



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**INIBIÇÃO DA REPLICAÇÃO DO HIV-1 PELO ALCALÓIDE
INDÓLICO CORONARIDINA E O SEU ANÁLOGO
18-METOXI-CORONARIDINA**

EDINETE MELO DA SILVA

Salvador - Bahia - Brasil

2002



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

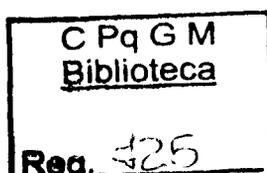
**INIBIÇÃO DA REPLICAÇÃO DO HIV-1 PELO ALCALÓIDE
INDÓLICO CORONARIDINA E O SEU ANÁLOGO
18-METOXI-CORONARIDINA**

EDINETE MELO DA SILVA

Professor-orientador: Dumith Chequer Bou-Habib

Dissertação apresentada para a
obtenção do grau de Mestre em
Patologia Experimental

Salvador – Bahia – Brasil
2002



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM /FIOCRUZ
Salvador - Bahia.

Silva, Edinete Melo da
S586i Inibição da replicação do HIV-1 pelo alcalóide indólico coronaridina e o seu análogo 18-Metoxi-Coronaridina / Edinete Melo da Silva. _ Salvador: Universidade Federal da Bahia / Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ, 2002.
74p.:ils.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental)- Universidade Federal da Bahia, 2002.

1. HIV-1. 2.AIDS. 3. Alcalóides. 4. Produtos Naturais. I. Título.

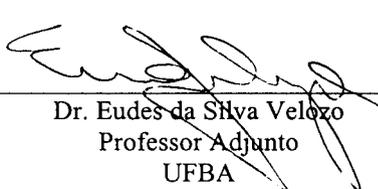
CDU 616.98:547.94

INIBIÇÃO DA REPLICAÇÃO DO HIV-1 PELO ALCALÓIDE INDÓLICO CORONARIDINA
E O SEU ANÁLOGO 18-METOXI-CORONARIDINA.

EDINETE MELO DA SILVA

FOLHA DE APROVAÇÃO

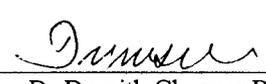
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Eudes da Silva Velozo
Professor Adjunto
UFBA



Dr. Carlos Roberto Brites Alves
Professor Adjunto
UFBA



Dr. Dumith Chequer Bou-Habib
Pesquisador Associado
CPqGM / FIOCRUZ

Trabalho realizado no Laboratório Avançado de Saúde Pública do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz, sob a orientação do Dr. Dumith Chequer Bou-Habib.

À MINHA MÃE

(In Memoriam)

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, o meu exemplo de força, sabedoria e sensibilidade, de quem herdei a arte de sorrir, ainda que diante de situações adversas;

Ao meu pai, pelo incentivo constante em buscar novas formas de percorrer minha jornada;

Às minhas irmãs, por compartilharem comigo, sempre com espírito de amor e amizade, os bons momentos de minha vida;

Ao meu professor, orientador e amigo, Dr. Dumith Chequer Bou-Habib, por me aceitar em sua equipe, e acima de tudo, pela demonstração de sabedoria científica durante a orientação deste trabalho;

À toda a equipe do LASP, pelo bom exemplo de trabalho em conjunto, de competência e pelos momentos de descontração;

À Professora Elvira Maria Saraiva, do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, e ao colega Jan Carlo Delorenzi, pelas suas contribuições sobre as propriedades químicas e biológicas, e sobre a forma de utilização do fármaco testado no nosso trabalho;

Ao colega Geraldo Argolo Ferraro, que participou dos primeiros estudos sobre a atividade anti-retroviral da Coronaridina em nosso laboratório;

Ao Dr. Bernardo Galvão-Castro, chefe do LASP, pelas sugestões científicas que muito contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho e pelo fraternal ambiente de pesquisa do LASP, do qual é o principal responsável;

À Professora Isabel Frugulheti, da Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, pela realização dos ensaios de inibição da enzima transcriptase reversa;

Ao Dr. José Pascoal Simonetti, Pesquisador Titular e Chefe do Núcleo de Retrovírus do Departamento de Virologia, que gentilmente nos permitiu realizar alguns experimentos neste laboratório;

À Sra. Rosália Meires da Silva, Secretária da Coordenação de Ensino do CPqGM, pelo carinho e atenção constantes;

Ao Hemocentro da Bahia (HEMOBA), pelo prestativo e gentil fornecimento de bolsas de sangue de doadores normais, essenciais para a realização deste trabalho;

As bibliotecárias, Sra. Ana Maria Fiscina Vaz Sampaio e Adelvany de Araújo Boa Morte, pela normalização bibliográfica, simpatia e atenção a mim dispensadas sempre que solicitei a sua ajuda; Sra. Edite Silva e Evany de Araújo pelo apoio no fornecimento de cópias de artigos;

À CAPES, pelo fornecimento de bolsa de estudo;

Ao CPqGM/Fiocruz, pelas facilidades oferecidas para a realização deste estudo e pelo auxílio financeiro para realização de estágio no Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro;

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Patologia da UFBA/FIOCRUZ, pelo valor dos seus ensinamentos em meu amadurecimento científico.

A Prefeitura Municipal de Paulo Afonso/BA, por acreditar na educação como a base para uma sociedade mais consciente e igualitária.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	x
PREÂMBULO.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA INFECÇÃO PELO HIV.....	1
1.2 ESTRUTURA GENÔMICA E ASPECTOS MOLECULARES DO HIV1.....	2
1.3 CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E TROPISMO CELULAR DO HIV-1.....	3
1.4 CICLO DE REPLICAÇÃO DO HIV-1.....	5
1.5 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO HIV-1.....	7
1.6 ALGUNS ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DA INFECÇÃO PELO HIV-1.....	9
1.7 TRATAMENTOS CORRENTES.....	10
1.8 PRODUTOS NATURAIS E A INFECÇÃO PELO HIV-1.....	13
1.9 ALCALÓIDES.....	15
1.10 ALCALÓIDES INDÓLICOS.....	16
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 CÉLULAS.....	19
3.1.1 Células mononucleares do sangue periférico (PBMC).....	19
3.1.2 Macrófagos primários humanos (MDM).....	20
3.2 ISOLADOS VIRAIS.....	20
3.3 DROGAS.....	21
3.4 AZIDOTIMIDINA (AZT).....	21

3.5 TESTES DE VIABILIDADE CELULAR	23
3.6 INFECÇÃO CELULAR PELO HIV-1 E EFEITO INIBITÓRIO DE COR E DE 18M-COR.....	23
3.6.1 Macrófagos.....	23
3.6.2 PBMC.....	24
3.7 ANÁLISE DO MECANISMO DE AÇÃO DA 18M-COR.....	25
4 RESULTADOS.....	26
4.1 CONCENTRAÇÕES DOS ALCALÓIDES INDÓLICOS COR E 18M-COR.....	26
4.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS E PBMC EXPOSTOS A COR E 18M-COR.....	26
4.3 COR INIBE A REPLICAÇÃO DO HIV-1 EM PBMC.....	27
4.4 18M-COR INIBE A REPLICAÇÃO DO HIV-1, EM PBMC, INDEPENDENTEMENTE DO TROPISMO CELULAR DO HIV-1.....	28
4.5 O EFEITO INIBITÓRIO PRONUNCIADO DEPENDE DA PERMANÊNCIA DA 18M-COR EM CULTURA.....	31
4.6 INIBIÇÃO DA REPLICAÇÃO DO HIV-1 EM MACRÓFAGOS PELA 18M-COR.....	32
4.7 EFEITO INIBITÓRIO DA 18M-COR EM COMPARAÇÃO COM AZT EM PBMC E MDM.....	34
4.8 18M-COR INIBE A ENZIMA TRANSCRIPTASE REVERSA DO HIV-1.....	36
5 DISCUSSÃO.....	37
6 CONCLUSÕES.....	42
7 PERSPECTIVAS.....	43
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

