectroscopy and HRMS.

### 3. Pharmacology

#### 3.1. Anti-HIV-RT activity assay

The inhibitory effect of triazoles at 50  $\mu$ M or different concentrations (0.01–50  $\mu$ M) was evaluated on the HIV-RT polymerase activity using recombinant HIV-1 enzyme. The polymerization reactions (50  $\mu$ L) contained 50 mM Tris HCl (pH 7.8), 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol, 50 mM KCl, 20  $\mu$ M dTTP, 10  $\mu$ M of [<sup>3</sup>H] dTTP (47 Ci/mmol), and 150  $\mu$ g poly(rA)·oligo(dT) template primer (Pharmacia) and 1 U of enzyme. The reaction mixture was incubated at 37 °C for 30 min, and the incubation was stopped by adding ice-cold 5% trichloroacetic acid (TCA) containing 20 mM of sodium pyrophosphate. The precipitates were collected on Whatman GF/C filters and washed with sodium phosphate 0.1 M. The incorporated triphosphate was measured by assaying for <sup>3</sup>H in a liquid scintillation counter. AZT was used as antiviral control. The selective indexes were calculated based on our experimental results (1,2,3-triazole compounds and AZT) and based on literature (didanosine-DDI and zalcitabine-DDC and 3TC).

#### 3.2. Cytotoxicity assays

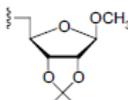
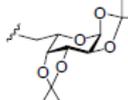
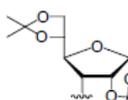
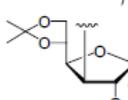
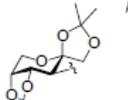
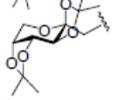
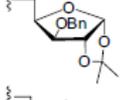
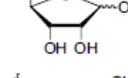
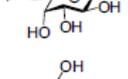
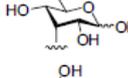
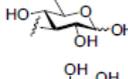
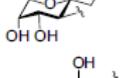
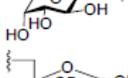
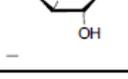
Vero cells were cultured in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS; HyClone, Logan, Utah), 100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin, at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Monolayers of about 10<sup>4</sup> Vero cells in 96-multiwell plates were treated with several concentrations of the compounds for the 72 h. Then, 50  $\mu$ l of 1 mg/mL solution of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT; Sigma) was added to evaluate cell viability according to procedures described elsewhere [49]. The 50% cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>) was calculated by linear regression analysis of the dose–response curves. All experiments were performed in duplicate at least three times.

## 4. Results

#### 4.1. Anti-HIV-RT activity

Initially all compounds were tested at 50  $\mu$ M and the results are shown in Table 1. All compounds inhibited HIV-RT to some degree and **2a–g** derivatives presented an inhibitory profile higher than compounds **3a–g**. Importantly, **2a**, **2d** and **2g** produced the highest inhibitory values (63–65%) at 50  $\mu$ M (Table 1).

Table 1  
Biological characterization of 1H-1,2,3-triazole derivatives **2a–g** and **3a–g** including anti-HIV-1-RT and cytotoxicity activities

Compound	R	Inhibition <sup>a</sup> (%)	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
<b>2a</b>		63.6	837.45
<b>2b</b>		28.8	123.42
<b>2c</b>		3.0	3529.00
<b>2d</b>		64.7	208.37
<b>2e</b>		43.5	2745.47
<b>2f</b>		47.9	3382.47
<b>2g</b>		65.4	724.06
<b>3a</b>		33.2	1172.64
<b>3b</b>		45.6	25,640.55
<b>3c</b>		14.0	1437.50
<b>3d</b>		35.9	1798.60
<b>3e</b>		45.6	648.90
<b>3f</b>		35.8	800.45
<b>3g</b>		36.2	596.00
AZT	—	94.25	126.00

<sup>a</sup> Determined at 50  $\mu$ M.

The determination of the  $IC_{50}$  of the most active compounds against HIV-RT (**2a** =  $2.2 \pm 0.8 \mu\text{M}$ , **2d** =  $5.0 \pm 0.5 \mu\text{M}$  and **2g** =  $1.98 \pm 0.4 \mu\text{M}$ ) revealed values higher than AZT, but similar to ddC (zalcitabine) and 3TC (lamivudine) and lower than ddI (didanosine) (Fig. 2).

#### 4.2. Cytotoxicity profile

In this study, we also determined the cytotoxicity profile ( $CC_{50}$ ) of the 1,2,3-triazoles (Table 1). Our experimental results of the most active compounds (**2a**, **2d** and **2g**) revealed a better cytotoxicity profile (**2a** =  $837.45 \mu\text{M}$ , **2d** =  $208.37 \mu\text{M}$  and **2g** =  $724.06 \mu\text{M}$ ) compared to AZT ( $CC_{50} = 126 \mu\text{M}$ ) (Table 1). In fact the two series **2** and **3** presented a lower cytotoxic profile than AZT ( $CC_{50} = 126 \mu\text{M}$ ) except for the **2b** compound ( $CC_{50} = 123.42 \mu\text{M}$ ) (Table 1). Interestingly, the selective index of the **2a** and **2g** was higher than DDC and DDI whereas **2d** was only higher than DDI (Fig. 2).

#### 4.3. Molecular modeling evaluation

We employed molecular modeling studies for the most active triazole derivatives in the attempt of providing useful

guidelines for the design of more potent antivirals comparing them with other antivirals currently in use. The minimum energy conformation of the most active compounds and antivirals current issue, obtained by the AM1 semiempirical method, were submitted to a Single-Point *ab initio* calculation with a 3-21G\* basis set available on SPARTAN'04 program (Wavefunction Inc. Irvine, CA, 2000). Molecular electrostatic potential maps (MEPs), HOMO and LUMO eigen values and orbital coefficients, and the molecular dipole moments were calculated. In this work, we also studied the drug score of the compounds, which are based on topological descriptors, fingerprints of molecular druglikeness, structural keys or other properties as *clog P* and molecular weight [49]. In case of osiris property explorer (<http://www.organic-chemistry.org/>), the occurrence frequency of each fragment is determined within the collection of traded drugs and within the supposedly non-druglike collection of Fluka compounds.

By comparing the three more active drugs (**2a**, **2d** and **2g**) with other antivirals (AZT, DDC, 3TC and DDI), we observed that they presented similar HOMO and LUMO energy values. In case of triazoles, HOMO and LUMO energy ranges from  $-8.67$  to  $-9.57$  and  $2.39$  to  $2.76$ , respectively, whereas the antivirals evaluated herein presented values from  $-8.37$  to

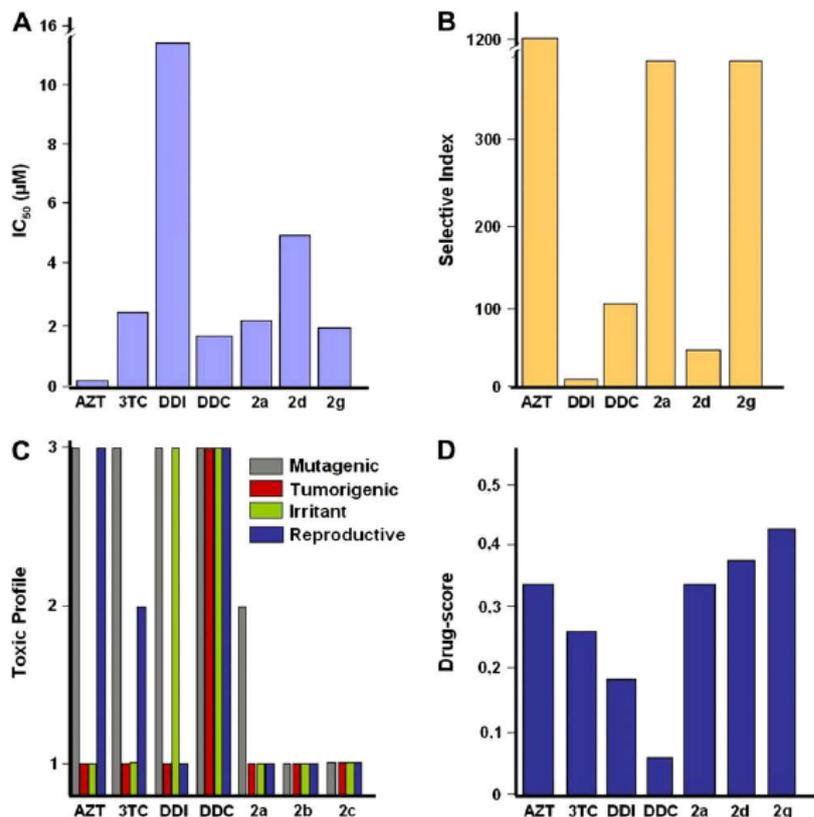


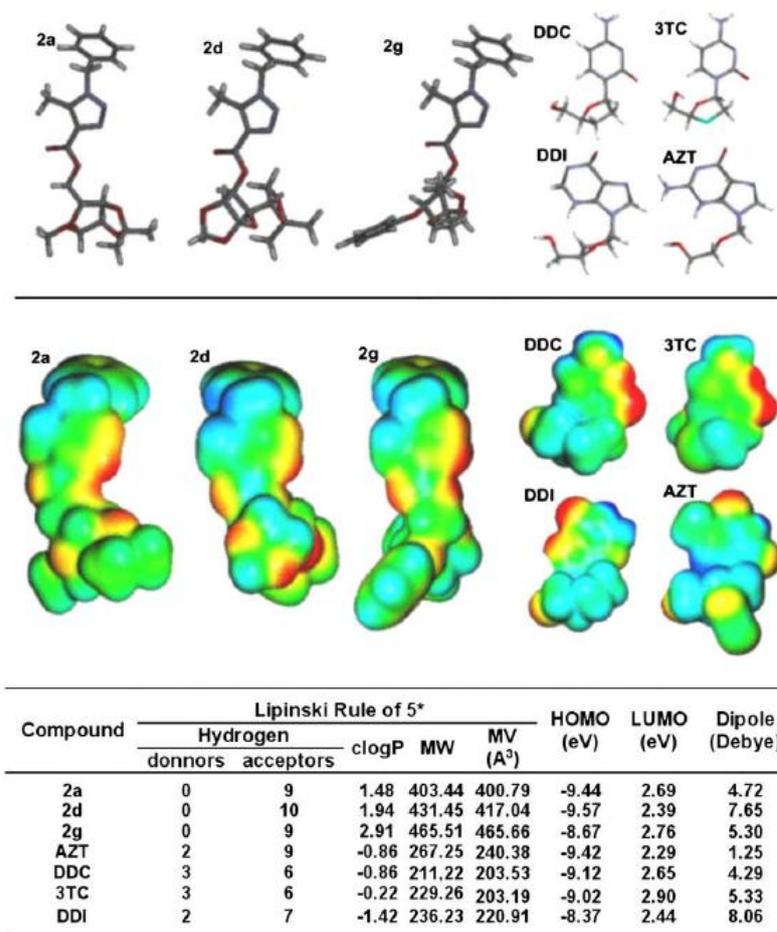
Fig. 2. Comparison of the most active 1,2,3-triazoles compounds (**2a**, **2d**, **2g**) and some anti-HIV drugs (AZT, DDC, DDI and 3TC) currently in use. Experimental  $IC_{50}$  (A), selective index (B), and theoretical toxicity risk profile and drug score calculated using Osiris program (C and D, respectively).

–9.42 and 2.29 to 2.90, respectively (Fig. 3). In contrast, the triazole derivatives presented more lipophilicity (*clog P*) and higher molecular volume (MV) and molecular weight (MW) (Fig. 3). Despite their structural differences, the electrostatic potential map of **2a**, **2d** and **2g** revealed an analogous negative charge distribution pattern in the right of the molecule, similar to DDC and 3TC (Fig. 3).

The comparison of the most active compound (**2g**) with the less active one (**2c**) showed a different distribution of the density of the orbital HOMO, which is concentrated in different moieties of their structures. In the most active compound (**2g**), HOMO is concentrated at the benzyloxy substituent from the furanose moiety, in contrast to the less active compound (**2c**) where it remains on the benzyl substituent of the triazolic moiety (Fig. 4). In addition compound **2g** also presented a higher volume (MV = 465.66 Å<sup>3</sup>) than compound **2c** (MV = 417.05 Å<sup>3</sup>) (not shown).

The three 1,2,3-triazoles (**2a**, **2d** and **2g**) were submitted to an *in silico* ADMET screening (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>) to analyze their overall drug score potential compared to the commercial antiviral drugs, AZT, DDC, 3TC and DDI. Therefore we determined for the most active compounds and antivirals currently in use: (a) all parameters for the fulfilment of Lipinski rule of 5; (b) the predicted toxicity risks (mutagenic, irritant, tumorigenic, and reproductive effects), and (c) the drug score that combines druglikeness, *clog P*, *log S*, molecular weight and toxicity risks, and theoretically may be used to evaluate the drug potential of a compound (Fig. 3).

Our results revealed that the lipophilicity (*clog P*) of these 1,2,3-triazoles is higher than that observed for commercial drugs but is not greater than 5.0, fulfilling one of the Lipinski rule of 5 [50]. The molecular weight of 1,2,3-triazole derivatives (403 < MW < 465) is greater than other drugs (211



\*Lipinski rule of 5 (number of hydrogen bond acceptors <10 and donors <5, *clogP*<5, molecular weight <500)

Fig. 3. Comparison of theoretical parameters of **2a**, **2d** and **2g** compounds and of some anti-HIV compounds currently in use. The most stable conformers, electrostatic potential maps, fulfilment of Lipinsky rule of 5 (number of hydrogen donors and acceptors, *clog P* and molecular weights – MW, molecular volumes – MV), and molecular electronic properties ( $E_{\text{HOMO}}$ ,  $E_{\text{LUMO}}$ , dipole moment).

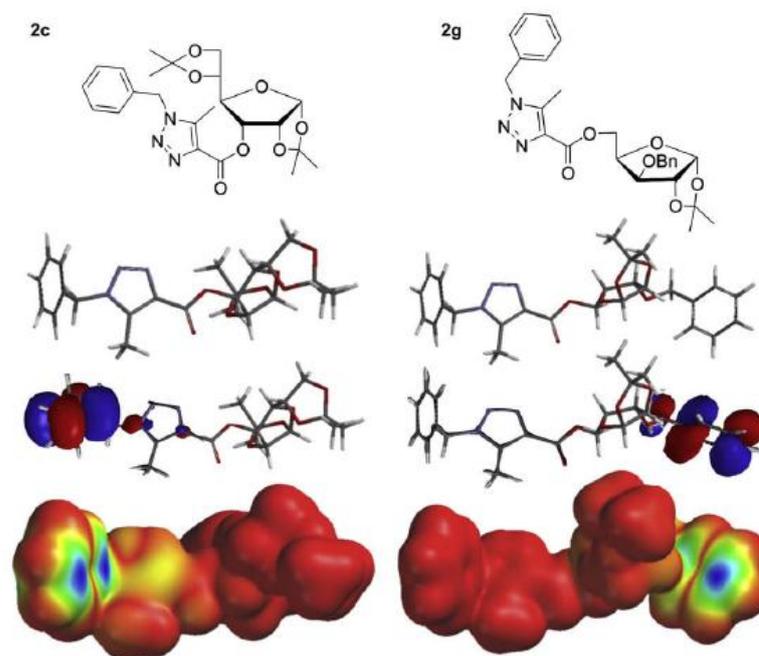


Fig. 4. Comparison of the 2D-structure, the most stable conformer, the HOMO density and the HOMO density encoded onto a van der Waals surface of 1,2,3-triazole compounds presenting the lower (2c) and the higher (2g) inhibitory profile against HIV-RT. In HOMO density encoded onto a van der Waals surface (isodensity  $0.002 \text{ e/au}^3$ ), the HOMO absolute density coefficient was mapped from deepest red (0.00) to deepest blue (0.01) (for interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

<MW > 267) but close to more than 80% of all Fluka traded drugs (MW > 450), and the number of hydrogen bond acceptors (HA) and donors (HD) are also within the Lipinski rule of 5 (HA < 10 and HD < 5 respectively) (Fig. 3).

Interestingly the 1,2,3-triazole derivatives (2a, 2d and 2g) showed equivalent or higher drug score values than the antivirals AZT, DDC, 3TC and DDI (Fig. 2). Importantly the most active derivative (2g) presented a higher value than that observed for DDC, 3TC and DDI (Fig. 2). In agreement to our cytotoxicity experimental results, our theoretical study showed 2a, 2d and 2g with a better profile for low tumorigenicity, mutagenicity and reproductive effects than the antivirals currently in use studied herein (Fig. 2).

## 5. Discussion

Two 1,2,3-triazole series were synthesized and tested against HIV-RT, a key enzyme for HIV treatment. Interestingly, all compounds inhibited HIV-RT at some degree, which reinforced the potential profile of 1,2,3-triazoles not only for those biological activities already described in the literature (*i.e.* antiplatelets [23]) but also for an antiviral profile.

Importantly, our biological data suggested that hydroxyl blockage in 2 is important for interacting with HIV-RT as these compounds were the most active molecules. The different biological profiles observed for compounds 2a, 2d and 2g

derived from acetonide carbohydrates and for analogues 3a, 3d and 3g from native carbohydrates reinforced that the protective group is an important feature for the anti-HIV activity observed.

In a promising way, the biological activity of 2a, 2d and 2g was analogous to DDC, DDI and 3TC but with a higher selective index, and a safer experimental cytotoxicity profile as their  $CC_{50}$  increased at least two-fold compared to AZT. In addition, as the two 1,2,3-triazole series (2 and 3) presented both low theoretical and experimental cytotoxic results, these data may indicate the potential safer profile of this heterocycle class compared to other groups currently in use.

The overall theoretical analysis of the molecular descriptors of 2a, 2d and 2g revealed that their HOMO energy is similar to other antivirals in use (AZT, DDC, DDI and 3TC), which suggested that the nucleophilicity might be an important feature for the biological activity. In addition, considering the importance of stereoelectronic complementarity to the drug–receptor interaction, the comparison between the most active (2g) and the less active (2c) compounds revealed that features such as HOMO density (concentrated at the benzyloxy substituent of 2g) and volume (related to the benzyl substituent on the 2g furanose moiety) may together contribute for the biological profile as they may allow new interactions with the target (*i.e.* hydrophobic). In fact the 1,2,3-triazole compounds presented more lipophilicity and higher molecular volume and

molecular weight than the antivirals studied, which suggested that these features might not only contribute for new interactions with the HIV-RT but also influence the specificity and consequently the low cytotoxicity profile of these compounds. In addition the evaluation of the electrostatic potential map of **2a**, **2d** and **2g** revealed an analogous negative electronic distribution to DDC and 3TC that may help to orientate them on binding to the HIV-RT.

All active compounds (**2a**, **2d** and **2g**) fulfilled the Lipinski rule of 5 (number of hydrogen bond acceptors < 10 and donors < 5,  $\log P < 5$ , molecular weight < 500) despite their chemical structural differences from the antivirals studied herein. The theoretical parameters such as the  $\log P$  that according to Lipinski rule of 5 is important for drug good absorption and permeation are kept under the best values [50].

All drug score values and theoretical toxicity evaluations of the most active compounds were better than that observed for commercial antivirals. These data reinforced the potential profile of these compounds but it is important to notice that the toxicity predicted herein neither is a fully reliable toxicity prediction, nor guarantees that these compounds are completely free of any toxic effect [51–53]. However, once again these theoretical results help to strengthen the promising profile of these compounds already pointed by the experimental cytotoxicity assay performed herein.

## 6. Conclusion

To summarize, we synthesized two new classes of triazoles (**2** and **3**) that present HIV-RT inhibition activity. Importantly the triazoles with the protected carbohydrate (**2**) are more effective than those containing unprotected carbohydrate groups (**3**). The significant activity, low cytotoxicity, and potential theoretical profile of triazoles **2a**, **2d** and **2g** suggest that these may be considered as promising lead molecules for further synthetic and biological exploration.

## 7. Experimental protocol

### 7.1. Chemistry

Melting points were determined with a Buchi Model B-545 instrument and are uncorrected. Infrared (IR) spectra were recorded on Perkin–Elmer 1420 spectrophotometer in KBr pellets. NMR spectra were recorded on a Varian Unity Plus 300 spectrometer in the indicated solvent, operating at 300 MHz ( $^1\text{H}$ ) and 75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) employing tetramethylsilane or the solvent as the internal reference, at room temperature. Chemical shifts ( $\delta$ ) are expressed in ppm and the coupling constant ( $J$ ) in hertz. Purified samples were used for measuring physical constants and spectral data. The optical rotations were recorded with a Perkin–Elmer 243B Polarimeter (sodium lamp at 589 nm). Analytical grade solvents were used. Trifluoroacetic anhydride was freshly distilled before being used. Column chromatography was performed on silica gel flash from Acros. Reactions were routinely monitored by thin layer chromatography (TLC) on silica gel precoated

F<sub>254</sub> Merck plates. Microanalyses were performed on Perkin–Elmer Model 2400 instrument and all values were within  $\pm 0.4\%$  of the calculated compositions. Chemicals employed were obtained from commercial supplies and used without purifications, unless otherwise stated. High-resolution electron-impact mass spectra (70 eV) were performed on Auto Spec M513 Waters instrument.

### 7.2. General procedures

#### 7.2.1. General procedure for the preparation of 3-benzylamino-but-2-enoic ester derivatives

The preparation of enamines **1a–g** was achieved as described in our previous publications [43].

##### 7.2.1.1. Spectral data of the new enamine esters

7.2.1.1.1. 3-Benzylamino-but-2-enoic acid 3-(1,2:5,6-di-O-isopropylidene)- $\alpha$ -D-allofuranose ester (**1c**). Compound **1c** was obtained as a white solid. Yield: 60%; m.p. 124–124.5 °C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 160$  (c 0.4,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ); IR (KBr)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1648 and 1606;  $^1\text{H}$  NMR (300.00 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.34 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.35 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.43 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.55 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 5.82 (1H, d,  $J = 3.9$  Hz, H-1'), 4.81 (1H, dd,  $J = 3.7$  and 4.6 Hz, H-2'), 4.91 (1H, dd,  $J = 4.9$  and 8.8 Hz, H-3'), 4.20 (1H, dd,  $J = 3.4$  and 8.8 Hz, H-4'), 4.35 (1H, ddd,  $J = 3.4$ , 6.6 and 6.6 Hz, H-5'), 4.04 (1H, dd,  $J = 6.8$  and 8.5 Hz, H-6'), 3.92 (1H, dd,  $J = 6.3$  and 8.3 Hz, H-6''), 4.61 (1H, s, H-2), 2.03 (3H, s, H-4), 4.51 (2H, d,  $J = 6.3$  Hz,  $\text{NHCH}_2\text{Ph}$ ), 7.29–7.39 (2H, m, H-2a), 7.29–7.39 (2H, m, H-3a), 7.29–7.39 (1H, m, H-4a), 8.89 (1H, t,  $J = 6.3$  Hz, NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (75.0 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 25.1 ( $\text{CH}_3$ ), 26.0 ( $\text{CH}_3$ ), 26.5 ( $\text{CH}_3$ ), 26.6 ( $\text{CH}_3$ ), 103.8 (C-1'), 78.2 (C-2'), 70.2 (C-3'), 77.1 (C-4'), 74.8 (C-5'), 64.9 (C-6'), 112.8 (C-7'), 109.6 (C-8'), 46.7 ( $\text{NHCH}_2\text{Ph}$ ), 82.2 (C-2), 162.7 (C-3), 19.3 (C-4), 138.2 (C-1a), 127.2 (C-2a), 128.6 (C-3a), 126.6 (C-4a), 168.8 (C=O). HRMS calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{NO}_7$ : 433.2101, found 433.2101.

7.2.1.1.2. 3-Benzylamino-but-2-enoic acid 5-(3-O-benzyl-1,2-O-isopropylidene)- $\alpha$ -D-xylofuranose ester (**1g**). Compound **1g** was obtained as a yellow oil. Yield: 67%;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 25$  (c 1.2,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ); IR (film,  $\text{CHCl}_3$ )  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1651 and 1606;  $^1\text{H}$  NMR (300.00 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.31 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.48 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 5.94 (1H, d,  $J = 3.7$  Hz, H-1'), 4.61 (1H, d,  $J = 3.9$  Hz, H-2'), 3.97 (1H, d,  $J = 2.9$  Hz, H-3'), 4.39–4.42 (1H, m, H-4'), 4.33 (1H, dd,  $J = 6.3$  and 11.7 Hz, H-5'), 4.39–4.42 (1H, m, H-5''), 4.66 (1H, d,  $J = 12.0$  Hz, H-6'), 4.52 (1H, d,  $J = 12.0$  Hz, H-6''), 4.56 (1H, s, H-2), 1.90 (3H, s, H-4), 4.42 (2H, d,  $J = 6.0$  Hz,  $\text{NHCH}_2\text{Ph}$ ), 7.23–7.35 (2H, m, H-2a), 7.23–7.35 (2H, m, H-3a), 7.23–7.35 (1H, m, H-4a), 7.23–7.35 (2H, m, H-2'a), 7.23–7.35 (2H, m, H-3'a), 7.23–7.35 (1H, m, H-4'a), 8.92 (1H, t,  $J = 5.8$  Hz, NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (75.0 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 26.1 ( $\text{CH}_3$ ), 26.6 ( $\text{CH}_3$ ), 105.0 (C-1'), 82.1 (C-2'), 81.5 (C-3'), 78.4 (C-4'), 59.9 (C-5'), 71.8 (C-6'), 111.5 (C-7'), 46.6 ( $\text{NHCH}_2\text{Ph}$ ), 82.7 (C-2), 162.0 (C-3), 19.2 (C-4), 138.4 (C-1a), 126.5 (C-2a), 128.6 (C-3a), 128.3 (C-4a), 137.2 (C-1'a), 127.2 (C-2'a), 127.7 (C-3'a), 127.5 (C-4'a),

169.7 (C=O). HRMS calcd for  $C_{26}H_{31}NO_6$ : 453.2151, found 453.2151.

### 7.2.2. General procedure for the preparation of 1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazole derivatives **2a–g**

To a stirred mixture of sodium hydride (6.67 mmol, free of oil) in anhydrous acetonitrile (4 mL), under nitrogen at room temperature, was added a solution of the  $\beta$ -enamino ester **1** (1.85 mmol in 4 mL of anhydrous acetonitrile). The stirring was continued for 30 min, followed by dropwise addition of mesyl azide (5 mmol in 1 mL of anhydrous acetonitrile). Additional stirring was kept for 48 h and the reaction was quenched with water. The resulting solution was extracted with methylene chloride (3  $\times$  30 mL) and the organic layer was washed (2  $\times$  20 mL) with aqueous sodium hydroxide solution (10%, w/v) and water (1  $\times$  10 mL). After drying over anhydrous sodium sulfate, the solvent was removed under reduced pressure to leave the 1,2,3-triazoles (**2a–g**) as yellow oils or solids.

#### 7.2.2.1. Spectral data of the 1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazole derivatives (**2a–g**)

**7.2.2.1.1. 1-Benzyl-5-methyl-1*H*-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid 5-(1-methoxy-2,3-*O*-isopropylidene)- $\beta$ -*D*-ribofuranose ester (**2a**).** Compound **2a** was obtained as a yellow oil. Yield: 92%;  $[\alpha]_D^{20}$  –33 (c 1.5,  $CHCl_3$ ); IR (film,  $CHCl_3$ )  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ): 1652 and 1605;  $^1H$  NMR (300.00 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.32 (3H, s,  $CH_3$ ), 1.48 (3H, s,  $CH_3$ ), 4.99 (1H, s, H-1'), 4.64 (1H, d,  $J=5.8$  Hz, H-2'), 4.80 (1H, dd,  $J=0.6$  and 5.8 Hz, H-3'), 4.51 (1H, dt,  $J=0.6$  and 6.9 Hz, H-4'), 4.39 (2H, dd,  $J=2.0$  and 6.9 Hz, H-5'), 3.33 (3H, s,  $OCH_3$ ), 2.46 (3H, s, C5– $CH_3$ ), 5.54 (2H, s,  $NCH_2Ph$ ), 7.16–7.39 (2H, m, H-2a), 7.16–7.39 (2H, m, H-3a), 7.16–7.39 (1H, m, H-4a);  $^{13}C$  NMR (75.0 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 24.7 ( $CH_3$ ), 26.2 ( $CH_3$ ), 109.2 (C-1'), 84.9 (C-2'), 81.6 (C-3'), 83.8 (C-4'), 64.6 (C-5'), 112.3 (C-6'), 54.8 ( $OCH_3$ ), 51.8 ( $NCH_2Ph$ ), 136.3 (C-4), 138.3 (C-5), 8.9 (C5– $CH_3$ ), 133.6 (C-1a), 127.0 (C-2a), 128.9 (C-3a), 128.4 (C-4a), 160.9 (C=O). HRMS calcd for  $C_{20}H_{25}N_3O_6$ : 430.1743, found 403.1705.