18M-COR	18Metoxi-Coronaridina
AI	Alcalóides Indólicos
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CCR2b	Receptor para β -quimiocinas
CCR3	Receptor para β -quimiocinas
CCR5	Receptor para β -quimiocinas
CD4	Cluster of differentiation 4
COR	Coronaridina
CPM	Contagem por minuto
CTL	Linfócitos T citotóxicos
CXCR4	Receptor para α -quimiocinas
c DNA	Ácido Desoxirribonucléico complementar
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Etileno Diamino Tetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
env	Gene que codifica as proteínas do envelope do HIV-1
FITC	Fluoresceína isoticianato
gp120	Glicoproteína do envelope do HIV-1 de 120 Kb
gp41	Glicoproteína do envelope do HIV-1 de 41 Kb
gp160	Glicoproteína precursora da gp120 e gp41 de 160 Kb
HAART	Terapia antiretroviral altamente ativa
HEMOBA	Centro de hematologia da Bahia
HEPES	N [2-Hydroxietil] piperazina-N'-[2-etanosulfônico]
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HTLV	Vírus linfotrópico de células T humanas
IL-2r	Interleucina tipo 2 recombinante
IANTR	Inibidores análogos de nucleosídeo da transcriptase reversa
INNTR	Inibidores não-nucleosídico da transcriptase reversa

IP	Inibidores de protease
IS	Indutor de sincício
ITR	Inibidores da transcriptase reversa
Kd	Kilodaltons
LASP	Laboratório Avançado de Saúde Pública
LAV	Retrovírus associado a linfadenopatia
LTR	“Long terminal repeats”
MDM	Macrófago derivado de monócito
MIP-1 a	Macrophage inflammatory protein 1 α
MIP-1b	Macrophage inflammatory protein 1 β
ml	Mililitros
MN	Isolado viral adaptado em laboratório
ng	Nanograma
NIS	Não indutor de sincício
p24	Proteína do nucleocapsídeo do HIV-1 de 24 Kd
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBMC/PHA	Células mononucleares do sangue periférico estimuladas com fitohemaglutinina
PBS	Tampão de salina fosfatada
PE	Ficoeritrina
PHA	Fitohemaglutinina
PMS	Metossulfato de fenanzina
R3	Isolado do HIV-1 que utiliza o receptor CCR3
R5	Isolado do HIV-1 que utiliza o receptor CCR5
R5X4	Isolado do HIV-1 capaz de utilizar simultaneamente os receptores CCR5 e CXCR4
RANTES	Regulated on activation normal T-cell expressed and secreted
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA _m	Ácido Ribonucléico mensageiro
RPMI	Meio de cultura

SFB	Soro fetal bovino
SIV	vírus da imunodeficiência simiam
SH	Soro humano
T CD4 ⁺	Linfócito T que apresenta a molécula CD4 na superfície externa da membrana
TCD8 ⁺	Linfócito T que apresenta a molécula CD8 na superfície externa da membrana
TL	Trópico para células T ou linfotrópico
TM	Trópico para macrófago ou monocitotrópico
TR	Transcriptase reversa
U	Unidades internacionais
V3	Terceira região variável da gp120
X4	Isolado de HIV-1 que utiliza o receptor CXCR4
XTT	2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]2H-tetrazolium-carboxanilida

RESUMO

INIBIÇÃO DA REPLICAÇÃO DO HIV-1 PELO ALCALÓIDE INDÓLICO CORONARIDINA E SEU ANÁLOGO 18-METOXI-CORONARIDINA. **EDINETE MELO DA SILVA.** [INTRODUÇÃO] Os alcalóides são utilizados como analgésicos, estimulantes do sistema nervoso central, e no tratamento de algumas enfermidades, como a malária e o câncer. Experimentalmente, os alcalóides exercem potentes efeitos farmacológicos sobre uma ampla variedade de patógenos, inclusive o HIV-1. A 18-metoxi-coronaridina (18M-COR), análogo sintético do alcalóide indólico de origem vegetal Coronaridina (COR), apresenta atividade leishmanicida, *in vitro*, e anti-dependência química, *in vivo*. [OBJETIVO] Investigar se COR e 18M-COR inibem a replicação do HIV-1 em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e macrófagos humanos. [MATERIAL E MÉTODOS] PBMC de doadores normais foram infectados com isolados primários de HIV-1, com diferentes tropismos para receptores de quimiocinas (R5, R5X4 e X4), e expostos a diferentes concentrações de COR ou de 18M-COR. A replicação viral foi avaliada após sete dias pela medida da atividade da transcriptase reversa ou da quantificação do antígeno p24, nos sobrenadantes de cultura. Macrófagos derivados de monócitos foram infectados por um isolado monocitotrópico de HIV-1 e expostos a 18M-COR, durante 21 dias. A replicação do HIV-1 foi avaliada a cada 7 dias, como citado acima. A viabilidade celular dos PBMC e macrófagos expostos aos alcalóides foi avaliada pelos ensaios de exclusão do corante azul de Trypan e pelo XTT. [RESULTADOS] Verificamos que COR e 18M-COR exercem efeito inibitório dose-dependente sobre a replicação do HIV-1, independentemente do seu tropismo celular, em concentrações que não alteram a viabilidade das células-alvo. A 18M-COR (50 μ M) inibe a replicação viral, em PBMC, atingindo até 70 \pm 8%, 75 \pm 3% e 72 \pm 6% de inibição do crescimento dos vírus R5, R5X4 e X4, respectivamente. Resultados semelhantes foram observados sobre o crescimento do HIV-1 em macrófagos: após 14 dias de cultura, encontramos entre 49% e 61% de inibição, e entre 66% e 83% após 21 dias, para as concentrações 12,5 μ M e 25 μ M, respectivamente. Em PBMC, o efeito inibitório da 18M-COR é ligeiramente inferior ao exercido pelo anti-retroviral AZT e, em macrófagos, os efeitos são similares. Dados preliminares sugerem que a 18M-COR inibe a replicação viral através da inibição da enzima transcriptase reversa do HIV-1. [CONCLUSÕES] A 18M-COR inibe a replicação de isolados primários de HIV-1 em PBMC e em macrófagos, independentemente do uso preferencial de correceptores pelos isolados testados; esta atividade anti-retroviral é provavelmente mediada através da inibição da enzima viral transcriptase reversa.

PALAVRAS-CHAVES: HIV-1, AIDS, Alcalóides, Produtos Naturais.

SUMMARY

INHIBITION OF HIV-1 REPLICATION BY THE INDOLE ALKALOID CORONARIDINE AND BY ITS ANALOGUE 18-METHOXI-CORONARIDINE. **EDINETE MELO DA SILVA.** [INTRODUCTION] Alkaloids have been used as analgesics, stimulants of the central nervous system and for the treatment of some disorders, such as malaria and cancer. It has been shown in *in vitro* studies that alkaloids are endowed with potent inhibitory activities against a variety of pathogens, including HIV-1. The 18-methoxi-coronaridine (18M-COR), a synthetic analogue of the natural indole alkaloid coronaridine (COR), shows an *in vitro* leishmanicidal and an *in vivo* anti-addiction properties. [OBJECTIVE] To investigate whether COR and 18M-COR inhibit the HIV-1 replication in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and monocyte-derived macrophages. [MATERIAL AND METHODS] PBMC from normal donors were infected by HIV-1 primary isolates presenting distinct tropisms for chemokine receptors (R5-, X4- and R5X4-tropic viruses), and exposed to different concentrations of COR or 18M-COR. Viral replication was evaluated after seven days by measuring the activity of the enzyme reverse transcriptase or the p24 antigen concentration in culture supernatants. Macrophages were also infected by a monocytotropic isolate of HIV-1 and treated with 18M-COR as well, and the viral replication was evaluated each seven days, as described above. The viability of the cells exposed to the alkaloids was monitored by the Trypan Blue exclusion test and by the XTT assay [RESULTS] We found that COR and 18M-COR inhibit the HIV-1 replication in a dose-dependent manner, regardless of the isolate cell tropism, at non cell-toxic concentrations. The inhibitory activity of 18M-COR (50 μ M) in PBMC was up to $70 \pm 8\%$, $75 \pm 3\%$ and $72 \pm 6\%$ for R5, R5X4 and X4 isolates, respectively. Similar results were observed for HIV-1 replication in macrophages: we found 49% to 61% of inhibition after 14 days of infection, and 66% to 83% after 21 days, at 12.5 μ M and 25 μ M of 18M-COR, respectively. In PBMC, the inhibitory activity of 18M-COR was only slightly smaller than that mediated by AZT, but it was similar in macrophages. Preliminary results suggest the 18M-COR antiretroviral activity is mediated through inhibition of the HIV-1 enzyme reverse transcriptase [CONCLUSIONS] 18M-COR inhibits the infection mediated by primary isolates of HIV-1 in PBMC and macrophages, independently of the viral correceptor usage; this anti-HIV-1 activity is probably mediated through inhibition of the enzyme reverse transcriptase.