**7.2.2.1.2. 1-Benzyl-5-methyl-1*H*-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid 6-(1,2:3,4-*di-O*-isopropylidene)- $\alpha$ -*D*-galactopyranose ester (**2b**).** Compound **2b** was obtained as a yellow oil. Yield: 50%;  $[\alpha]_D^{20}$  –40 (c 1.5,  $CHCl_3$ ); IR (film,  $CHCl_3$ )  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ): 1732, 1382 and 1373;  $^1H$  NMR (300.00 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.32 (3H, s,  $CH_3$ ), 1.34 (3H, s,  $CH_3$ ), 1.46 (3H, s,  $CH_3$ ), 1.49 (3H, s,  $CH_3$ ), 5.54 (1H, d,  $J=4.5$  Hz, H-1'), 4.33 (1H, dd,  $J=2.4$  and 4.6 Hz, H-2'), 4.63 (1H, dd,  $J=2.4$  and 7.8 Hz, H-3'), 4.34 (1H, dd,  $J=1.9$  and 7.8 Hz, H-4'), 4.18 (1H, dt,  $J=1.7$  and 6.3 Hz, H-5'), 4.49 (1H, d,  $J=6.3$  Hz, H-6'), 2.45 (3H, s, C5– $CH_3$ ), 5.52 (1H, d,  $J=15.6$  Hz,  $NCH_2Ph$ ), 5.58 (1H, d,  $J=15.6$  Hz,  $NCH_2Ph$ ), 7.15–7.18 (2H, m, H-2a), 7.32–7.39 (2H, m, H-3a), 7.32–7.39 (1H, m, H-4a);  $^{13}C$  NMR (75.0 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 24.3 ( $CH_3$ ), 24.8 ( $CH_3$ ), 25.8 ( $CH_3$ ), 25.9 ( $CH_3$ ), 96.1 (C-1'), 70.4 (C-2'), 70.5 (C-3'), 70.8 (C-4'), 65.8 (C-5'), 63.5 (C-6'), 109.5 (C-7'), 108.6 (C-8'), 51.9 ( $NCH_2Ph$ ),

136.7 (C-4), 138.2 (C-5), 9.1 (C5– $CH_3$ ), 133.8 (C-1a), 127.1 (C-2a), 129.0 (C-3a), 128.5 (C-4a), 161.1 (C=O). HRMS calcd for  $C_{23}H_{29}N_3O_7$ : 444.1771, found 444.1633.

**7.2.2.1.3. 1-Benzyl-5-methyl-1*H*-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid 3-(1,2:5,6-*di-O*-isopropylidene)- $\alpha$ -*D*-allofuranose ester (**2c**).** Compound **2c** was obtained as a yellow solid. Yield: 50%; m.p. 97–98 °C;  $[\alpha]_D^{20}$  +83 (c 1.5,  $CHCl_3$ ); IR (KBr)  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ): 1733, 1714, 1380 and 1372;  $^1H$  NMR (300.00 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.32 (3H, s,  $CH_3$ ), 1.32 (3H, s,  $CH_3$ ), 1.38 (3H, s,  $CH_3$ ), 1.54 (3H, s,  $CH_3$ ), 5.88 (1H, d,  $J=3.9$  Hz, H-1'), 4.93 (1H, dd,  $J=3.9$  and 5.1 Hz, H-2'), 5.11 (1H, dd,  $J=5.1$  and 8.3 Hz, H-3'), 4.36–4.43 (1H, m, H-4'), 4.36–4.43 (1H, m, H-5'), 4.03 (1H' dd,  $J=6.1$  and 8.8 Hz, H-6'), 4.10 (1H, dd,  $J=6.6$  and 8.8 Hz, H-6''), 2.46 (3H, s, C5– $CH_3$ ), 5.50 (1H, d,  $J=15.6$  Hz,  $NCH_2Ph$ ), 5.56 (1H, d,  $J=15.6$  Hz,  $NCH_2Ph$ ), 7.17–7.21 (2H, m, H-2a), 7.32–7.39 (2H, m, H-3a), 7.32–7.39 (1H, m, H-4a);  $^{13}C$  NMR (75.0 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 25.1 ( $CH_3$ ), 26.4 ( $CH_3$ ), 26.9 ( $CH_3$ ), 26.9 ( $CH_3$ ), 104.4 (C-1'), 78.0 (C-2'), 72.8 (C-3'), 77.8 (C-4'), 75.0 (C-5'), 65.7 (C-6'), 113.5 (C-7'), 110.2 (C-8'), 52.3 ( $NCH_2Ph$ ), 136.4 (C-4), 139.1 (C-5), 9.4 (C5– $CH_3$ ), 134.0 (C-1a), 127.6 (C-2a), 129.4 (C-3a), 128.9 (C-4a), 160.8 (C=O). HRMS calcd for  $C_{23}H_{29}N_3O_7$ : 444.1771, found 444.1765.

**7.2.2.1.4. 1-Benzyl-5-methyl-1*H*-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid 3-(1,2:5,6-*di-O*-isopropylidene)- $\alpha$ -*D*-glucofuranose (**2d**).** Compound **2d** was obtained as a yellow oil. Yield: 50%;  $[\alpha]_D^{20}$  –30 (c 1.6,  $CHCl_3$ ); IR (film,  $CHCl_3$ )  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ): 1726, 1383 and 1374;  $^1H$  NMR (300.00 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.27 (3H, s,  $CH_3$ ), 1.31 (3H, s,  $CH_3$ ), 1.41 (3H, s,  $CH_3$ ), 1.54 (3H, s,  $CH_3$ ), 5.97 (1H, d,  $J=3.7$  Hz, H-1'), 4.64 (1H, d,  $J=3.7$  Hz, H-2'), 5.51 (1H, d,  $J=2.9$  Hz, H-3'), 4.33 (1H, dd,  $J=2.9$  and 7.8 Hz, H-4'), 4.41 (1H, ddd,  $J=5.1$ , 5.6 and 7.8 Hz, H-5'), 4.09 (1H, dd,  $J=5.1$  and 8.8 Hz, H-6'), 4.14 (1H, dd,  $J=5.6$  and 8.8 Hz, H-6''), 2.46 (3H, s, C5– $CH_3$ ), 5.54 (2H, s,  $NCH_2Ph$ ), 7.18–7.20 (2H, m, H-2a), 7.32–7.39 (2H, m, H-3a), 7.32–7.39 (1H, m, H-4a);  $^{13}C$  NMR (75.0 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 25.1 ( $CH_3$ ), 26.1 ( $CH_3$ ), 26.6 ( $CH_3$ ), 26.7 ( $CH_3$ ), 105.0 (C-1'), 83.3 (C-2'), 76.4 (C-3'), 79.7 (C-4'), 72.4 (C-5'), 67.0 (C-6'), 112.1 (C-7'), 109.1 (C-8'), 51.9 ( $NCH_2Ph$ ), 136.1 (C-4), 138.8 (C-5), 8.9 (C5– $CH_3$ ), 133.6 (C-1a), 127.1 (C-2a), 129.0 (C-3a), 128.5 (C-4a), 160.3 (C=O). HRMS calcd for  $C_{23}H_{29}N_3O_7$ : 444.1771, found 444.1785.

**7.2.2.1.5. 1-Benzyl-5-methyl-1*H*-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid 3-(1,2:4,5-*di-O*-isopropylidene)- $\beta$ -*D*-fructopyranose ester (**2e**).** Compound **2e** was obtained as a yellow solid. Yield: 80%; m.p. 164–165 °C;  $[\alpha]_D^{20}$  –105 (c 1.6,  $CHCl_3$ ); IR (KBr)  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ): 1729, 1373 and 1385;  $^1H$  NMR (300.00 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.36 (3H, s,  $CH_3$ ), 1.43 (3H, s,  $CH_3$ ), 1.50 (3H, s,  $CH_3$ ), 1.59 (3H, s,  $CH_3$ ), 3.93 (1H, d,  $J=9.3$  Hz, H-1'), 4.01 (1H, dd,  $J=9.3$  Hz, H-1''), 5.40 (1H, d,  $J=8.1$  Hz, H-3'), 4.48 (1H, dd,  $J=5.4$  and 8.1 Hz, H-4'), 4.28 (1H, dd,  $J=1.8$  and 5.4 Hz, H-5'), 4.12 (1H, d,  $J=13.7$  Hz, H-6'), 4.20 (1H, dd,  $J=2.4$  and 13.7 Hz, H-6''), 2.46 (3H, s, C5– $CH_3$ ), 5.53 (2H, s,  $NCH_2Ph$ ), 7.13–7.21 (2H, m, H-2a), 7.32–7.40 (2H, m,

H-3a), 7.32–7.40 (1H, m, H-4a);  $^{13}\text{C}$  NMR (75.0 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 25.9 ( $\text{CH}_3$ ), 26.2 ( $\text{CH}_3$ ), 26.3 ( $\text{CH}_3$ ), 27.6 ( $\text{CH}_3$ ), 71.5 (C-1'), 103.5 (C-2'), 70.3 (C-3'), 74.7 (C-4'), 73.6 (C-5'), 60.2 (C-6'), 112.1 (C-7'), 109.5 (C-8'), 51.8 ( $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 136.0 (C-4), 138.4 (C-5), 9.1 (C5– $\text{CH}_3$ ), 133.6 (C-1a), 127.0 (C-2a), 128.9 (C-3a), 128.4 (C-4a), 160.9 (C=O). HRMS calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_7$ : 444.1771, found 444.1816.

7.2.2.1.6. *1-Benzyl-5-methyl-1H-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid 1-(2,3:4,5-di-O-isopropylidene)- $\beta$ -fructopyranose ester (2f)*. Compound **2f** was obtained as a yellow oil. Yield: 70%;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  –14 (c 1.6,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (film,  $\text{CHCl}_3$ )  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1723 and 1382;  $^1\text{H}$  NMR (300.00 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.34 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.46 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.51 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.54 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 4.26 (1H, d,  $J = 11.5$  Hz, H-1'), 4.69 (1H, dd,  $J = 11.5$  Hz, H-1''), 4.59 (1H, d,  $J = 2.7$  Hz, H-3'), 4.65 (1H, dd,  $J = 2.7$  and 7.8 Hz, H-4'), 4.24–4.28 (1H, m, H-5'), 3.78 (1H, dd,  $J = 0.5$  and 12.9 Hz, H-6'), 3.96 (1H, dd,  $J = 1.7$  and 12.9 Hz, H-6''), 2.47 (3H, s, C5– $\text{CH}_3$ ), 5.51 (1H, d,  $J = 15.4$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 5.57 (1H, d,  $J = 15.4$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 7.14–7.17 (2H, m, H-2a), 7.32–7.39 (2H, m, H-3a), 7.32–7.39 (1H, m, H-4a);  $^{13}\text{C}$  NMR (75.0 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 23.9 ( $\text{CH}_3$ ), 25.2 ( $\text{CH}_3$ ), 25.7 ( $\text{CH}_3$ ), 26.4 ( $\text{CH}_3$ ), 64.5 (C-1'), 101.4 (C-2'), 70.1 (C-3'), 69.9 (C-4'), 70.7 (C-5'), 61.1 (C-6'), 109.0 (C-7'), 108.9 (C-8'), 51.7 ( $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 136.3 (C-4), 138.7 (C-5), 8.8 (C5– $\text{CH}_3$ ), 133.7 (C-1a), 127.0 (C-2a), 128.9 (C-3a), 128.4 (C-4a), 160.9 (C=O). HRMS calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_7$ : 444.1771, found 444.1752.

7.2.2.1.7. *1-Benzyl-5-methyl-1H-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid 5-(3-O-benzyl-1,2-O-isopropylidene)- $\alpha$ -D-xylofuranose ester (2g)*. Compound **2g** was obtained as a yellow oil. Yield: 70%;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  –25 (c 1.5,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (film,  $\text{CHCl}_3$ )  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1721, 1374 and 1360;  $^1\text{H}$  NMR (300.00 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.33 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.49 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 5.98 (1H, d,  $J = 3.7$  Hz, H-1'), 4.65 (1H, d,  $J = 3.7$  Hz, H-2'), 4.08 (1H, d,  $J = 2.7$  Hz, H-3'), 4.58–4.63 (1H, m, H-4'), 4.58–4.63 (2H, m, H-5'), 4.54 (1H, d,  $J = 12.0$  Hz, H-6'), 4.72 (1H, d,  $J = 12.0$  Hz, H-6''), 2.42 (3H, s, C5– $\text{CH}_3$ ), 5.54 (2H, s,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 7.17–7.39 (2H, m, H-2a), 7.17–7.39 (2H, m, H-3a), 7.17–7.39 (1H, m, H-4a), 7.17–7.39 (2H, m, H-2'a), 7.17–7.39 (2H, m, H-3'a), 7.17–7.39 (1H, m, H-4'a);  $^{13}\text{C}$  NMR (75.0 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 26.1 ( $\text{CH}_3$ ), 26.6 ( $\text{CH}_3$ ), 105.0 (C-1), 82.0 (C-2), 81.4 (C-3), 77.8 (C-4), 62.1 (C-5), 71.7 (C-6), 111.7 (C-7), 51.8 ( $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 137.0 (C-4), 138.3 (C-5), 8.9 (C5– $\text{CH}_3$ ), 133.7 (C-1a), 128.3 (C-2a), 128.9 (C-3a), 128.4 (C-4a), 136.4 (C-1'a), 127.0 (C-2'a), 127.5 (C-3'a), 127.7 (C-4'a), 161.0 (C=O). HRMS calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_6$ : 479.2056, found 479.2104.

### 7.2.3. General procedure for the preparation of 1-benzyl-1H-1,2,3-triazole derivatives **3a–g**

To a bottom balloon containing 1 mmol of 1-benzyl-1H-1,2,3-triazole derivatives **2**, 10 mL of 50% trifluoroacetic acid in water was added. The stirring was continued for 48 h. Then the solvent was removed under reduced pressure

furnishing the 1,2,3-triazoles (**3a–g**) as brown oils, in quantitative yield.

### 7.2.3.1. Spectral data of the 1-benzyl-1H-1,2,3-triazole derivatives (**3a–g**)

7.2.3.1.1. *1-Benzyl-5-methyl-1H-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid 5- $\beta$ -D-ribofuranose ester (3a)*.  $^1\text{H}$  NMR (300.00 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 5.10 (1H, s, H-1'), 4.35 (1H, d,  $J = 11.7$  Hz, H-2') and 4.33 (1H, d,  $J = 11.7$  Hz, H-2''), 4.60 (1H, dd,  $J = 3.2$  and 11.7 Hz, H-3'), 4.08 (1H, dd,  $J = 3.2$  and 6.6 Hz, H-4'), 3.80 (1H, d,  $J = 4.4$  Hz, H-5'), 4.14 (1H, d,  $J = 4.4$  and 6.6 Hz, H-5''), 2.60 (3H, s, C5– $\text{CH}_3$ ), 5.77 (2H, s,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 7.31–7.51 (2H, m, H-2a), 7.31–7.51 (2H, m, H-3a), 7.31–7.51 (1H, m, H-4a);  $^{13}\text{C}$  NMR (75.0 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 102.0 (C-1'), 79.1 (C-2'), 71.2 (C-3'), 75.4 (C-4'), 66.2 (C-5'), 51.0 ( $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 136.0 (C-4), 138.8 (C-5), 9.1 (C5– $\text{CH}_3$ ), 135.2 (C-1a), 127.5 (C-2a), 129.1 (C-3a), 128.3 (C-4a), 161.1 (C=O).