KEY WORDS, HIV-1, AIDS, Alkaloids, Natural products

PREÂMBULO

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), infecta e se replica em células que apresentam o marcador de superfície CD4 (monócitos/macrófagos e linfócitos T CD4⁺). Para infectar a célula-alvo o HIV utiliza também certos receptores de α e β -quimiocinas. Este vírus, da família *Lentiviridae*, pertence ao grupo dos retrovírus citopáticos não-oncogênicos, que utiliza a enzima transcriptase reversa para transcrever seu genoma RNA em DNA.

Até agora já foram descritos dois tipos de HIV (HIV-1 e HIV-2), de acordo com a sua estrutura genética, os quais são subdivididos em subtipos e em formas recombinantes (quasiespecie). Todas as formas geneticamente distintas do HIV encontram-se ampla e heterogeneamente espalhadas pelo mundo, concentrando-se principalmente na África. O HIV-1 é o responsável pela epidemia global de AIDS, e o HIV-2 parece concentrar-se nos países do Oeste Africano, com um número bem menor de casos encontrados noutros continentes.

Sobre a origem do HIV, há evidências de que este vírus seja resultado de mutações gênicas do SIV (simian immunodeficiency vírus) encontrado em primatas não humanos. Baseado em análises filogenéticas, já foi sugerido que o HIV-1 originou-se do SIVcpz, que tem como hospedeiro o chimpanzé africano *Pan troglodytes troglodytes*, enquanto que o HIV-2 originou-se do SIVsm, cujo hospedeiro é o “soot mangabey” (*Cercocebus atys*). Acredita-se que o homem tenha adquirido o HIV na África, através de íntimo contato com esses primatas, pois eles são tratados como animais domésticos e ainda servem de alimento para a população local.

Os primeiros casos de AIDS surgiram em homossexuais masculinos, nos Estados Unidos, em 1980 e 1981. Dois anos depois surgiram novos casos nos Estados Unidos, Haiti, Europa Ocidental e África Equatorial. O agente etiológico da AIDS foi isolado pela primeira vez pela equipe do Prof. Luc Montagnier, do Institut Pasteur de Paris, em 1983, que o denominou *Lymphadenopathy-associated virus*

(LAV) e, em seguida, pela equipe do Dr. Robert Gallo, então no National Cancer Institute, em Bethesda, MD, EUA, que o denominou *Human T-cell leukemia-lymphoma virus type III* (HTLV-III). Em 1984 o vírus da AIDS recebeu o nome definitivo de Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).

O quadro da epidemia de AIDS é de disseminação global, principalmente nos países sub-desenvolvidos ou em desenvolvimento, como os da África, Ásia, América Latina e América Central (Caribe). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, o número total de pessoas infectadas com HIV/AIDS é de, aproximadamente, 40 milhões, dos quais 37,2 milhões são adultos, 17,6 milhões são mulheres e 2,7 milhões são crianças abaixo de 15 anos. O número de novos casos de infecção pelo HIV, em 2001, foi de 5 milhões (4,3 milhões adultos, 1,8 milhões mulheres e 800 mil crianças abaixo de 15 anos). Neste mesmo ano, 3 milhões de pessoas morreram com AIDS: 2,4 milhões de adultos, 1,1 milhão de mulheres, e 580 mil crianças abaixo de 15 anos. No Brasil, a estimativa do número de indivíduos infectados com HIV/AIDS, até o final de 2001, foi de aproximadamente 600 mil.

O uso de potentes anti-retrovirais proporcionou elevada queda no número de novos casos de AIDS, aumentou a sobrevida dos indivíduos infectados e diminuiu a mortalidade causada pela infecção pelo HIV-1. No entanto, o tratamento não suprime a replicação do HIV-1 (replicação residual pode persistir em reservatórios virais), o surgimento de vírus resistentes é freqüente, e o tratamento contínuo pode resultar em graves efeitos colaterais. Estas peculiaridades do atual tratamento determinam a permanente busca de novas drogas e estratégias terapêuticas para controlar a evolução clínica da infecção pelo HIV-1. Neste contexto, os produtos de origem natural devem ser vistos e explorados como uma importante fonte de novos medicamentos capazes de inibir o progresso da infecção pelo HIV-1.

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA INFECÇÃO PELO HIV

Baseado em análises filogenéticas do genoma de isolados virais, é possível diferenciar dois tipos de HIV, o HIV tipo 1 e o HIV tipo 2. Entre estes tipos há em torno de 60% de homologia para os genes *gag* e *pol*, e 30% a 40% de homologia para os demais genes, incluindo o *env* (VAN DER LOEFF & AABY, 1999). Além disso, tanto o HIV-1 quanto o HIV-2 apresentam grupos e subtipos diferentes.

O HIV-1 é representado por três grupos principais, geneticamente distintos: M (“major”), O (“outlier”) e N (“non-M/non-O”) (SIMON *et al.*, 1998; MOORE *et al.*, 2001). O grupo M, o qual compreende a maioria dos isolados responsáveis pela epidemia de AIDS (PEETERS & SHARP, 2000) e pelo maior índice de mortalidade global, é subdividido em oito subtipos (A, B, C, D, F, H, J e K) (PEETERS & SHARP, 2000; TRIQUES *et al.*, 2000; MOORE *et al.*, 2001) e cinco formas recombinantes (A/E, A/B, A/G, A/G/I e A/G/I/J) (GAO *et al.*, 1996; LIITSOLA *et al.*, 1998; CARR *et al.*, 1998; MONTAVON *et al.*, 1999). O grupo O, relativamente divergente do grupo M (PEETERS & SHARP, 2000), é representado por poucos isolados endêmicos da República dos Camarões e países vizinhos do oeste da África Central. Existe relato do primeiro subtipo deste grupo, denominado ANT70, encontrado na República dos Camarões e no Gabão (JANSSENS *et al.*, 1999). Já o grupo N foi identificado em dois pacientes da República dos Camarões (SIMON *et al.*, 1998).

O HIV-2 é subdividido em seis subtipos (A, B, C, D, E e F) (GAO *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 1996; CHEN *et al.*, 1997) e formas recombinantes (GAO *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 1996), com distribuição geográfica prevalente em regiões africanas (VAN DER LOEFF & AABY, 1999; GAO *et al.*, 1994), com relato de casos nos Estados Unidos, Europa e Índia (VAN DER LOEFF & AABY, 1999).

A distribuição geográfica do HIV-1 foi revisada por Peeters & Sharp (2000), Peeters (2000) e Moore e colegas (2001). Atualmente os subtipos A e C ocupam a posição de maior prevalência global, seguido pelo subtipo B (PEETERS & SHARP, 2000; PEETERS *et al.*, 2000; MOORE *et al.*, 2001). Os principais focos do subtipo C predominam as regiões do sul, do sudoeste e do oeste da África, e da Índia, podendo ser encontrado na América do Sul; o subtipo A encontra-se disperso no centro, no leste e no oeste da África, e Índia; o subtipo B circula nas

Américas, na Europa e na Austrália; o subtipo D encontra-se no centro, no leste e no oeste da África; o subtipo F é encontrado na América do Sul, no leste europeu e na África Central; os demais subtipos (H, J e K) são encontrados principalmente na África Central.

O subtipo prevalente no Brasil é o subtipo B (BRAZILIAN NETWORK FOR HIV-1 ISOLATION E CHARACTERIZATION, 2000; MACCUCHAN, 2000), mas também são encontrados os subtipos C, D e F, e o recombinante B/F (SABINO *et al.*, 1994; MORGADO *et al.*, 1994 e 1998; PEETERS & SHARP, 2000). Através de estudos de caracterização genotípica, foi possível identificar uma substituição do aminoácido prolina por triptofano (GPGR→GWGR), no topo da alça V3 da glicoproteína do envelope viral (gp120) (POTTS *et al.*, 1993). Este variante, denominado B'' (ou B brasileiro) (COVAS *et al.*, 1998), representa 43% dos vírus do subtipo B circulantes no Brasil (MORGADO *et al.*, 1994).