7.2.3.1.2. *1-Benzyl-5-methyl-1H-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid 6- $\alpha$ -D-galactopyranose ester (3b)*.  $^1\text{H}$  NMR (300.00 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 5.06 (1H, d,  $J = 3.5$  Hz, H-1') and 5.05 (1H, d,  $J = 3.0$  Hz, H-1''), 3.68 (1H, dd,  $J = 3.5$  and 9.5 Hz, H-2'), 3.79–3.87 (1H, m, H-3'), 3.93 (1H, dd,  $J = 2.8$  and 7.0 Hz, H-4') and 3.98 (1H, dd,  $J = 5.2$  and 7.2 Hz, H-4''), 4.33–4.38 (1H, m, H-5'), 4.23–4.27 (1H, m, H-6'), 4.27–4.45 (1H, m, H-6''), 2.57 (3H, s, C5– $\text{CH}_3$ ) and 2.58 (3H, s, C5– $\text{CH}_3$ ), 5.73 (2H, s,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 7.30–7.55 (2H, m, H-2a), 7.30–7.55 (2H, m, H-3a), 7.30–7.55 (1H, m, H-4a);  $^{13}\text{C}$  NMR (75.0 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 97.5 and 92.8 (C-1'), 69.4 and 71.9 (C-2'), 73.1 and 76.0 (C-3'), 67.8 and 68.8 (C-4'), 81.5 and 82.7 (C-5'), 64.4 and 64.3 (C-6'), 50.9 ( $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 135.9 (C-4), 138.8 and 138.7 (C-5), 8.87 and 8.92 (C5– $\text{CH}_3$ ), 135.1 (C-1a), 127.4 (C-2a), 128.9 (C-3a), 128.2 (C-4a), 161.0 (C=O).

7.2.3.1.3. *1-Benzyl-5-methyl-1H-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid 3- $\beta$ -D-allopyranose ester (3c)*.  $^1\text{H}$  NMR (300.00 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 5.69 (1H, d,  $J = 3.2$  Hz, H-1'), 3.43 (1H, dd,  $J = 3.2$  and 8.0 Hz, H-2'), 4.80 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-3'), 3.68–3.76 (1H, m, H-4'), 3.49–3.58 (1H, m, H-5'), 3.49–3.58 (1H, m, H-6'), 3.75 (1H, dd,  $J = 6.8$  and 11.0 Hz, H-6''), 2.58 (3H, s, C5– $\text{CH}_3$ ), 5.73 (1H, s,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 7.29–7.54 (2H, m, H-2a), 7.29–7.54 (2H, m, H-3a), 7.29–7.54 (1H, m, H-4a);  $^{13}\text{C}$  NMR (75.0 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 94.1 (C-1'), 74.6 (C-2'), 75.3 (C-3'), 65.9 (C-4'), 70.1 (C-5'), 61.2 (C-6'), 50.9 ( $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 136.8 (C-4), 137.8 (C-5), 9.4 (C5– $\text{CH}_3$ ), 135.2 (C-1a), 127.5 (C-2a), 129.0 (C-3a), 128.2 (C-4a), 160.6 (C=O).

7.2.3.1.4. *1-Benzyl-5-methyl-1H-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid 3- $\alpha$ -(or  $\beta$ )-D-glucopyranose ester (3d)*.  $^1\text{H}$  NMR (300.00 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 5.11 (1H, d,  $J = 9.3$  Hz, H-1' $\alpha$ ), 4.56 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz, H-1' $\beta$ ), 3.27 (1H, m, H-2' $\alpha$ ), 3.30 (1H, dd,  $J = 7.6$  and 9.5, H-2' $\beta$ ), 3.55–3.66 (1H, m, H-3' $\alpha$ ), 3.50 (1H, dd,  $J = 5.8$  and 9.5 Hz, H-3' $\beta$ ), 3.34–3.40 (1H, m, H-4' $\alpha$  or H-4' $\beta$ ), 3.55–3.66 (1H, m, H-5' $\alpha$  or H-5' $\beta$ ), 3.55–3.66 (2H, m, H-6' $\alpha$  or H-6' $\beta$ ), 2.57 (3H, s, C5– $\text{CH}_3$ ), 5.73 (2H, s,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 7.31–7.53 (2H, m, H-2a), 7.31–7.53 (2H, m, H-3a), 7.31–7.53 (1H, m, H-4a);  $^{13}\text{C}$

NMR (75.0 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 92.3 (C-1' $\alpha$ ), 96.8 (C-1' $\beta$ ), 70.4 (C-2' $\alpha$ ), 76.2 (C-2' $\beta$ ), 72.8 (C-3' $\alpha$ ), 73.5 (C-3' $\beta$ ), 61.1 (C-4' $\alpha$  and  $\beta$ ), 71.9 (C-5' $\alpha$ ), 78.5 (C-5' $\beta$ ), 60.8 (C-6' $\alpha$  and  $\beta$ ), 50.8 (NCH<sub>2</sub>Ph), 136.4 (C-4 $\alpha$ ), 136.6 (C-4 $\beta$ ), 138.2 (C-5 $\alpha$ ), 138.3 (C-5 $\beta$ ), 9.0 (C5–CH<sub>3</sub>), 135.2 (C-1a  $\alpha$  and  $\beta$ ), 127.4 (C-2a  $\alpha$  and  $\beta$ ), 128.9 (C-3a  $\alpha$  and  $\beta$ ), 128.1 (C-4a  $\alpha$  and  $\beta$ ), 160.6 (C=O  $\alpha$ ), 160.8 (C=O  $\beta$ ).

7.2.3.1.5. *1-Benzyl-5-methyl-1H-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid 3- $\beta$ -D-fructopyranose ester (3e)*. <sup>1</sup>H NMR (300.00 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 3.41–3.59 (2H, m, H-1'), 5.43 (1H, d,  $J$  = 10.0 Hz, H-3'), 4.01 (1H, dd,  $J$  = 3.5 and 10.0 Hz, H-4'), 3.88–3.89 (1H, m, H-5'), 4.00 (1H, d,  $J$  = 12.0 Hz, H-6'), 3.64 (1H, dd,  $J$  = 1.2 and 12.0 Hz, H-6''), 2.60 and 2.61 (3H, s, C5–CH<sub>3</sub>), 5.77 and 5.78 (2H, s, NCH<sub>2</sub>Ph), 7.33–7.53 (2H, m, H-2a), 7.33–7.53 (2H, m, H-3a), 7.33–7.53 (1H, m, H-4a); <sup>13</sup>C NMR (75.0 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 64.7 (C-1'), 97.4 and 101.6 (C-2'), 68.4 (C-3'), 70.9 (C-4'), 67.8 (C-5'), 63.6 (C-6'), 51.2 (NCH<sub>2</sub>Ph), 136.7 (C-4), 138.7 (C-5), 9.3 (C5–CH<sub>3</sub>), 135.5 (C-1a), 127.8 (C-2a), 129.3 (C-3a), 128.5 (C-4a), 161.0 (C=O).

7.2.3.1.6. *1-Benzyl-5-methyl-1H-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid 1- $\beta$ -D-fructopyranose ester (3f)*. <sup>1</sup>H NMR (300.00 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 4.22 (1H, d,  $J$  = 11.5 Hz, H-1'), 4.34 (1H, dd,  $J$  = 11.5 Hz, H-1''), 4.28–4.30 (1H, m, H-3'), 4.28–4.30 (1H, m, H-4'), 3.91–3.99 (1H, m, H-5'), 3.91–3.99 (1H, m, H-6'), 3.74–3.84 (1H, m, H-6''), 2.59 and 2.60 (3H, s, C5–CH<sub>3</sub>), 5.77 and 5.78 (1H, s, NCH<sub>2</sub>Ph), 7.32–7.53 (2H, m, H-2a), 7.32–7.53 (2H, m, H-3a), 7.32–7.53 (1H, m, H-4a); <sup>13</sup>C NMR (75.0 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 65.2 (C-1'), 97.0 and 100.2 (C-2'), 69.1 (C-3'), 67.8 (C-4'), 69.6 (C-5'), 63.5 (C-6'), 50.9 (NCH<sub>2</sub>Ph), 136.2 (C-4), 138.7 (C-5), 9.1 and 9.2 (C5–CH<sub>3</sub>), 135.2 (C-1a), 127.4 (C-2a), 129.0 (C-3a), 128.2 (C-4a), (C=O).

7.2.3.1.7. *1-Benzyl-5-methyl-1H-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid 5- $\alpha$ -D-xylofuranose ester (3g)*. <sup>1</sup>H NMR (300.00 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 4.82 (1H, d,  $J$  = 4.4 Hz, H-1'), 4.10–4.31 (1H, m, H-2'), 4.51–4.59 (1H, m, H-3'), 4.59–4.70 (1H, m, H-4'), 4.77 (1H, dd,  $J$  = 3.4 and 12.4 Hz, H-5'), 4.82 (1H, d,  $J$  = 12.4 Hz, H-5''), 4.61 (1H, d,  $J$  = 12.0 Hz, H-6'), 4.68 (1H, d,  $J$  = 12.0 Hz, H-6''), 2.55 and 2.56 (3H, s, C5–CH<sub>3</sub>), 5.77 (2H, s, NCH<sub>2</sub>Ph), 7.32–7.57 (2H, m, H-2a), 7.32–7.57 (2H, m, H-3a), 7.32–7.57 (1H, m, H-4a), 7.32–7.57 (2H, m, H-2'a), 7.32–7.57 (2H, m, H-3'a), 7.32–7.57 (1H, m, H-4'a); <sup>13</sup>C NMR (75.0 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 102.1 (C-1'), 83.8 (C-2'), 82.4 (C-3'), 78.0 (C-4'), 63.0 (C-5'), 71.4 (C-6'), 50.9 (NCH<sub>2</sub>Ph), 138.3 (C-4), 138.7 (C-5), 8.8 (C5–CH<sub>3</sub>), 135.1 (C-1a), 127.4 (C-2a), 128.9 (C-3a), 128.2 (C-4a), 135.1 (C-1'a), 127.4 (C-2'a), 128.9 (C-3'a), 128.2 (C-4'a), 160.9 (C=O).

All triazoles synthesized were then tested in the biological assays without any other further analytical chemistry analysis.

#### 7.2.4. Enzyme activity assays

The inhibitory effect of triazoles at a concentration of 50  $\mu$ M was evaluated on the RT polymerase activity using recombinant HIV-1 enzyme. The sequence that expressed RT HIV-1 was introduced into an *Escherichia coli* expression

plasmid pUC12N. This recombinant enzyme was composed of 66 kDa protein. The bacteria containing this plasmid were grown for 12–16 h with shaking at 37 °C and were collected by centrifugation for 10 min, at 10,000 rpm. The pellet was washed once with cold 100 mM NaCl, 20% (vol/vol) glycerol, 1% triton X-100, 1 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol, 25 mM Tris chloride, pH 8.0. The lysates were kept at 4 °C for 30 min, and the insoluble material was removed by centrifugation at 10,000 rpm. The supernatant was collected and passed over Sephadex G-25 columns at 4 °C pre-equilibrated with 0.2 M NaCl, 2 mM dithiothreitol, 0.2% Triton X-100, 20% glycerol, 25 mM Tris chloride, pH 7.4. After loading, the columns were washed with the same pre-equilibration buffer, and the fractions were assayed both for reverse transcriptase activity and for protein concentration. The polymerization reactions (50  $\mu$ L) contained 50 mM Tris HCl (pH 7.8), 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol, 50 mM KCl, 20  $\mu$ M dTTP, 10  $\mu$ M of [<sup>3</sup>H] dTTP (47 Ci/mmol), and 150  $\mu$ g poly(rA)·oligo(dT) template primer (Pharmacia) and 1 U of enzyme. The reaction mixture was incubated at 37 °C for 30 min, and the incubation was stopped by adding ice-cold 5% trichloroacetic acid (TCA) containing 20 mM of sodium pyrophosphate. The precipitates were collected on Whatman GF/C filters and washed with sodium phosphate 0.1 M. The incorporated triphosphate was measured by assaying for <sup>3</sup>H in a liquid scintillation counter. One unit of enzyme is defined as the amount of enzyme that incorporates 1 pmol of dTTP in 30 min at 37 °C under standard assay conditions.

#### 7.2.5. Cytotoxicity assay

Vero cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS; HyClone, Logan, Utah), 100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin, at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Monolayers of about 104 Vero cells in 96-multiwell plates were treated with several concentrations of the compounds for the 72 h. Then, 50  $\mu$ L of a 1 mg/mL solution of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT; Sigma) was added to evaluate cell viability according to procedures described elsewhere [49]. The 50% cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>) was calculated by linear regression analysis of the dose–response curves. All experiments were performed in duplicate at least three times.

### 7.3. Molecular modeling and SAR studies

#### 7.3.1. Molecular modeling methods

We employed molecular modeling studies for triazole derivatives in the attempt to elucidate a structure–activity relationship (SAR) to provide useful guidelines for the design of more potent antivirals. The minimum energy conformation of the most active and the least active compounds, obtained by the AM1 semiempirical method, were submitted to a single-point *ab initio* calculation with a 3-21G\* basis set available on SPARTAN'04 program (Wavefunction Inc. Irvine, CA, 2000). Molecular electrostatic potential maps (MEPs), HOMO and LUMO eigen values and orbital coefficients, and the

molecular dipole moments were calculated. In this work, we also studied the druglikeness and the drug score of the compounds, which is based on topological descriptors, fingerprints of molecular druglikeness, structural keys or other properties as clog *P* and molecular weights [49]. In case of Osiris Property Explorer (<http://www.organic-chemistry.org/>), the occurrence frequency of each fragment is determined within the collection of traded drugs and within the supposedly non-druglike collection of Fluka compounds.

### Acknowledgements

Fellowships granted to V.F.F., M.C.B.V.S., I.I.P.F., H.C.C. and C.R.R. by CNPq (Brazil) is gratefully acknowledged. The authors' thanks to Dr. M.A. Dal Tasso and Professor F. Radler for the HRMS spectrum. This work was partially supported by CNPq, FAPERJ, Farmanguinhos/Fiocruz and UFF.