1.2 ESTRUTURA GENÔMICA E ASPECTOS MOLECULARES DO HIV-1

O genoma do HIV é representado por duas fitas de RNA, cada uma com tamanho aproximado de 9,2 kilobases de comprimento (ABBAS *et al.*, 1997). Ele é composto de nove genes, delimitados por duas regiões denominadas LTR-3' e LTR-5' (*long terminal repeat*), agrupados em 2 categorias: genes estruturais - *env*, *gag* e *pol* - e genes regulatórios - *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*, *tat* e *rev*.

O gene *env* codifica a glicoproteína precursora de peso molecular 160 Kd (gp 160), cuja clivagem, pelas proteases celulares, resulta nas glicoproteínas do envelope viral de peso molecular igual a 120 Kd (gp 120) e 41 Kd (gp 41) (RICHMAN & STASZEWSKI, 1997). O gene *gag* codifica a proteína precursora de peso molecular 53 Kd, que é clivada, pela protease viral (RICHMAN & STASZEWSKI, 1997), nas proteínas do core e nucleocapsídeo (p24, p17 e p15 (ABBAS *et al.*, 1997). O gene *pol* codifica as enzimas transcriptase reversa (p66 e p51), protease (p10) e integrase (p32), igualmente resultantes da clivagem da glicoproteína precursora pela protease viral (RICHMAN & STASZEWSKI, 1997), as quais também constituem o core do HIV-1 e são essenciais para a replicação viral. A enzima transcriptase reversa é responsável pela síntese do DNA complementar (cDNA) a partir do RNA viral; a enzima integrase insere o cDNA viral no genoma celular, e a enzima protease cliva as proteínas precursoras, codificadas pelos genes *gag* e *pol* (RICHMAN & STASZEWSKI, 1997). Os genes *vif*, *vpr* e *vpu* codificam as proteínas acessórias, e os genes *tat*, *rev* e *nef* codificam as proteínas reguladoras da

replicação viral (ABBAS *et al.*, 1997). As proteínas associadas ao envelope protéico (gp120/41) têm papel fundamental na interação do vírus com a célula hospedeira (ABBAS *et al.*, 1997). É através delas que ocorrem ligação e fusão entre a membrana celular e o envelope viral (VIRELIZIER, 1997).

1.3 CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E TROPISMO CELULAR DO HIV-1

A diversidade genética e biológica do HIV-1 pode se constituir num obstáculo para o desenvolvimento de vacinas efetivas ou de agentes anti-retrovirais. De fato, o polimorfismo viral está associado com a emergência de variantes resistentes às drogas anti-HIV-1 atualmente em uso (PERRIN & TELENTI, 1998; GÜNTARD *et al.*, 1998), assim como com o fracasso de potenciais vacinas em inibir a infecção mediada por isolados primários de HIV-1. (HEILMAN & BALTIMORE, 1998)

Desde a detecção de distintos padrões de replicação do HIV-1 *in vitro* (ASJO *et al.*, 1986), diferentes fenótipos do HIV-1 foram identificados de acordo com as propriedades infecciosas do vírus em culturas celulares. Assim, sistemas de classificação foram estabelecidos com base nos diferentes tipos celulares que o HIV-1 infecta, na dinâmica de replicação viral e na capacidade que este vírus apresenta em induzir ou não a formação de sincícios. Os isolados que infectam macrófagos e células mononucleares do sangue periférico (PBMC), mas que não infectam células tumorais T CD4⁺, são denominados isolados monocitotrópicos ou M-trópicos; aqueles que infectam linhagens de células T CD4⁺ e PBMC, mas não infectam macrófagos, são denominados isolados T-trópicos (CHO *et al.*, 1998). Os isolados que infectam células primárias e tumorais são conhecidos como duplo-trópicos. Isolados que induzem formação de sincícios em células tumorais são chamados de indutores de sincício (IS), enquanto que os isolados desprovidos dessa característica são denominados não-indutores de sincício (NIS) (COHEN *et al.*, 1999). Os sincícios resultam da fusão mediada pela interação entre a gp120 da célula infectada com os receptores da célula não infectada, formando células gigantes multinucleadas capazes de liberar grande quantidade de vírus.

A dinâmica com que o HIV-1 se replica *in vitro* também tem sido usada como critério para a caracterização fenotípica deste vírus, cujos isolados podem ser denominados “rápido/alto” ou “baixo/lento”, de acordo com a rapidez de replicação e quantidade de vírions produzidos durante infecções celulares *in vitro* (FENYÖ *et al.*, 1988). No estágio clínico

assintomático da infecção pelo HIV-1 predominam os isolados M-trópicos/NIS, baixo/lentos (SCHUITEMARKER *et al.*, 1992; CONNOR & HO, 1994), enquanto que a depleção de células T CD4⁺ e o progresso da doença estão associados à presença de isolados T-trópicos/duplo-trópicos/IS, rápido/altos (SCHUITEMARKER *et al.*, 1992; CONNOR & HO, 1994).

É sabido que a entrada do HIV-1 na célula-alvo depende, além da molécula CD4, da presença de algumas moléculas específicas na membrana destas células. Vários pesquisadores descreveram que os receptores de α e β -quimiocinas funcionam como fatores fundamentais durante o passo inicial do ciclo de replicação do HIV-1, ou seja, a entrada nas células-alvo (COCCHI *et al.*, 1995; FENG *et al.*, 1996; BANNERT *et al.*, 2000). O HIV-1 utiliza pelo menos quatro desses receptores de quimiocinas, a saber: CCR2b, CCR3, CCR5 e CXCR4 (BERGER *et al.*, 1999). Feng e colegas (1996) demonstraram que alguns isolados infectam os linfócitos T CD4⁺ através do receptor de α -quimiocinas CXCR4, cujo ligante natural, a α -quimiocina SDF-1, bloqueia a sua entrada nas células-alvo (FAUCI *et al.*, 1996; LACEY *et al.*, 1997). Também foi relatado que outros isolados utilizam os receptores de β -quimiocinas CCR2b, CCR3 e CCR5 (ALKHATIB *et al.*, 1996; DENG *et al.*, 1996; DRAGIC *et al.*, 1996) como co-fator para infectar as células-alvo. A interação entre as β -quimiocinas RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β e o receptor CCR5 inibe a infecção por isolados monocitotrópicos do HIV-1, e impede a fusão entre o envelope viral e a membrana celular (FAUCI, 1996; LACEY *et al.*, 1997; CONNOR *et al.*, 1997).

A partir deste conhecimento, o HIV-1 tem sido caracterizado fenotipicamente com base no uso dos correceptores para entrar na célula alvo (BERGER *et al.*, 1998). Os isolados virais que utilizam o correceptor CCR5, mas que não utilizam o correceptor CXCR4, são denominados vírus R5; aqueles que utilizam apenas o correceptor CXCR4 são denominados vírus X4; e os isolados capazes de usar ambos os receptores para entrar na célula alvo são conhecidos como R5X4, ou duplo-trópicos. Ainda com relação à formação de sincícios, Ferraro *et al.* (2001) demonstraram que os isolados M-trópicos de HIV-1 podem também induzir a formação de sincícios, desde que as células-alvo expressem o correceptor preferencial do vírus, sugerindo que a presença do correceptor tenha grande influência na formação de sincícios. Isso porque tanto os linfócitos T como os macrófagos expressam os coreceptores CCR5 e CXCR4, embora a quantidade desses coreceptores na membrana celular varie de acordo com o estágio de

maturação em que as células se encontram (WU *et al.*, 1997; TUTTLE *et al.*, 1998; NAIF *et al.*, 1998; FERRARO *et al.*, 2001).

1.4 CICLO DE REPLICAÇÃO DO HIV-1

O ciclo de replicação do HIV-1 começa com a ligação da glicoproteína do envelope viral (gp120) à célula alvo, via CD4 e receptor de quimiocina (Fig.1). A interação da gp120 com a molécula CD4 induz alterações na conformação da gp120 e exposição dos sítios de ligação desta proteína para os receptores específicos de quimiocinas (CCR5 ou CXCR4) (WU *et al.*, 1996; DENG *et al.*, 1996; COHEN *et al.*, 1999). O complexo gp120/CD4/receptor de quimiocina induz a fusão do envelope viral com a membrana celular, resultando na entrada do capsômero viral no citoplasma da célula (WU *et al.*, 1996; COHEN *et al.*, 1999). Em seguida, o RNA viral é transcrito reversamente, pela enzima transcriptase reversa, em dupla fita de cDNA (RICHMANN & STASZEWSKI, 1997). A dupla fita de cDNA é transportada para o núcleo e inserida no genoma da célula pela ação da enzima viral integrase, para tornar-se o DNA proviral (RICHMANN & STASZEWSKI, 1997). Então, o genoma do HIV-1 é transcrito e traduzido nas glicoproteínas e RNA viral para a produção e liberação de novos vírus (RICHMANN & STASZEWSKI, 1997; ZEICHNER, 1994).

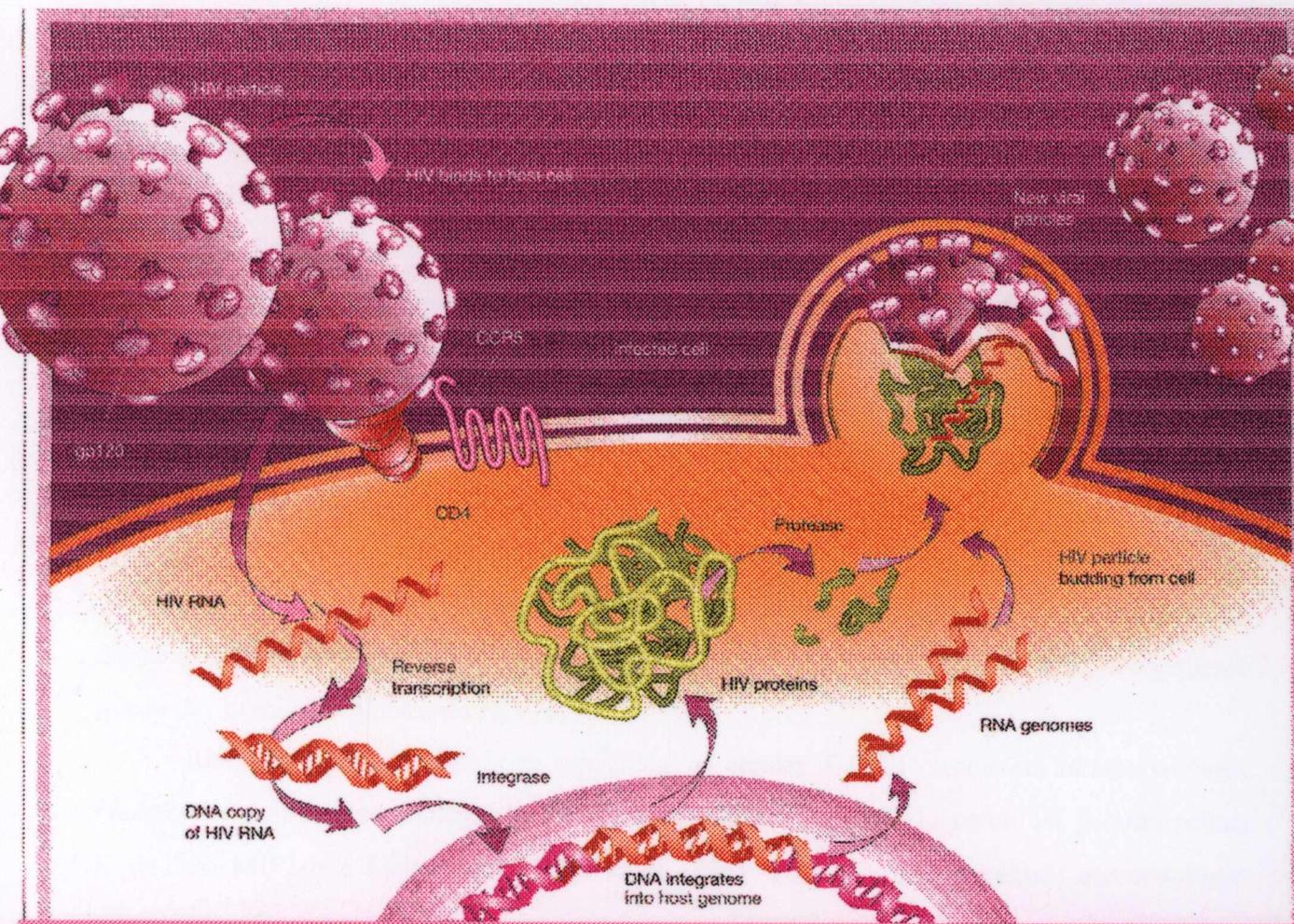


Figura 1- Ciclo de replicação do HIV-1. O esquema mostra os possíveis alvos para drogas antiretrovirais. Adaptado de Weiss (2001).

1.5 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO HIV-1

A resposta imunológica anti-HIV-1 pode ser detectada nas primeiras semanas após a infecção (FAUCI, 1996). Após o estágio inicial de disseminação viral, a resposta imunológica primária anti-HIV-1 limita a replicação do vírus, reduzindo sensivelmente a viremia e o número de células infectadas nos linfonodos, paralelamente ao aparecimento de células T citotóxicas (CTL) específicas para o HIV-1 (PANTALEO, 1993; PANTALEO & FAUCI, 1995; BORROW *et al.*, 1997; KOUP *et al.*, 1994). Acredita-se que as CTL também estejam envolvidas no controle da viremia durante a fase crônica (SCHMITZ *et al.*, 1999), pois as mesmas podem ser detectadas com grande frequência no sangue periférico de pacientes infectados pelo HIV-1 (RINALDO *et al.*, 1995; CHEN *et al.*, 1997). Uma das mais importantes descobertas do papel exercido pelas CTL no controle da viremia *in vivo* foi feita a partir de estudos de depleção de células T CD8⁺, em macacos *rhesus* infectados pelo SIV, pela injeção de anticorpos monoclonais. Dois grupos distintos de pesquisadores (SCHMITZ *et al.*, 1999; JIN *et al.*, 1999) demonstraram que a ausência ou depleção de células T CD8⁺ compromete o controle da viremia, durante a infecção primária, e favorece o aumento da carga viral, durante a infecção crônica, respectivamente. A re-expansão destas células reverte este quadro, com conseqüente queda dos níveis circulantes do HIV-1.

Além da atividade citotóxica específica, as células T CD8⁺ produzem fatores solúveis capazes de inibir a replicação de isolados M-trópicos do HIV-1, como as β -quimiocinas RANTES, MIP1- α e MIP1- β (COCCHI *et al.*, 1995). Trabalhos experimentais demonstraram que a interação entre as β -quimiocinas e o receptor CCR5 impede a fusão entre a gp120/41 de isolados R5 e a membrana celular, comprovando que estes fatores inibem a infecção ao bloquear a entrada do vírus nas células alvo (COCCHI *et al.*, 1995; ALKHATIB *et al.*, 1996; DENG *et al.*, 1996; DRAGIC *et al.*, 1996; CONNOR *et al.*, 1997; LACEY *et al.*, 1997; GLUSHAKOVA *et al.*, 1999; STANTCHEV & BRODER, 2000). No entanto, apesar da atividade citotóxica e da produção desses fatores solúveis bloqueadores da entrada do vírus nas células-alvo, a contínua multiplicação viral acarreta a diminuição lenta e persistente do número de células T CD4⁺ e a deterioração progressiva da resposta imunológica do paciente. Diferentes mecanismos têm sido sugeridos para explicar este fenômeno. Um deles é a seleção de variantes que escapam da atividade das CTL. As altas taxas de mutação do HIV-1 podem favorecer a emergência de mutantes que escapam da atividade inibitória das CTL durante a infecção

primária (BORROW *et al.*, 1997) e os estágios tardios da infecção (GOULDER *et al.*, 1997). As mutações em epítomos para CTL facilitam a persistência do vírus, permitindo a manutenção de altos níveis de replicação viral e, conseqüentemente, a maior rapidez no progresso da doença. Dentre outros mecanismos propostos para explicar a perda do controle sobre a replicação viral, destacam-se a deficiência funcional da CTL resultante da insuficiente atividade auxiliar de células T CD4⁺ (HAY *et al.*, 1999); a perda específica ou inespecífica de CTL, paralelamente ao progresso da infecção (FLAMAND *et al.*, 1998); e a redução da eficiência das CTL pela redução ou supressão da expressão de moléculas HLA classe I na membrana das células infectadas pelo HIV-1, induzida pelo genes *nef* (SCHWARTZ *et al.*, 1996) ou *tat* (WEISSMAN *et al.*, 1998).