### References

- [1] A. Bartlett, R. Demasi, J. Quinn, C. Moxham, F. Rousseau, *AIDS* 15 (2001) 1369–1377.
- [2] UNAIDS 2005 report, <<http://www.unaids.org>> (accessed, 14.11.07).
- [3] F. Barre-Sinoussi, J.C. Chermann, M.T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Bin, F. Vézinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, L. Montagnier, *Science* 220 (1983) 868–871.
- [4] R.C. Gallo, S.Z. Salahuddin, M. Popovic, G.M. Shearer, M. Kalpana, B.F. Haynes, T.J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, G. White, P. Foster, P.D. Markham, *Science* 224 (1984) 500–503.
- [5] H.C. Castro, N.I.V. Loureiro, M. Pujol-Luz, A.M.T. Souza, M.G. Albuquerque, D.O. Santos, L.M. Cabral, I.C. Frugulhetti, C.R. Rodrigues, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 313–324.
- [6] A.S. Mehanna, in: A. Burger, D.J. Abraham, J. Andrako, J.H. Block, R.T. Borchardt, A. Abraham (Eds.), *Rationale of Design of Anti-HIV Drugs*, sixth ed., Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, vol. 5 John Wiley and Sons, Inc., New Jersey, 2003, pp. 4574–4584.
- [7] O.S. Pedersen, E.B. Pedersen, *Antivir. Chem. Chemother.* 10 (1999) 285–314.
- [8] E.P. Peçanha, O.A.C. Antunes, *Quim. Nova* 25 (2002) 1108–1116.
- [9] M. Shimada, H. Hosaka, H. Takaku, J.S. Smith, M.J. Roth, S. Inouye, M. Inouye, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 3925–3927.
- [10] J.N. Blankson, D. Persaud, R.F. Siliciano, *Annu. Rev. Med.* 53 (2002) 557–593.
- [11] H. Mitsuya, K. Maeda, D. Das, A.K. Ghosh, *Adv. Pharmacol.* 56 (2008) 169–197.
- [12] S.C. Kalichman, G. Di Berto, L. Eaton, *Sex Transm. Dis.* 35 (2008) 55–60.
- [13] X. Duval, D. Descamps, G. Breton, S. Darmon, J.L. Ecobichon, S. Delarue, G. Peytavin, C. Lepout, J.L. Vildé, F. Brun-Vézinet, *Antivir. Ther.* 10 (2005) 197–199.
- [14] R.S. Hogg, D.R. Bangsberg, V.D. Lima, C. Alexander, S. Bonner, B. Yip, E. Wood, W.W. Dong, J.S. Montaner, P.R. Harrigan, *PLoS Med.* 3 (2006) 356.
- [15] E. De Clercq, *Med. Mal. Infect.* 30 (2000) 421–430.
- [16] E. De Clercq, *J. Clin. Virol.* 22 (2001) 73–89.
- [17] X.L. Li, K. Chan, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 39 (1999) 81–103.
- [18] E. De Clercq, *Biochim. Biophys. Acta* 1587 (2002) 258–275.
- [19] J.R. Huff, *Bioorg. Med. Chem.* 7 (1999) 2667–2669.
- [20] L.M. Schultze, H.H. Chapman, J.P. Dubree, R.J. Jones, K.M. Kent, T.T. Lee, M.S. Louie, M.J. Postich, E.J. Prisbe, J.C. Rodhloff, R.H. Yu, *Tetrahedron Lett.* 39 (1998) 1853–1856.
- [21] E. De Clercq, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 1297–1313.
- [22] K. Kacprzak, *Synlett* (2005) 943–946.
- [23] A.C. Cunha, J.M. Figueiredo, J.L.M. Tributino, A.L.P. Miranda, H.C. Castro, R.B. Zingali, C.A.M. Fraga, M.C.B.V. de Souza, V.F. Ferreira, E.J. Barreiro, *Bioorg. Med. Chem.* 11 (2003) 2051–2059.
- [24] R. Menegatti, A.C. Cunha, V.F. Ferreira, E.F.R. Perreira, A. El-Nabawi, A.T. Eldefrawi, E.X. Albuquerque, G. Neves, S.M.K. Rates, C.A.M. Fraga, E.J. Barreiro, *Bioorg. Med. Chem.* 11 (2003) 4807–4813.
- [25] R.G. Micetich, S.N. Maiti, P. Spevak, T.W. Hall, S. Yamabe, N. Ishida, M. Tanaka, T. Yamazaki, A. Nakai, K. Ogawa, *J. Med. Chem.* 30 (1987) 1469–1474.
- [26] J.L. Kelley, C.S. Koble, R.G. Davis, E.W. McLean, F.E. Soroko, B.R. Cooper, *J. Med. Chem.* 38 (1995) 4131–4134.
- [27] B.S. Holla, M. Mahalinga, M.S. Karthikeyan, B. Poojary, P.M. Akberali, N.S. Kumari, *Eur. J. Med. Chem.* 40 (2005) 1173–1178.
- [28] K. Dabak, O. Sezer, A. Akar, O. Anac, *Eur. J. Med. Chem.* 38 (2003) 215–218.
- [29] D. Willner, A.M. Jelenevsky, L.C. Cheney, *J. Med. Chem.* 15 (1972) 948–951.
- [30] G. Biagi, G. Dell'Omodarme, M. Ferretti, I. Giorgi, O. Livi, V. Scartoni, *Farmaco* 45 (1990) 1181–1192.
- [31] G. Biagi, O. Livi, V. Scartoni, A. Lucacchini, M.R. Mazzoni, *Farmaco* 41 (1986) 597–610.
- [32] R. Alvarez, S. Velázquez, A. San-Félix, S. Aquaro, E. De Clercq, C.F. Perno, A. Karlsson, J. Balzarini, M.J. Camarasa, *J. Med. Chem.* 37 (1994) 4185–4194.
- [33] W.G. Lewis, L.G. Green, F. Grynszpan, Z. Radic, P.R. Carlier, P. Taylor, M.G. Finn, K.B. Sharpless, *Angew. Chem., Int. Ed.* 41 (2002) 1053–1057.
- [34] Q. Wang, T.R. Chan, R. Hilgraf, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, M.G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 3192–3193.
- [35] L.V. Lee, M.L. Mitchell, S.J. Huang, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, C.H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 9588–9589.
- [36] A.J. Link, D.A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 11164–11165.
- [37] A.E. Speers, G.C. Adam, B.F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 4686–4687.
- [38] A.E. Speers, B.F. Cravatt, *Chem. Biol.* 11 (2004) 535–546.
- [39] T.S. Seo, Z. Li, H. Ruparel, J. Ju, *J. Org. Chem.* 68 (2003) 609–612.
- [40] S. Lober, P. Rodriguez-Loaiza, P. Gmeiner, *Org. Lett.* 5 (2003) 1753–1755.
- [41] C.W. Tornøe, S.J. Sanderson, J.C. Mottram, G.H. Coombs, M. Meldal, *J. Comb. Chem.* 6 (2004) 312–324.
- [42] H. Gallardo, F. Ely, A.J. Bortoluzzi, G. Conte, *Liq. Cryst.* 32 (2005) 667–671.
- [43] F.C. Silva, M.C.B.V. de Souza, V.F. Ferreira, S.J. Sabino, O.A.C. Antunes, *Catal. Commun.* 5 (2004) 151–155.
- [44] F.M. Stojanovic, Z. Arnold, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 32 (1967) 2155–2156.
- [45] Ö. Sezer, K. Dabak, O. Anac, A. Akar, *Helv. Chim. Acta* 79 (1996) 449–453.
- [46] G.A. Romeiro, L.O.R. Pereira, M.C.B.V. de Souza, V.F. Ferreira, A.C. Cunha, *Tetrahedron Lett.* 38 (1997) 5103–5106.
- [47] A.C. Cunha, L.O.R. Pereira, R.O.P. de Souza, M.C.B.V. de Souza, V.F. Ferreira, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 20 (2001) 1555–1569.
- [48] K.A. Winans, C.R. Bertozzi, *Chem. Biol.* 9 (2002) 113–129.
- [49] T. Mosman, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.
- [50] I.V. Tetko, *Drug Discov. Today* 10 (2005) 22–36.
- [51] A.C. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23 (1997) 3–25.
- [52] M.S. Costa, N. Boechat, E.A. Rangel, F.de C. da Silva, A.M. de Souza, C.R. Rodrigues, H.C. Castro, I.N. Junior, M.C. Lourenço, S.M. Wardell, V.F. Ferreira, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 8644–8653.
- [53] L.R. Dias, M.B. Santos, S. Albuquerque, H.C. Castro, A.M. de Souza, A.C. Freitas, M.A. DiVaio, L.M. Cabral, C.R. Rodrigues, *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2007) 211–219.

### 8.1.3 - Synthesis, HIV-RT inhibitory activity and SAR of 1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazole derivatives of carbohydrates.

## The Compound 6-Chloro-1,4-Dihydro-4-Oxo-1-( $\beta$ -D-Ribofuranosyl) Quinoline-3-Carboxylic Acid Inhibits HIV-1 Replication by Targeting the Enzyme Reverse Transcriptase

Thiago Moreno L. Souza<sup>1,2,3,4</sup>, Claudio Cesar Cirne-Santos<sup>1,4</sup>, Diego Q. Rodrigues<sup>1,4</sup>,  
Céline M. Abreu<sup>1</sup>, Amílcar Tanuri<sup>2</sup>, Vitor F. Ferreira<sup>2</sup>, Isabella Pereira Marques<sup>2</sup>,  
Maria Cecília Bastos Vieira de Souza<sup>2</sup>, Carlos Frederico Leite Fontes<sup>3</sup>,  
Isabel Cristina de Palmer Paixão Frugulhetti<sup>2</sup> and Dumith Chequer Bou-Habib<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Virologia Molecular, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brazil; <sup>2</sup>Laboratório de Estrutura e Regulação de Proteínas, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; <sup>3</sup>Laboratório de Nucleosídeos, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brazil; <sup>4</sup>Laboratório de Virologia Molecular Animal, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; <sup>5</sup>Laboratório de Imunologia Clínica, Departamento de Imunologia, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

**Abstract:** We describe in this paper that the chloroquinolinic ribonucleoside 6-chloro-1,4-dihydro-4-oxo-1-( $\beta$ -D-ribofuranosyl)-3-quinoline-carboxylic acid (compound **1**) inhibits the HIV-1 replication in human primary cells. We initially observed that compound **1** inhibited HIV-1 infection in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in a dose-dependent manner, resulting in an  $EC_{50}$  of  $1.5 \pm 0.5 \mu\text{M}$  and in a selectivity index of 1124. Likewise, compound **1** blocked HIV-1<sub>mac</sub> replication in macrophages in a dose-dependent manner, with an  $EC_{50}$  equal to  $4.98 \pm 0.9 \mu\text{M}$ . The replication of HIV-1 isolates from subtypes C and F was also inhibited by compound **1** with the same efficiency. Compound **1** inhibited an early event of the HIV-1 replicative cycle since it prevented viral RNA synthesis in PBMCs exposed to HIV-1. Kinetic assays demonstrated that compound **1** inhibits the HIV-1 reverse transcriptase (RT) in dose-dependent manner, with a  $K_i$  equal to  $0.5 \pm 0.04 \mu\text{M}$ . Using a panel of HIV-1 strains harboring NNRTI resistance mutations, we found a low degree of cross-resistance between compound **1** and clinical available NNRTIs. In addition, compound **1** exhibited additive effects with the RT inhibitors AZT and nevirapine, and synergized with the protease inhibitor atazanavir. Currents encourage continuous studies about the kinetic impact of compound **1** towards different catalytic forms of RT enzyme as a strategy that our nucleoside represents a promising molecule for future antiretroviral drug design.

**Keywords:** HIV-1, reverse transcriptase, chloroquinolinic ribonucleoside, inhibitor.

### INTRODUCTION

The human immunodeficiency virus type -1 (HIV-1) is a *Lentivirus* that causes the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and has become a serious threat to global public health in the last decades [1, 2]. HIV-1 infects CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, monocytes/macrophages and dendritic cells, using the CD4 molecule and the chemokine receptors CXCR5 or CXCR4 to enter the target cells [3]. During the HIV-1 replicative cycle, viral RNA undergoes reverse transcription, which is accomplished by the action of the viral enzyme reverse transcriptase (RT), and the resulting cDNA is further integrated in the host cell genome. New progeny viruses are assembled, bud through the cell membrane and mature due to the effect of viral protease [4].

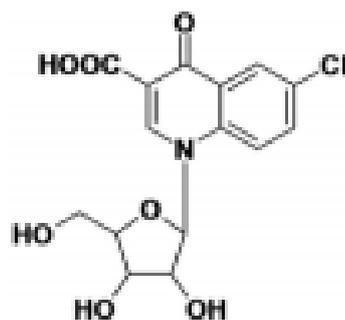
The inhibition of HIV-1 life cycle constitutes one of the major purposes of the antiretroviral therapy. Inhibitors of RT can be grouped in two different classes, the nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs), such as Zidovudine, Didanosine, Zalcitabine, Stavudine, Lamivudine, Abacavir, Emtricitabine [5], and the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), such as nevirapine, efavirenz and Delamanid [5]. The highly active antiretroviral therapy (HAART) combines multiple anti-HIV-1 drugs, including NRTIs and NNRTIs, which generally exhibit synergy with each other due to their different mechanisms of action towards RT [6]. However, antiretrovirals do not completely eradicate HIV-1 from the infected tissues [7] and their long term administration may lead to several metabolic disorders, cytotoxicity, and emergence of drug-resistant viruses [8]. Taken together, these data motivate the continuous search for novel antiretroviral agents and the study of their mechanism of action, providing other molecules that can be used in combination with currently available anti-HIV-1 drugs.

Nucleoside analogs are a fruitful source of antiviral molecules, and these derivatives often inhibit viral polymerases, such as RT [9]. In parallel, it has been shown that

\*Address correspondence to this author at the Departamento de Imunologia, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Av. Brasil 4665 - Mangueiras, Pavilhão Láboreis Dona (409), Rio de Janeiro, RJ - 21045-900, Brazil; Tel: (55 21) 24624124; Fax: (55 21) 2109-4110; E-mail: dumith@ioc.fiocruz.br

These authors contributed equally to this work.

quinoline acid derivatives are endowed with antiretroviral activity due to their effects towards the enzyme RT [10]. As we have synthesized the novel oxoquinoline ribonucleoside 6-chloro-1,4-dihydro-4-oxo-1-( $\beta$ -D-ribofuranosyl) quinoline-3-carboxylic acid (denominated compound **A**; Fig. 1) [11], we investigated whether this molecule would present the ability to inhibit RT activity and HIV-1 infection *in vitro*. Here, we report that compound **A** blocks HIV-1 replication in primary human cells by targeting RT enzyme with low degree of cross-resistance between compound **A** and NNRTIs. Additionally, we found that our molecule synergizes with the protease inhibitor (PI) atazanavir and presents additive effects with both classes of RT inhibitors, NRTI and NNRTI.



**Fig. (1).** The molecular structure of the chloroquinoline derivative compound **A** (6-chloro-1,4-dihydro-4-oxo-1-( $\beta$ -D-ribofuranosyl)quinoline-3-carboxylic acid).

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents

The compound 6-chloro-1,4-dihydro-4-oxo-1-( $\beta$ -D-ribofuranosyl)quinoline-3-carboxylic acid (henceforth denominated compound **A**; Fig. 1) was synthesized as previously described [12]. The reverse transcriptase inhibitors 3'-azido-2'-deoxythymidine (AZT) and 3'-azido-2'-deoxythymidine 5'-triphosphate (AZT-TP) were from Sigma Chem. Co (St. Louis, MO) and Sierra Bioresearch (Tucson, AZ), respectively. The NNRTI nevirapine was kindly donated by Dr. Nubia Boechat (Department of Organic Synthesis, Farmanguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, BR). The protease inhibitor (PI) atazanavir sulfate and the purified recombinant HIV-1 enzyme reverse transcriptase (RT<sub>core</sub>) were obtained from NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (Division of AIDS, NIAID, NIH, and Dr. Stuart Le Grice, respectively).

### Cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy human donors were obtained by density gradient centrifugation (Hystopaque, Sigma) from buffy coat preparations. Cells were resuspended in RPMI 1640 (LGCBio, São Paulo, BR) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Logan, UT), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100  $\mu$ g/ml), 2 mM glutamine and 10 mM HEPES, stimulated with 2  $\mu$ g/ml of phytohemagglutinin (PHA, Sigma) during two to three days. PHA-stimulated cells were further maintained in culture medium containing 5 U/ml of recombinant human interleukin-2 (Sigma). Mono-

cyte-derived human macrophages were isolated from PBMCs by plastic adherence, as described [13], with minor modifications. Briefly,  $2 \times 10^6$  PBMCs were plated in 48-well culture plates in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, LGCBio) supplemented with 10% human serum (Sigma) during 5 to 7 days in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. The non-adherent cells were then removed and the adherent cells were maintained in DMEM with 10% human serum. The macrophage purity was above 90%, as checked by FACS analysis using murine anti-CD3-FITC (PharMingen, San Diego, CA) and anti-CD16-PE (PharMingen) monoclonal antibodies.

### Virus Isolates

Cell infections were performed with the CCR5-dependent HIV-1 isolates Ba-L [14], BS08 [15] and RJ021 [16], subtypes B, C and F, respectively. Virus stocks were prepared in PHA-activated PBMCs from normal donors, as described elsewhere [17].

### Effects of Compound **A** on Cell Viability

To evaluate the safety of compound **A** to human cells, PHA-stimulated PBMCs were plated in 96-well culture plates ( $2 \times 10^6$  cells/well) and exposed to increasing concentrations of compound **A** for seven days. Alternatively, we also measured the compound **A** CC<sub>50</sub> towards the African green monkey kidney cells (Vero cells). Cell viability was examined using the Trypan blue dye exclusion assay, and the resulting CC<sub>50</sub> values were calculated by linear regression.

### Effect of Compound **A** on HIV-1 Replication

PBMCs were initially exposed during two to three hours to viral suspensions containing 10 ng/ml of HIV-1<sub>BaL</sub> p24 Ag. Cells were washed, resuspended in complete medium, plated in 96-well culture plates ( $2 \times 10^6$  cells/well) in triplicates, and treated with compound **A** at various concentrations. After 7 days at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>, viral replication was assessed by measuring the HIV-1 p24 Ag in culture supernatants using an ELISA capture assay (ZephyrMetric Co., Buffalo NY). PBMCs infected with HIV-1 subtypes CR030 or F0021 were treated with compound **A** at a single concentration (EC<sub>50</sub>, 1.5  $\mu$ M). Macrophages were infected with HIV-1<sub>BaL</sub> by exposing them to viral suspension containing 10 ng/ml of HIV-1<sub>BaL</sub> p24 Ag. After overnight incubation at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, residual virus was washed out, cell monolayers were replenished with fresh medium, and infected macrophages were treated with compound **A** at various concentrations. Cells were then cultured for two weeks without further addition of compound **A**, replacing half medium at seventh day. Viral replication was evaluated by measuring the HIV-1 p24 Ag in culture supernatants, as described above. The NRTI AZT was used as a reference compound for inhibition of viral replication.

### Combination of Compound **A** with Other Antiretrovirals

To evaluate whether the combination of compound **A** with NRTI (AZT), NNRTI (nevirapine), or with a protease inhibitor (atazanavir) could produce either additive or synergistic effects on HIV-1 replication, PBMCs infected with HIV-1<sub>BaL</sub> were treated with compound **A** at EC<sub>50</sub> concentration associated with sub-optimal concentrations of the above mentioned drugs, as described elsewhere [18]. After seven days, viral replication was evaluated as above. We consid-

ered additive effect when the inhibition achieved with the combination was equal or similar to the sum of individual effect, and a synergistic effect when the inhibition achieved by the combination was greater than the sum of the inhibition effect of each drug alone.

#### Evaluation of HIV-1 DNA Synthesis

PBMCs were exposed during 2 h to HIV-1<sub>MAC</sub> cells were washed, resuspended in complete medium, plated in 48-well culture plates ( $1.3 \times 10^4$  cells/well) in triplicates, and treated either with compound **A** (100  $\mu$ M), zalcitabine sulfate (10  $\mu$ M) or with AZT (1  $\mu$ M). After 7 days at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>, cells were collected and DNA was extracted using the UltraClean GelSpin DNA purification kit (MO Bio Laboratories, INC, Carlsbad, CA), according to manufacturer's instructions. Total HIV-1<sub>MAC</sub> DNA in these samples was detected by nested-PCR using primers and amplification conditions as described elsewhere [19]. The final 290bp products were separated by 1% agarose gel, stained with ethidium bromide, and visualized on the UV transilluminator. Viral replication in the same samples was evaluated as already mentioned.

#### Anti-HIV-1 RT Inhibitory Activity

The inhibitory effect of compound **A** on RNA-dependent DNA polymerase (RDDP) activity of RT<sub>MAC</sub> was evaluated using a purified recombinant HIV-1 enzyme, as reported [20] with minor modifications. In summary, RDDP activity was assayed in reaction mixture containing 50 mM Tris HCl (pH 7.8), 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol, 50 mM KCl, 5  $\mu$ M dTTP, 80  $\mu$ g/mL poly(rA) oligo(dT)<sub>20</sub>, template primer (Pharmacia, Piscataway, NJ) and 3 U of enzyme (one unit defined as the amount of enzyme that incorporates 1 pmol of dTTP per minute per  $\mu$ g of enzyme at 37 °C under standard assay conditions). The isotopic dilutions for all reactions were prepared with the ratio of 2 $\mu$ Ci [<sup>3</sup>H]dTTP (40Ci/mmol)/2.7  $\mu$ M dTTP. All reactions were started at 37 °C, incubated for 30 min and stopped by adding 0.5M EDTA. The precipitate were collected on Whatman DE 81 filter, washed with sodium phosphate 0.1 M, and incorporated nucleotides were measured by liquid scintillation (Packard in carb 2100). The K<sub>i</sub> values were determined by Dixon's plot. The polymerization reactions were performed in the absence or presence of different concentrations of compound **A**, as well in the presence of AZT-TP or nevirapine.

#### Phenotypic Analysis of Isolates Carrying NNRTI-Related Drug Mutations

In order to analyze the cross-resistance between compound **A** and NNRTIs, we used a recombinant virus assay technology. For this purpose, we generated viruses carrying NNRTI mutations located at the RT palm-finger region (RT codons 37-225). Three mutant viral isolates were utilized carrying different pattern of NNRTI mutations, as well a wild type strain (see Table 1). Donor sequences were obtained from PCR targeting a 1009 kb fragment originated from primers (RT19F and RT20R); pNL43 infectious clone was used as a subtype B wild type (wt) genotype. These fragments were co-transfected into CD4<sup>+</sup> T-cell lymphocytes (MT4) with the pGEMT3/HXB2/ART *Sma*I-linearized plasmid carrying the defective (ART) HIV HXB2 genomic

DNA generating a chimeric virus [21,22]. Before starting the phenotypic assay, sequencing was performed to confirm the absence of drug resistance mutations (DRM) and integrity of the RT gene in all chimeric viruses. The susceptibility of chimeric viruses to the FDA-approved NNRTI compounds nevirapine and efavirenz, as well to the compound **A** was determined in three independent assays in MT4 cells using the Rivanorin-based cell viability assay, as previously described [23]. Statistical treatments to calculate the IC<sub>50</sub> of the clones and isolates were performed using the Analyze-it® v. 1.62 for Microsoft Excel statistics package and SigmaPlot® software. Briefly, the percentage of viable cells developed by Rivanorin after 5 days post-infection was plotted in a semi-log graphic against the concentration of drugs tested. A Hill's 3-parameter non-linear regression was performed to obtain the sigmoid curve of viable cells, and the IC<sub>50</sub> value for each drug and virus tested was estimated. The IC<sub>50</sub> values means are always shown together with the standard deviation of the replicates (mean  $\pm$ SD). Fold resistance was calculated dividing the IC<sub>50</sub> from the isolates carrying NNRTIs mutations by the IC<sub>50</sub> obtained from pNL43 (wt).

Table 1. Antiviral Activity of Compound **A** and Current NNRTIs Against NNRTI-Resistant HIV-1 Strains

Sample	Subtype <sup>a</sup>	NNRTI Mutations	NVP	EFV	C.A.
IR-021	B	WT	3 <sup>b</sup>	1.5	1.1
NNRTI-022	B	K103N,Y106M,Y188L	43	13	4
NNRTI-033	F	V106A,Y181I	3	1.6	4

HIV-1 isolates belonging to six major NNRTI resistance-associated subtypes, and 4 to 10  $\mu$ g of a control isolate (IR021) are described in Material and Methods.

<sup>a</sup>The subtype assignment of the isolates were generated using the HIV-1 sequencing tool located at HIV-1 Drug Resistance Database (<http://hivdb.org/>).

<sup>b</sup>Mean  $\pm$  SD presented a fold resistance using IC<sub>50</sub> of genotype NL43 wild type isolate as reference (IC<sub>50</sub> NNRTI: nevirapine/C<sub>50</sub> NL43 gene details in Material and Methods).

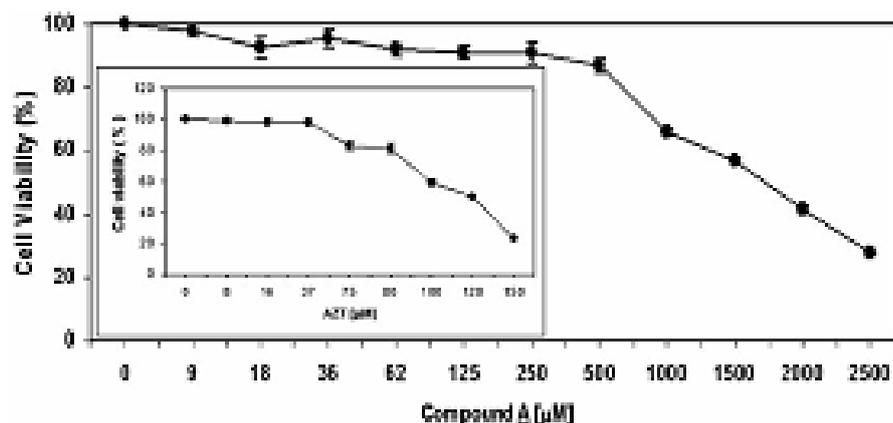
## RESULTS

### Cellular Cytotoxicity

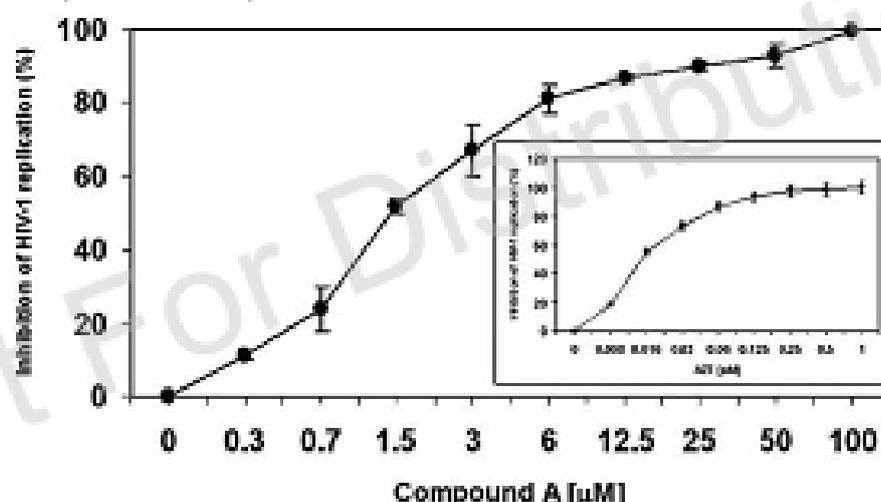
In order to evaluate the cytotoxicity of compound **A** towards human cells, PHA-stimulated PBMCs were treated with various concentrations of this compound and, after seven days, cell viability was analyzed by Trypan Blue dye exclusion assay. PBMCs viability was not affected by concentrations of compound **A** up to 500  $\mu$ M, declining thereafter (Fig. 2). The resulted CC<sub>50</sub> for this compound was equal to  $1701 \pm 237$   $\mu$ M, while the CC<sub>50</sub> for AZT at similar assay conditions was equal to  $126 \pm 3$   $\mu$ M (Fig. 2). The low cytotoxicity of compound **A** is not restricted to PBMCs since its CC<sub>50</sub> on Vero cells was equal to  $1500 \pm 132$   $\mu$ M.

### Antiviral Activity of Compound **A**

The antiviral activity of compound **A** was examined by employing the major cell hosts for HIV-1 replication, PBMCs and macrophages. Compound **A** strongly inhibited replication in HIV-1<sub>MAC</sub>-infected PBMCs in a dose-dependent manner, with inhibition levels ranging from 7% with 0.3  $\mu$ M to 100% with 100  $\mu$ M (Fig. 3). Values of inhibitory effect resulted in an EC<sub>50</sub> of  $1.5 \pm 0.5$   $\mu$ M and a selective index (SI) equal to 1134, demonstrating that it blocks HIV-1<sub>MAC</sub> growth at concentrations far below from the observed threshold of cell toxicity. Next, we evaluated the ef-



**Fig. (2).** Effect of compound **A** on cellular viability. PBMCs were treated with indicated concentrations of compound **A** and cell viability was measured by Trypan blue exclusion test after 7 days. The inset displays the effect of AZT on cell viability. Data represent means  $\pm$  SEM of three independent experiments for both compounds.



**Fig. (3).** Effect of compound **A** on HIV-1 replication in PBMCs. Cells were infected with HIV-1<sub>BaL</sub>, exposed to the indicated concentrations of compound **A**, and viral replication was measured in culture supernatant after 7 days. The inset displays the anti-HIV-1<sub>BaL</sub> effects of AZT, used as a reference compound. Data represent means  $\pm$  SEM of three independent experiments for both compounds. Virus production in the positive control (HIV-1<sub>BaL</sub>-infected cells cultured only with medium):  $105 \pm 27$  ng/mL p24 Ag.

fects of compound **A** in HIV-1<sub>BaL</sub>-infected macrophages, and we also found a dose-dependent inhibition, ranging from 15% with 0.8  $\mu$ M to 100% with 1.5  $\mu$ M, plateauing thereafter, resulting in a  $EC_{50}$  of  $4.98 \pm 0.9$   $\mu$ M (Fig. 4). Because HIV-1-infected macrophages can persist even during antiretroviral therapy, representing one of the main HIV-1 reservoirs, inhibition of HIV-1 replication in this cell type must be an imperative property of new antiretroviral derivatives [7]. For comparison, AZT  $EC_{50}$  for HIV-1<sub>BaL</sub>-infected PBMCs and macrophages were equal to 0.05  $\mu$ M and 0.002  $\mu$ M, respectively. AZT selective index (SI) for PBMCs was equal to 2520. These results demonstrate that, although compound **A** presents a lower SI than AZT, it is high enough to

speculate that this molecule would be a promising compound for future antiretroviral development [9,24].

#### Compound **A** Inhibits Other HIV-1 Subtypes

To examine whether compound **A** inhibits other subtypes of HIV-1, than subtype B, PBMCs infected with either subtype C<sub>0608</sub> or F<sub>022</sub> were treated with compound **A** at  $EC_{50}$  concentration (1.5  $\mu$ M). We observed that the replication of the isolates C and F were inhibited by 50% (Fig. 5), demonstrating that these isolates were equally sensitive to compound **A**. For comparison, in additional experiments, compound **A** at  $EC_{50}$  concentration also inhibited isolate Ba-L at the same level (Fig. 5).