O HIV-1 apresenta considerável diversidade na sua sequência genômica, podendo ser encontrados em indivíduos infectados variantes com diferentes características fenotípicas, decorrentes do polimorfismo genômico viral (CHESEBRO *et al.*, 1992). Assim, a sensibilidade à neutralização por anticorpos neutralizantes sofre modificações a partir de mutações na sequência primária da glicoproteína do envelope viral (gp120/41) (COHEN *et al.*, 1999) Por exemplo, sabe-se que os isolados primários são resistentes à neutralização humoral, independentemente do tropismo para receptores de quimiocinas, enquanto que isolados adaptados ao crescimento em células tumorais T CD4⁺, que apresentam substituições na região variável 3 (alça V3), são sensíveis à neutralização (COHEN, 1993; BOU-HABIB *et al.*, 1994; LACASSE *et al.*, 1998; CECILIA *et al.*, 1998; TRKOLA *et al.*, 1998).

A maioria dos indivíduos infectados pelo HIV-1 desenvolve uma forte resposta imune humoral contra o vírus, mas ainda é controversa a importância dos anticorpos para o controle da replicação viral *in vivo*. Vários estudos sugerem que a presença de anticorpos neutralizantes com ampla especificidade no soro do paciente se correlaciona com o prognóstico mais favorável da doença (FENYO *et al.*, 1996; COHEN *et al.*, 1997). Acredita-se que durante a infecção aguda primária, os anticorpos neutralizantes não tenham participação no controle da replicação viral, pois são apenas detectados quando a doença já atingiu a sua fase crônica (FAUCI *et al.*, 1996). Nesta fase, o fenótipo viral prevalente é monocitotrófico/NIS (SCHUITEMAKER *et al.*, 1992), o qual é resistente à atividade bloqueadora dos anticorpos neutralizantes *in vitro* (COHEN, 1993; MOORE *et al.*, 1995), o que sugere a pouca contribuição dos anticorpos anti-HIV-1 para o declínio da carga viral durante a infecção aguda primária. Finalmente, soros de

indivíduos voluntariamente inoculados com proteínas do envelope viral não neutralizam isolados primários recém obtidos de pacientes, embora bloqueiem o isolado adaptado ao laboratório MN (COHEN, 1993). Evidências experimentais indicam que os vírus monocitotrópicos escapam da resposta imune humoral porque os epítomos imunodominantes da gp120/41 não estão acessíveis aos anticorpos neutralizantes (BOU-HABIB *et al.*, 1994; SANTTENTAU & MOORE, 1995), enquanto que os vírus adaptados às células de linhagem T CD4⁺ são mais facilmente neutralizados, porque estes epítomos estão mais expostos à ligação das imunoglobulinas. Esta maior exposição ocorre provavelmente devido a alterações conformacionais induzidas na gp120/41 pelo aumento da concentração de aminoácidos de carga positiva da alça V3 (BOU-HABIB *et al.*, 1994).

1.6 ALGUNS ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DA INFECÇÃO PELO HIV-1

No período aproximado de 3 a 6 semanas após a infecção pelo HIV-1, pelo menos 50% dos indivíduos apresentam quadro clínico agudo conhecido como infecção primária, cuja sintomatologia é inespecífica, como febre, dores musculares, dor de garganta, exantema, diarreia, perda de peso, linfadenopatia, eritema cutâneo, esplenomegalia e artrite (ABBAS *et al.*, 1997; FAUCI *et al.*, 1996), que persiste por poucas semanas e desaparece espontaneamente (COHEN *et al.*, 1999). A fase aguda da infecção pelo HIV-1 está associada com um pico de replicação viral, que coincide com o declínio transitório do número de células T CD4⁺ e o aumento das células T CD8⁺ no sangue periférico (FAUCI, 1993; FAUCI *et al.*, 1996; COHEN *et al.*, 1999). Inicia-se, então, a fase de latência clínica, na qual a carga viral no sangue circulante entra em declínio, concomitantemente com a recuperação parcial do número de células T CD4⁺. Nesta fase, que pode durar vários anos, os pacientes permanecem assintomáticos, a carga viral é baixa ou indetectável, e o número de células T CD4⁺ no sangue periférico se estabiliza ou cai lentamente (FAUCI *et al.*, 1996; COHEN *et al.*, 1999). O tempo médio entre a infecção primária e o desenvolvimento de AIDS é de aproximadamente 10 anos, e o aparecimento da síndrome de imunodeficiência, indicada pelo surgimento de infecções oportunistas, coincide com o novo aumento da replicação viral e declínio brusco das células T CD4⁺ (WEISS, 1993; FAUCI *et al.*, 1996; COHEN *et al.*, 1999).

São vários os mecanismos que contribuem para a perda de células T CD4⁺ no paciente infectado pelo HIV-1 (WEISS, 1993; MCCUNE, 2001). Dentre eles, podem ser citados: a) o

efeito citopático direto do vírus sobre a célula infectada; b) a morte celular por apoptose; c) a destruição de células infectadas por mecanismos imunológicos; d) a morte de células T CD4⁺ não-infectadas, que tenham incorporado em sua membrana moléculas de gp120, por mecanismos imunológicos; e, e) autoimunidade. Quando o número de células T CD4⁺ cai abaixo de um valor crítico (< 200 cel/mm³ de sangue), o paciente se torna susceptível a infecções por ampla variedade de parasitas, bactérias, fungos ou outros vírus. O quadro clínico do paciente se deteriora rapidamente, e a infecção caminha para o seu estágio final.

Ainda, durante o curso da infecção pelo HIV-1, ocorre replicação viral ativa no tecido linfóide (PANTALEO *et al.*, 1993; MARTÍN & BANDRÉS, 1999). Durante a fase de latência clínica, as células infectadas do sistema fagocítico mononuclear e linfócitos T CD4⁺ em repouso exercem o papel de reservatórios e fonte de replicação do HIV-1, mantendo a infecção (FAUCCI, 1993; PANTALEO *et al.*, 1993; MARTÍN & BANDRÉS, 1999; SILICIANO, 1999). Sabe-se, ainda, que os macrófagos são capazes de produzir, por longo período, grande quantidade de vírions sem sofrer o efeito citopático do HIV-1 (ORENSTEIN *et al.*, 1988). A produção de vírions pelos macrófagos pode ser exacerbada por vários estímulos (MELLORS *et al.*, 1991; LAZDINS *et al.*, 1991; LATHEY *et al.*, 1994; BLOND *et al.*, 2000), entre eles a fagocitose de células apoptóticas (LIMA *et al.*, 2002).

1.7 TRATAMENTOS CORRENTES

Quase duas décadas após a descoberta dos primeiros casos de AIDS, o repertório de agentes terapêuticos e a eficiência do tratamento para essa síndrome evoluíram consideravelmente, contribuindo para a melhora da qualidade de vida dos indivíduos infectados pelo HIV-1. Pesquisadores dessa área buscam incessantemente melhorar a terapia anti-retroviral já existente. Novas alternativas para o tratamento são lançadas à medida que são feitas novas descobertas sobre a evolução genotípica e fenotípica do HIV-1, e sobre a patogênese e a história clínica da infecção por este vírus.

A maioria dos anti-retrovirais adotados na terapia combinada e os que estão em fase de testes pré-clínicos inibe a atividade das enzimas virais transcriptase reversa e protease (RICHMAN & STASZEWSKI, 1997). Esses agentes terapêuticos compreendem duas categorias, cujo modo de ação varia para cada uma delas, a saber: os inibidores da transcriptase reversa (ITR) e os inibidores de protease (IP) (Tab. 1).

Tabela 1- Classificação dos medicamentos anti-retrovirais atualmente em uso.