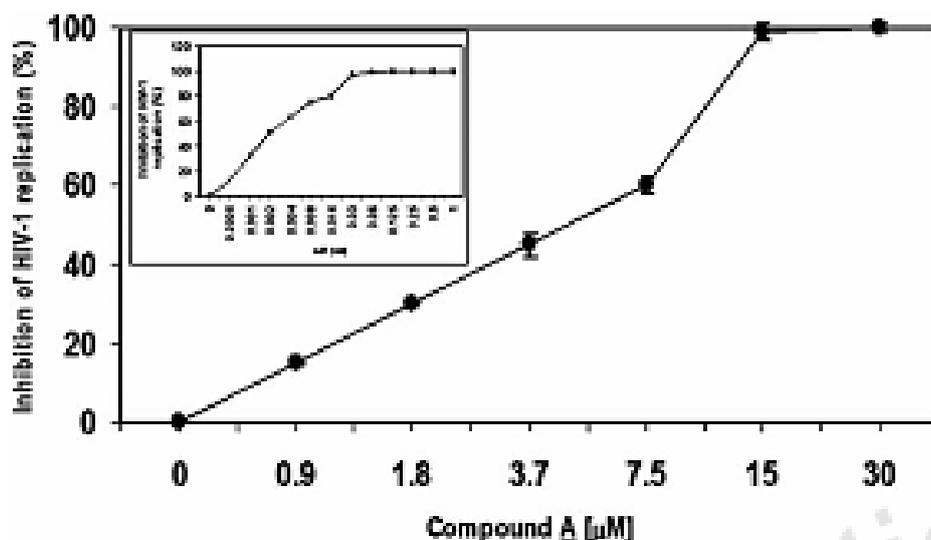


Fig. (4). Effect of compound **A** on HIV-1 replication in macrophages. Cells were infected with HIV-1<sub>9242</sub>, exposed to the indicated concentrations of compound **A**, and viral replication was measured in culture supernatant after 14 days. The inset displays the anti-HIV-1<sub>9242</sub> activity of AZT, used as a reference compound. Data represent means  $\pm$  SEM of three independent experiments for both compounds. Virus production in the positive controls (HIV-1<sub>9242</sub>-infected cells cultured only with medium): 59  $\pm$  38 ng/mL p24 Ag.

#### Compound **A** Inhibits Early Events During HIV-1 Replication

In order to elucidate at which step of HIV-1 replicative cycle compound **A** acts, PBMCs infected with the isolate B<sub>9242</sub> were treated either with AZT, atazanavir or compound **A** at concentrations able to promote a complete inhibition of HIV-1<sub>9242</sub> replication (i.e. 10 and 100  $\mu$ M, respectively). Then, after seven days, culture supernatant was collected to measure viral replication and cells were lysed for detection of total viral DNA by nested-PCR. We observed that compound **A**, likewise AZT, completely prevented HIV-1<sub>9242</sub> DNA synthesis (Fig. 6) indicating that compound **A** inhibits early events of HIV-1 replication. Moreover, viral replication was completely abolished, as confirmed by the absence of p24 Ag in cell culture supernatant (Fig. 6). As expected, the R atazanavir sulfate did not prevent proviral integration, although it has been able to block virus replication.

#### Impact of Compound **A** on HIV-1 Reverse Transcriptase Activity

Since compound **A** inhibits HIV-1 DNA synthesis, the HIV-1 enzyme reverse transcriptase (RT) arises as a probable target for this quinoline derivative. We thus investigated the effect of compound **A** on RT<sub>9242</sub> activity under first order kinetics with respect to dTTP uptake. We found a dose-response inhibition of the RNA-dependent DNA polymerase of RT<sub>9242</sub> with a  $K_i$  of  $0.5 \pm 0.04 \mu$ M (Fig. 7), indicating that compound **A** targets HIV-1 RT. Taken the data from AZT-TP and nevirapine as a reference (Fig. 7), we observed comparable  $K_i$  values,  $0.01 \pm 0.003 \mu$ M and  $0.5 \pm 0.02 \mu$ M, respectively (Fig. 7). It is interesting to note that compound **A** inhibited RNA-dependent DNA polymerase activity of RT even not submitted to any phosphorylation

step prior to the assays, indicating that, although being a nucleoside analog, compound **A** mechanism of action may differ from that of AZT.

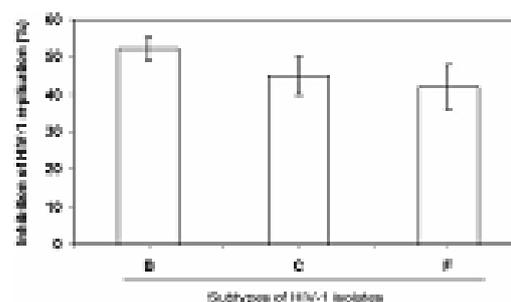
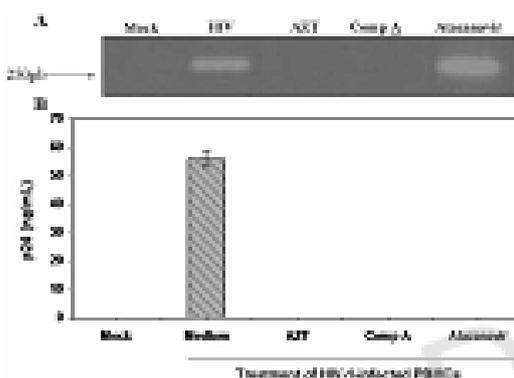


Fig. (5). Effect of compound **A** on replication of different subtypes of HIV-1. PBMCs were infected with HIV-1 (subtypes B<sub>9242</sub>, C<sub>9242</sub> or F<sub>9242</sub>), exposed to the compound **A** at EC<sub>50</sub> dose (1.5  $\mu$ M), and virus replication was measured in the culture supernatants after 7 days. Data represent means  $\pm$  SEM of three independent experiments. Virus production in the positive control (HIV-1-infected cells cultured only with medium): 120  $\pm$  23, 57  $\pm$  3 and 48  $\pm$  5 ng/mL p24 Ag for subtype B, C and F, respectively.

#### Combination of Compound **A** with Other HIV-1 Inhibitors

We next investigated whether compound **A** could have additive effects with other HIV-1 inhibitors, such as AZT or nevirapine. Thus, HIV-1<sub>9242</sub>-infected PBMCs were treated with sub-optimal concentrations of AZT, nevirapine or atazanavir sulfate, in combination with a fixed concentration of

compound **Δ** ( $EC_{50}$  1.5  $\mu$ M) [18]. Interestingly, the combination of compound **Δ** with AZT or with nevirapine resulted in a potent additive inhibitory effect, from 30% to 60% inhibition with AZT alone, to ~60% inhibition with both inhibitors together, and from 42% to 67% of inhibition with nevirapine alone, to 72% to 95% of inhibition with the latter plus compound **Δ** (Fig. 8). These results suggest that compound **Δ** mechanism of action might be different from both NRTIs and NNRTIs and that this molecule might represent a leading structure for the development of new antiretrovirals. Moreover, the association between compound **Δ** and the protease inhibitor atazanavir sulfate produced an evident synergistic effect, from 25% to 50% inhibition with atazanavir sulfate alone to a complete blockage of HIV-1<sub>IND</sub> replication upon association of both compounds (Fig. 8).

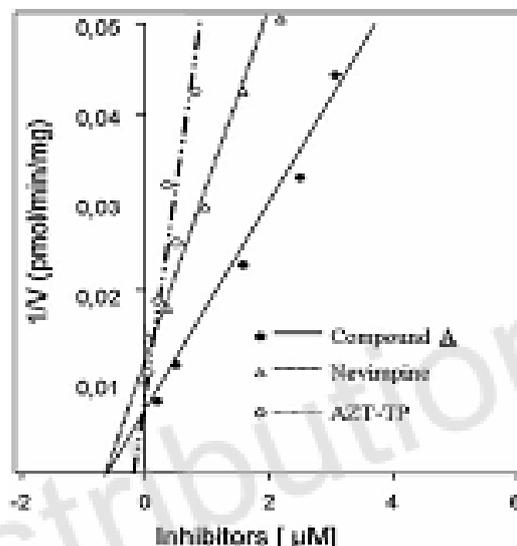


**Fig. (8).** Effect of compound **Δ** on HIV-1 proviral integration. PBMCs were infected with HIV-1<sub>IND</sub>, exposed to compound **Δ** (100  $\mu$ M), atazanavir sulfate (10  $\mu$ M) or AZT (1  $\mu$ M). Viral integration (A) was detected by nested-PCR of the *pro* gene, and the gel shown is representative of two assays with similar results. HIV-1<sub>IND</sub> replication (B) was measured after 7 days in the supernatants of the serial cultures, shown as mean  $\pm$  SEM.

#### Compound **Δ** Antiretroviral Effect on HIV-1 Isolates Carrying Mutations Related to NNRTI Resistances

Because compound **Δ** does not require phosphorylation, we could consider that our molecule behaves like a NNRTI. Thus, in order to study cross-resistance, we selected three samples among patients failing antiretroviral regimens using NNRTIs (nevirapine and efavirenz). One sample from the same cohort with no NNRTI mutations (BR321) was used as a negative control. The mutation profile found in these 3 isolates is shown in Table 1. Several different patterns of known NNRTI mutations (K103N, V106M/A, Y181C and Y188L; see Hirsch *et al.*, 2000 for details [25]) are found in the palm-finger RT domain. The RT palm-finger region was amplified, and a series of chimeric viruses was generated carrying the NNRTI mutations in their backbone. These isolates were then used to generate the  $IC_{50}$  of nevirapine, efavirenz and compound **Δ**. The fold resistance was calculated as described in material and methods. As depicted in Table 1, we found samples showing high phenotypic resistance to nevirapine and efavirenz, and only slight cross-resistance to compound **Δ**. In fact, the  $IC_{50}$  values for com-

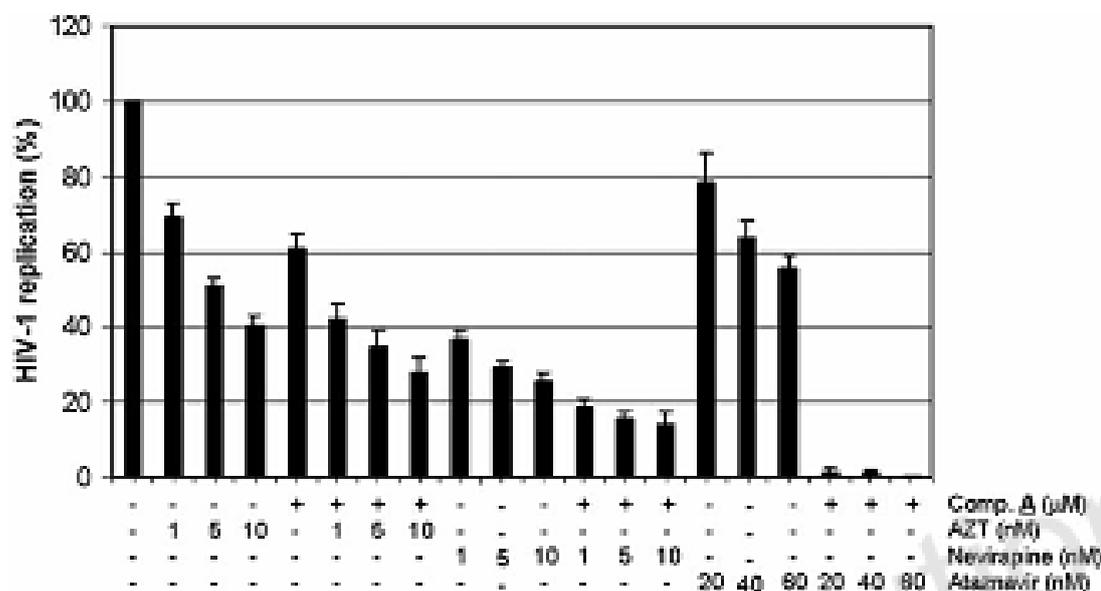
ound **Δ** in mutant strains were similar to the one found in the wild-type prototypic HIV-1 isolate (NL43). Our results clearly demonstrate that compound **Δ** is endowed with the ability to inhibit the replication of HIV-1 isolates carrying common NNRTI-associated resistance mutations, even when they are present in combination in the same HIV-1 strain.



**Fig. (7).** Effect of compound **Δ** on HIV-1 RT activity. Recombinant RT<sub>10032</sub> was incubated with various concentration of compound **Δ** for 30 min, and RNA-dependent DNA polymerase activity was assayed as described in Materials and Methods. Data represent mean  $\pm$  SEM of five independent experiments, and the inhibition of RT activity ( $K_i$  values) was calculated by Dixon's plot, using SigmaPlot 8.0.

#### DISCUSSION

Several authors have reported the properties of quinoline derivatives towards a number of microorganisms, including viruses, such as Herpesvirus, Coronavirus and Hepatitis C virus [26-31], but the examples of such derivatives that target HIV-1 are limited [32]. Importantly, it has been shown that the presence of a chloride radical at the chemical structure of quinoline derivatives generally improves their antiviral activity [33]. We, thus, investigated the antiretroviral effect of an oxoquinoline ribonucleoside derivative (compound **Δ**), which we previously synthesized based on the structure of a molecule possessing the pharmacophoric groups of many compounds with a number of biological activities [11]. Compound **Δ** presents a chloride radical at carbon 6 and a carboxylic acid group at carbon 3 of the quinoline moiety (Fig. 1), and it was empirically selected for testing against a broad range of viruses, including HSV [31] and HIV-1. We report here that compound **Δ** inhibits the HIV-1 replication in human primary cells by means of targeting the enzyme RT. It prevents the formation of HIV-1 DNA, shows an additive or synergistic effects with other antiretroviral agents, and has only a low degree of cross-resistance with NNRTIs.



**Fig. (8).** Combination of compound **A** with other antiretrovirals. PBMCs were infected with HIV-1<sub>90L</sub>, exposed to the compound **A** at EC<sub>50</sub> dose (1.5 μM) combined with sub-optimal concentrations of AZT, nevirapine or atazanavir. Viral replication was measured in culture supernatant after 7 days, and data represent means ± SEM of three independent experiments. Virus production in the positive controls (HIV-1<sub>90L</sub>-infected cells cultured only with medium): 2184 ± 18 ng/ml p24 Ag.