Categoria	Medicamentos (nome genérico e sigla)
Inibidores da Protease (IP)	Amprenavir (AMV) Indinavir (IDV) Lopinavir (LPV) Nelfinavir (NFV) Saquinavir (SQV) Ritonavir (RTV) Lopinavir e Ritonavir (LPV+RTV)
Inibidores análogos de nucleosídeos da transcriptase reversa (IANTR)	Abacavir (ABC) Zidovudina (AZT) Didanosina (ddI) Estavudina (d4T) Lamivudina (3TC) Zalcitabina (ddC) Zidovudina e Lamivudina (AZT+3TC) Abacavir, Zidovudina e Lamivudina (ABC+AZT+3TC)
Inibidores análogos de nucleotídeos da transcriptase reversa (IANTR)	Tenofovir
Inibidores não-nucleosídicos da transcriptase reversa (INNTR)	Delavirdina (DLV) Efavirenz (EFZ) Nevirapina (NVP)

Dados: Ministério da Saúde, 2002 e COHEN, 2002.

Os ITR são divididos em duas classes: os inibidores análogos de nucleosídeos e nucleotídeos (IANTR) e os inibidores não-nucleosídicos (INNTR). Os agentes da primeira categoria assemelham-se aos nucleosídeos naturais que a enzima transcriptase reversa utiliza para sintetizar a fita de cDNA viral. Eles não possuem a porção 3'-OH e, desse modo, impedem a formação da ligação fosfodiéster 3'-5' entre os nucleotídios da cadeia de DNA que está em formação (RICHMAN, 2001). A utilização do nucleosídeo análogo, pela enzima, bloqueia a transcrição, impedindo, assim, que a fita do cDNA se complete (RICHMAN, 2001). Os INNTR são numerosos compostos policíclicos quimicamente divergentes (RICHMAN, 2001) que se ligam muito próximo ao domínio catalítico da polimerase (KOHLSAEDT *et al.*, 1992). Ao se ligarem na enzima TR viral, esses inibidores “inativam” a enzima, tornando-a incapaz de

realizar sua função. Já os IP se ligam ao sítio ativo e catalítico da enzima protease, impedindo a sua atividade de clivagem das proteínas precursoras dos polipeptídeos necessários para a formação do core viral e para infecção celular pelo vírus (ABBAS *et al.*, 1997; RICHMAN *et al.*, 1998 e 2001).

Estima-se que a produção diária de novas partículas virais, em um indivíduo positivo para o HIV-1, pode atingir até 10×10^9 (PERELSON *et al.*, 1996). Sabe-se que a alta taxa de replicação viral facilita o surgimento de mutações e, além disso, a enzima transcriptase reversa não possui mecanismo de reparo para os erros cometidos durante a transcrição (PRESTON *et al.*, 1988). Sendo assim, é frequente que o genoma de novas gerações virais difira do original (PRESTON *et al.*, 1988). O acúmulo de mutações não reparadas, no genoma viral, pode resultar no aparecimento de variantes e contribuir para a emergência de isolados resistentes aos anti-retrovirais atualmente disponíveis para uso clínico. As enzimas-alvo das drogas anti-retrovirais também sofrem mutações que permitem ao vírus escapar do efeito inibitório das mesmas (RICHMAN *et al.*, 1998).

A emergência de isolados resistentes aos quimioterápicos administrados isoladamente (LARDER *et al.*, 1989; KOZAL *et al.*, 1993) motivou a adoção da multiterapia, também conhecida como HAART (sigla em inglês para highly active antiretroviral therapy), que inclui a associação entre ITR e IP (RICHMAN & STASZEWSKI, 1997; FINZI & SILICIANO, 2000). A utilização da HAART diminuiu consideravelmente a morbidade e mortalidade entre pacientes infectados pelo HIV-1, mesmo entre aqueles que apresentavam avançada depressão do sistema imunológico (PALELLA *et al.*, 1998). No entanto, evidências apontam para uma ineficiência da multiterapia na completa supressão da replicação viral (IVERSEN *et al.*, 1996; CHUN *et al.*, 1997; GÜNTARD *et al.*, 1998; WIT *et al.*, 1999; FINZI *et al.*, 1999; LAMBOTTE *et al.*, 2000), por não ser capaz de eliminar os reservatórios virais (macrófagos e linfócitos T CD4⁺ de memória, infectados pelo HIV-1) (CHUN *et al.*, 1997; FINZI *et al.*, 1999; SILICIANO, 1999; LAMBOTTE *et al.*, 2000). A terapia antiretroviral pode causar efeitos tóxicos (FLEXNER, 1998; WIT *et al.*, 1999; RICHMAN, 2001) e a emergência de isolados resistentes aos componentes da HAART (LARDER *et al.*, 1989; KOZAL *et al.*, 1993; IVERSEN *et al.*, 1996; HIRSCH *et al.*, 1998; GÜNTARD *et al.*, 1998; BRITES *et al.*, 2001). A difícil aderência ao regime de administração dos medicamentos (HIRSCH *et al.*, 1998; OLALLA *et al.*, 2002) e o alto custo para manter o tratamento são outros problemas que, somados aos já citados, tornaram

esses medicamentos insatisfatórios para suprimir com eficiência a replicação do HIV-1 em pacientes infectados (RICHMAN, 2001), ofuscando o sucesso da multiterapia.

Esse quadro, observado *in vivo* e *in vitro*, reforça a necessidade de desenvolvimento de novos compostos anti-HIV-1, com variados mecanismos de ação, que possam retardar ou impedir o desenvolvimento de resistência, controlando, assim, o progresso clínico da infecção pelo HIV-1. De fato, pouco mais de uma dezena de novas drogas anti-HIV-1, dirigidas a diferentes fases do ciclo da replicação viral, estão atualmente em ensaios pré-clínicos (COHEN, 2002). Além disso, uma ampla fonte alternativa para identificar outros anti-retrovirais é a extração de compostos naturais presentes na fauna e flora terrestres e aquática.

Durante o ciclo de replicação do HIV-1, além da transcrição reversa do genoma viral e de clivagem das proteínas precursoras do envelope e do core viral, vários passos são cruciais para que o ciclo se complete, e muitos deles são vulneráveis a inibidores específicos (MOORE *et al.*, 2000) (Fig. 1). A interação entre a gp120 e os receptores na membrana da célula alvo, a fusão entre o envelope viral e a membrana celular, a integração do cDNA viral ao genoma da célula, assim como a montagem e brotamento das novas partículas virais já estão sendo estudados como alvos de fármacos de origem natural para suprimir o ciclo replicativo do HIV-1 (Tab. 2). Além desses alvos, outros que também estão sendo estudados para este fim, são os fatores celulares que o vírus necessita para se replicar, como é o caso da glicosilação das proteínas do envelope e a própria replicação do DNA celular (LORI *et al.*, 1994; CHAPIUS *et al.*, 2000).

1.8 PRODUTOS NATURAIS E A INFECÇÃO PELO HIV-1

A utilização de produtos naturais para curar ou aliviar enfermidades não é exclusividade contemporânea (ALMEIDA, 2000). Desde tempos imemoriais, a natureza vem sendo explorada com este nobre fim (PRANCE, s.d; SOLAMOS, 1983; WONG, 1936 in VIEREGGE, 1999), revelando-nos, pela longa história do uso de seus produtos, aspectos de aproveitamento e eficácia dos mesmos para o bem-estar da humanidade.

Atualmente, tem-se dado ênfase ao estudo desses produtos, resgatando as práticas tradicionais da medicina popular e aumentando, cada vez mais, o número de publicações que abordam os diferentes aspectos sobre a sua utilização. Algumas dessas publicações abordam o seu uso popular (DÍ STASI *et al.*, 1989; CARIBÉ E CAMPOS, 1999; ALMEIDA, 2000),

enquanto que outras enfocam o conhecimento científico, evidenciando a eficácia das drogas existentes nos extratos de origem vegetal e animal (VLIETINCK *et al.*, 1998; MATTHÉE *et al.*, 1999)

Os produtos químicos de origem vegetal são amplamente utilizados na medicina moderna, devido às importantes funções terapêuticas que eles possuem. Muitos agentes terapêuticos foram desenvolvidos a partir de conhecimentos gerados pelo uso de plantas na medicina tradicional. Até 1997, quase 50% do mercado de medicamentos cabiam a produtos de origem natural (ROBBERS *et al.*, 1997). Além de fornecerem medicamentos úteis, esses produtos fornecem componentes básicos que podem ser ligeiramente modificados para tornarem-se mais eficazes e com baixa toxicidade (GLICK *et al.*, 1996) ou, ainda, que podem ser utilizados como protótipos ou modelos para medicamentos sintéticos que tenham atividades farmacológicas semelhantes às dos originais (BORMANN & KUEHNE, 1992; ROBBERS *et al.*, 1997; BANDARAGE *et al.*, 1999).