Initially, we analyzed the ability of compound **A** to inhibit HIV-1<sub>90L</sub> replication in PBMCs and macrophages, and we found a potent dose-dependent viral inhibition (Figs. 3 and 4). The EC<sub>50</sub> of compound **A** in PBMCs (1.5 μM) was higher than the EC<sub>50</sub> observed for AZT under our assay conditions (0.05 μM), but it was close to the EC<sub>50</sub> of a dozen of compounds able to inhibit HIV-1 replication with satisfactory selectivity indexes [34, 35]. Moreover, compound **A** presented a comparable activity with other nucleoside analogs under investigation [36] or clinical trials [35]. The SI for compound **A** was equal to 1134, which is approximately 90% of that for AZT (2520), under our assay conditions, reflecting the extremely low cytotoxicity of compound **A** relative to AZT (CC<sub>50</sub> equal to 1701 μM and 126 μM, respectively). These pharmacological properties indicate that our compound is effective *in vitro*, comparably to novel RT inhibitors, such as RVT [35], and that it may represent a promising molecule for future anti-HIV-1 drug design. It is important to remark that the ability of compound **A** to inhibit HIV-1 replication was not restricted to subtype B, since it also inhibited the replication of subtypes C<sub>9808</sub> and F<sub>023</sub> at the same concentration range. In addition, the antiviral activity of compound **A** goes beyond HIV-1 inhibition, since we have recently reported its ability to block herpes virus infection *in vitro* [31].

To understand at which stage of HIV-1 life cycle compound **A** might act, we sought for the presence of viral DNA in HIV-1<sub>90L</sub>-infected PBMCs treated with this compound. We detected no viral DNA, indicating that this molecule inhibits an early event during HIV-1 replicative cycle, which

could be viral attachment/entry [1], the reverse transcription [37] or the HIV-1 proviral integration [38].

Since RT is a critical enzyme during the early HIV-1 replicative cycle, and that it is targeted by nucleoside analogs [37, 38], we investigated whether compound **A** could inhibit the RT. For this purpose, we used Dixon's plot to determine the compound **A** K<sub>i</sub> value, and we found that this parameter and EC<sub>50</sub> value showed good correlation (K<sub>i</sub> = 0.5 μM, EC50 = 1.5 μM), which was similar to that observed for AZT-TP in our assay conditions (K<sub>i</sub> = 0.01 μM, EC50 = 0.05 μM). The similarity between K<sub>i</sub> and EC<sub>50</sub> values is a strong indication that the enzyme RT is the main target of compound **A**, as proposed for other compounds [39, 35]. Moreover, the compound **A** K<sub>i</sub> value was comparable to that of other nucleoside analogs under clinical trials [35] or to the K<sub>i</sub> of non-nucleoside analogs available for clinical use, such as nevirapine (0.5 μM, determined under comparison our assay conditions). Minor chemical modifications at oxoquinoline ring, such as hydroxylation or acetylation, are in progress in our laboratory, to reduce compound **A** K<sub>i</sub> value, improving its anti-RT activity and, consequently, its antiretroviral efficiency as has successfully been done for other drugs [40].

Nucleoside analogs are prodrugs that require conversion to their triphosphate forms by cellular kinases to target the enzyme RT, thus they may become active even in uninfected cells. This metabolic modification can be cytotoxic, because some resulting nucleotides, like as AZT-TP, may inhibit bone marrow production [41]. Indeed, because of this requirement some NRTIs, such as AZT, can cause mitochondrial disorders within short periods of time after addition to

cell cultures [24, 43]. Therefore, it is remarkably important that compound **A** is able to target the enzyme RT and to inhibit HIV-1 replication in its nucleoside form, without requiring any phosphorylation reaction. This characteristic, together with its high  $EC_{50}$  value, suggests that compound **A** might not have deleterious effects on cellular metabolism.

Studies in progress in our laboratory have suggested that compound **A** is an uncompetitive inhibitor of dTTP uptake, independent of the template/primer used (manuscript in preparation). The uncompetitive nature of inhibition may, therefore, explain the difference in  $EC_{50}$  values observed for compound **A** in PBMCs and macrophages. The uncompetitive mode of action presumes that inhibitory potency promoted by our compound is extremely dependent on dNTP levels inside the cells. Since dTTP levels in macrophages are lower than those observed for dividing cells (such as activated PBMCs), we would expect higher  $EC_{50}$  values for non-dividing cells when compared to those that replicate actively [44,45].

Taken together, our results demonstrate that, although compound **A** is a nucleoside analog, its mechanism of action is unique, or closely related to NNRTIs. Therefore, we hypothesized whether compound **A** could present additive effects or synergism with classical NRTI or NNRTI. Indeed, compound **A** showed additive effects with AZT and nevirapine, increasing by ~50% their antiretroviral activity. Additionally, when we tested the effects of our compound towards a panel of NNRTIs-resistant strains of HIV-1, we observed only low-degree of resistance to mutations K103N, V105M, Y188L and Y181I, when compared to nevirapine and efavirenz. Interestingly, since we observed only a 4-fold increase in compound **A**  $EC_{50}$  in the presence or absence of mutation K103N which confers a high degree of resistance to NNRTIs, compound **A** might not be using this amino acid residue during its docking, which could be a relevant advantage of our compound over drugs sensitive to this mutation (see Table 1).

Furthermore, compound **A** presented a synergistic effect with the protease inhibitor atazanavir, remarkably improving its anti-HIV-1 activity, from ~25% of inhibition of viral replication to a complete blockage of HIV-1 infection. Since drug combinations have always been one of the main cornerstones of the antiretroviral therapy [46], these findings mean that compound **A** could be associated with drugs that interfere with different steps of the HIV-1 replicative cycle, or with different regions of the enzyme RT.

Finally, on the basis of our present results, we believe that compound **A** may represent a promising molecule for future anti-HIV-1 drug design since its mode of HIV-1 inhibition might differ from classical NRTIs and NNRTIs. The unique chemical structure of compound **A** encourages continuous studies about the kinetic impact of this ribonucleoside analog towards different catalytic forms of RT enzyme [47], and the development of new oxoquinoline derivatives able to inhibit HIV-1 replication even with higher efficiency. Studies with these aims are already in progress in our laboratory.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Hemotherapy Service of the Hospital Clementino Fraga Filho (Federal University of Rio de Ja-

neiro) for providing buffy coats. This work was supported by grants from FAPES/Fincruz, CNPq and Faperj. The antiretroviral Atazanavir sulfate and the purified HIV-1 enzyme RT (100) were obtained from NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (Division of AIDS, NIAID, NIH, and Dr. Stuart Le Grice respectively). TMLS is a PhD student of the Biological Chemistry Program, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brazil, and is supported by FAPERJ.

#### REFERENCES

- [1] Sarr-Sphar LD, Colman RG. HIV-1 entry and entry inhibitors as therapeutic agents. *Clin Lab Med* 2002; 22: 681-701.
- [2] Savinon M. HIV-1 pathogenesis. *Nat Med* 2003; 9: 853-866.
- [3] Burger EA, Murphy PM, Furber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 657-700.
- [4] Parolin BM, Trono D. Hides, shields and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 97-107.
- [5] Finzer C. HIV drug development: he has 12 years. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 926-966.
- [6] Barbara G, Saccomani A, Mastroianni A, Squarzi CT. Highly active antiretroviral therapy: current status of the art, new agents and their pharmacological interactions useful for improving therapeutic outcome. *Curr Pharm Des* 2003; 11: 1803-1843.
- [7] Bakken JS, Paredo D, Siliciano R. The challenge of viral reservoir in HIV-1 infection. *Annu Rev Med* 2002; 53: 287-293.
- [8] Richman DD. HIV chemotherapy. *Nature* 2001; 410: 695-1001.
- [9] De Clercq E. HIV inhibitors: targets at the reverse transcriptase. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 9: 119-124.
- [10] Althaus PW, Gonzalez AJ, Chou JJ, *et al*. The quinoline C-70026 is a potent inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* 1993; 268: 14873-14880.
- [11] Carlini CV, Gomes C, Marques JP, *et al*. Synthesis and anti-HIV-1 activity of 14-ethyl-4-oxoquinoline ribonucleosides. *Le Drug Des Discov* 2007; 4: 64-69.
- [12] Mars AD, Santos CVB, Pereira HS, *et al*. Synthesis of Novel Nucleosides of 4-oxoquinoline-2-Carboxylic Acid Analogues. *Macromol Chem* 1999; 10: 197-202.
- [13] Varati A, Soriani G, Comer M, *et al*. CCR chemokine receptors by lipopolymerized (LPS)-stimulated human macrophages suppress HIV-1 infection in both macrophages and T cells. *J Exp Med* 1997; 185: 802-816.
- [14] Lima RG, Van Wayenberg J, Sariva EM, Barral-Neto M, Galvão-Castro B, Joo-Stubbs DC. The replication efficiency of immunodeficiency virus type 1 in macrophages is enhanced after phagocytosis of apoptotic cells. *Infect Dis* 2002; 183: 1361-1366.
- [15] Monteiro JP, Ferraro GA, Oliveira T, *et al*. Genetic and Biological Characterization of HIV-1 Subtype C Isolates from South Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; 22: 135-142.
- [16] Ferraro GA, Mello MAG, Sormelli F, *et al*. Biological characterization and chemokine receptor usage of HIV type 1 isolates prevalent in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; 17: 1241-1247.
- [17] WHO guidelines for standard HIV isolator procedures. 1994. WHO/CPS/AR/ID/W/94.642, Geneva.
- [18] Marques N, Santos R, Balboa LM, *et al*. Maslatol a naturally occurring 4-phenylisoquinoline, inhibits HIV-1 replication by targeting the NF- $\kappa$ B pathway. *Antiviral Res* 2003; 66: 137-145.
- [19] Sawyer L, Wyseur A, Bombout A, *et al*. Line probe assay for rapid detection of drug-resistant mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 288-291.
- [20] Cirna-Santos CC, Teixeira VL, Canali-Granco LR, Frugulhant E, Joo-Stubbs DC. Inhibition of HIV-1 replication in human primary cells by a dolabellane diuretic isolated from the marine algae *Dicyonella peltata*. *Planta Med* 2006; 72: 285-289.
- [21] Rocha CA, Kuster W, van Hemmel T, *et al*. Human immunodeficiency virus type 1 drug susceptibility determined by using recombinant viruses generated from patient sera used in a cell-killing assay. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2404-2409.
- [22] Caldas A, Brindley RM, Brindley PA, *et al*. Low accumulation of LTRM in the Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1)

- process from subtype F failing process inhibitors is caused by DRM polymorphism. *J Infect Dis* 2005; 191: 1961-1970.
- [22] Cheng H. Rational design of polymerase inhibitors as antiviral drugs. *Antiviral Res* 2006; 71: 90-93.
- [23] Ball C, Manhasa GV, Nelson MR. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors - an overview. *Int J STD AIDS* 2003; 14: 71-77.
- [24] Hirsch MS, Brun-Vaninet F, D'Aquila RT, et al. Antiretroviral drug resistance testing in 25 adult HIV-1 infections: recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *JAMA* 2000; 283: 2617-2626.
- [25] Biss C, Dohr W, Charvin N, et al. Design and synthesis of hydroxyflavone derivatives with antimalarial and antiviral activities. *J Med Chem* 2006; 49: 2845-2849.
- [26] Di Sano R, Conti R, Rossi A, et al. Novel bifunctional quinolonyl diene acid derivatives as HIV-1 integrase inhibitors: design, synthesis, biological activities, and mechanism of action. *J Med Chem* 2006; 49: 1639-1643.
- [27] Knorrman NM, Weiner AJ, O'Connell J, et al. Anti-HIV therapy in chronic acid-ABC/HA in two parallel courses in human clinical application. *Hepatology* 2006; 43: 1346-1353.
- [28] Mashe SS, Jin H, Tsang M, Kim CL. Design, synthesis, and biological evaluation of novel triazole HIV-1 integrase inhibitors by modification of the pyridine ring. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; 16: 2683-2688.
- [29] Souza TM, De Souza MC, Ferreira VF, et al. Inhibition of HIV-1 replication and HIV DNA polymerase by the chalconequinoline thionucleoside 6-chloro-1-(4-dihydro-4-oxo-4-(beta-D-ribofuranosyl)quinoline-3-carboxyl) acid and its aglycone. *Antiviral Res* 2008; 71: 20-27.
- [30] Chen NL, Bridan RJ, Hopkins TA, et al. Broad-spectrum antiparasitic activities of 4-hydroxyquinoline carboxamides, a novel class of hepatitis polymerase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 724-730.
- [31] Srinan D, Bal TR, Yogeeswari P. Antipyrimidinone furan analogues: design and synthesis of novel non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors with broad-spectrum anti-microbial properties. *Med Chem* 2003; 1: 277-283.
- [32] Severino A, Bocciarelli JR, Cassone A, Majori G, Casella R. Efficacy of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 722-727.
- [33] De Clercq E. The role of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection. *Antiviral Res* 1998; 38: 133-176.
- [34] Schinazi RF, Hernandez-Santiago G, Heredia SJ. Pharmacology of arvin and promising nucleosides for the treatment of human immunodeficiency viruses. *Antiviral Res* 2006; 71: 322-334.
- [35] Ray AS, Yang Z, Chu CK, Anderson KS. Novel use of a guanosine prodrug approach to convert 2',3'-dihydro-2',3'-dihydroxyguanosine into a viable antiviral agent. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 887-891.
- [36] Barasa ML, Chimiri A, De Clercq E, et al. Anti-HIV agents: design and discovery of new potent RT inhibitors. *Pharmacology* 2003; 78: 249-263.
- [37] Parril AL. HIV-1 integrase inhibition: binding site, structure activity relationships and future perspectives. *Curr Med Chem* 2002; 10: 1811-1824.
- [38] Alvarez J, Savaris M, Van Rompay AR, et al. The harylmethylthioxythiouracil nonnucleoside reverse transcriptase (RT) inhibitor MK6078 select for a resistance mutation in the active site of human immunodeficiency virus type 1 RT. *J Virol* 2004; 78: 7427-7437.
- [39] Barbosa JP, Pereira RC, Abramo JL, et al. In vitro antiviral properties from the Brazilian bromo alga *Dasya platy*. *Planta Med* 2004; 70: 858-860.
- [40] Richman DD, Fischl MA, Grieco MH, et al. The toxicity of 27 nucleosylidene (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med* 1987; 317: 192-197.
- [41] Agarwal RP, Oliveira CA. Genotoxicity and mitochondrial damage in human lymphocyte cells chronically exposed to 2'-azido-2',3'-dideoxythymine. *Mutagenesis* 1997; 12: 221-223.
- [42] Barbric E, Charlier P, Bonavent J, et al. Cellular and mitochondrial toxicity of zalcitabine (AZT), ddiancoline (ddI) and zalcitabine (ddC) on cultured human muscle cells. *J Neurol Sci* 1997; 149: 19-24.
- [43] Aquino S, Pardo CF, Balboa E, et al. Inhibition of replication of HIV in primary monocyte/macrophages by different antiviral drugs and comparative efficacy in lymphocytes. *J Leukoc Biol* 1997; 62: 138-143.
- [44] Triguero K, Sivanian M. Characterization of restriction of human immunodeficiency virus type 1 infection of monocytes. *J Virol* 2004; 78: 5323-5327.
- [45] Vandamme AM, Van Veenbergh K, De Clercq E. Anti-human immunodeficiency virus drug combination strategies. *Antiviral Chem Chemother* 1998; 9: 187-203.
- [46] Maga G, Ubbal D, Salvati R, Pragnolo M, Spadari S. Selective interaction of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase nonnucleoside inhibitor efavirenz and its thio-substituted analog with different enzyme-substrate complexes. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1186-1194.