Tendo em vista as limitações dos atuais anti-retrovirais, muitas pesquisas estão voltadas para descobertas de novos agentes quimioterápicos para o tratamento da infecção pelo HIV-1. Agentes de origem vegetal pertencentes a diferentes classes químicas como os alcalóides, flavonóides, taninos e terpenóides são investigados com relação a sua capacidade de inibir a replicação do HIV-1, em diferentes níveis de seu ciclo replicativo (WALKER *et al.*, 1987; TAN *et al.*, 1991a; TAN *et al.*, 1991b; HOUGHTON, 1994; MCMAHON *et al.*, 1995; LIM *et al.*, 1997; POMMIER *et al.*, 2000) (Tab. 2).

Tabela 2- Compostos químicos de origem natural com atividade anti-HIV-1.*

AGENTES QUIMICOS	IAV	IFC	ITR	II	IP	IG
Alcalóides	+	+	+	+	+	+
Carboidratos	+	+				
Coumarinas		+	+	+	+	
Flavonóides	+	+	+			
Lignanas	+		+	+		
Fenólicos	+	+	+			
Proteínas				+		
Quinonas/Xantonas			+		+	
Taninos	+		+			
Terpenos	+	+	+		+	

*Adaptado de Tan, 1991; Vlietinck, 1999; Savarino, 2001.

IAV: inibidores da adsorção viral; **IFC:** inibidores da fusão celular; **ITR:** inibidores da transcriptase reversa; **II:** inibidores da integrase; **IP:** inibidores da protease; **IG:** inibidores da glicosilação.

Alguns desses compostos já estão em estágios avançados de testes clínicos em pacientes infectados pelo HIV-1, como, por exemplo o alcalóide semi-sintético hidroxicloroquina (SPERBER *et al.*, 1995 e 1997), o carboidrato aceman (VLIETINCK *et al.*, 1998) e a proteína GLQ223 (KAHN *et al.*, 1994). Por apresentarem atividade antiviral em diferentes estágios do ciclo de replicação do HIV-1, é possível que esses compostos em testes clínicos venham, no futuro, ser utilizados no tratamento da AIDS. Os extratos de origem vegetal também estão sendo utilizados para esse fim, como é o caso do extrato da espécie *Glycyrrhiza glabra*, que contém o constituinte ativo glicirizina, utilizado em terapias alternativas para infecção do HIV-1 (HATTORI *et al.*, 1989).

1.9 ALCALÓIDES

Os alcalóides são compostos nitrogenados, geralmente contendo um átomo de nitrogênio na forma amina primária (RNH_2), secundária (R_2NH) ou terciária (R_3N), presentes em animais, vegetais, fungos e bactérias (DOMINGUEZ, 1973; ROBBERS *et al.*, 1997). O reino vegetal é a fonte mais rica em alcalóides, e sua distribuição parece se restringir a certas famílias. (ROBBERS *et al.*, 1997)

As famílias Apocinaceae, Leguminosae, Papaveraceae, Ranunculaceae e Rutaceae apresentam uma ampla variedade de alcalóides (DOMINGUEZ, 1973), os quais estão distribuídos nas sementes, caules, raízes, rizomas, casca, folhas e frutos desses vegetais (SOLOMOS *et al.*, 1983; ROBBERS *et al.*, 1997). A maioria dos alcalóides é sólida, básica e de coloração variada (amarela e roxa), pouco hidrossolúvel, podendo ser totalmente solúveis em soluções ácidas. Os alcalóides não-oxigenados são líquidos, voláteis e com odor forte.

Investigações científicas sobre os alcalóides de origem vegetal são cada vez mais frequentes em razão do seu efeito contra alguns patógenos: a hidroxicloroquina (anti-malárico e anti-HIV-1) (SPERBER *et al.*, 1995 e 1997); licorina e licorinadiacetato (anti-malárico) (CAMPBELL *et al.*, 1997); corinolina e acetilcorinolina (tóxicos para fungos fitopatogênicos) (MA *et al.*, 1999); coronaridina e 18- metoxi-coronaridina (anti-*Leishmania*) (DELORENZI *et al.*, 2001 e 2002). Apesar dos seus efeitos tóxicos (SOLOMOS, 1983; AYOUB *et al.*, 1994; VIEREGGE *et al.*, 1999; MA, 1999 e 2000; DASSONNEVILLE *et al.*, 2000; LAMCHOURI *et al.*, 2000), muitos alcalóides exercem potentes efeitos farmacológicos nos mamíferos e, por isso, eles são amplamente utilizados na medicina como analgésicos e narcóticos (morfina e codeína),

estimulantes do sistema nervoso central (arecolina, estricnina, brucina e cafeína), midriáticos (atropina), mióticos (fisostigmina e pilocarpina), tranqüilizantes e agentes que reduzem a pressão sanguínea (reserpina) ou que a elevam (efedrina) (SOLOMOS, 1983; IKAN *et al.*, 1991; ROBBERS *et al.*, 1997). Eles também são utilizados no tratamento de doenças como a malária (quinina) e o câncer (vincristina), enquanto que outros causam dependência psicológica e física nos usuários e fumantes crônicos (cocaína, nicotina) (SOLOMOS, 1983; ROBBERS *et al.*, 1997). Alguns alcalóides já foram identificados como capazes de inibir o HIV-1, tais como, schumannifina (HOUGHTON *et al.*, 1994), miquelamina B (MCMAHON *et al.*, 1995) e castanospermina (WALKER *et al.*, 1987). O terpeno glicirizina (HATTORI *et al.*, 1989), o alcalóide semi-sintético hidroxicloroquina (SPERBER *et al.*, 1997) e outros (VLIETINCK *et al.*, 1997) foram testados em pacientes com AIDS ou infectados pelo HIV-1.

1.10 ALCALÓIDES INDÓLICOS

Os alcalóides indólicos são assim classificados devido a presença de um anel indólico na sua estrutura química. A coronaridina (COR) (Fig.2) é um alcalóide indólico, tipo iboga, purificado do extrato cru do caule da *Peschiera australis* (RATES *et al.*, 1993). Pouco se sabe sobre os efeitos da COR *in vivo* e *in vitro*, porém, alguns trabalhos relatam suas propriedades anti-tumoral (RATES *et al.*, 1993), anti-dependência química (GLICK *et al.*, 1994) anti-inflamatória (HENRIQUES *et al.*, 1996) e anti-leishmania (DELORENZI *et al.*, 2001).

A COR, assim como a ibogamina e a tabernantina, são análogos da ibogaina. Esta última, testada *in vivo*, apresenta propriedades anti-dependência química, mas também produz efeitos tremorigênicos (GLICK *et al.*, 1994), neurotóxicos, cardiovasculares e alucinógenos (GLICK *et al.*, 2000a). Devido a esses efeitos colaterais associados à ibogaina, esta foi recentemente modificada com a finalidade de exercer o mesmo efeito anti-dependência química sem causar, porém, os efeitos neurotóxicos, tremorigênicos e cardiovasculares (GLICK *et al.*, 1996; GLICK *et al.*, 2000b), associados ao seu uso *in vivo*. Tal modificação consistiu na inserção do grupamento metila no carbono 18 da COR, resultando, então na 18-Metoxi-Coronaridina (18M-COR) (Fig. 2).

Os alcalóides indólicos ibogaina e hidroxicloroquina já foram testados *in vivo*, inclusive em humanos. A ibogaina, testada em pacientes com dependência a opióides, demonstrou efeito rápido e eficaz. Em experimentos realizados em camundongos, foi observado que, com 24 horas

de tratamento com a ibogaína, estes animais não demonstraram comportamento de procura do opióide, e essa condição foi mantida por 72 horas após o tratamento (ALPER *et al.*, 2000). A hidroxicloroquina, testada em pacientes com AIDS, foi capaz de reduzir o nível plasmático de RNA do HIV-1 e do antígeno p24 no soro dos pacientes, após 16 semanas de tratamento (SPERBER *et al.*, 1995 e 1997).

No presente trabalho, nós estudamos as propriedades inibitórias do alcalóide indólico natural COR e do seu análogo sintético 18M-COR sobre o crescimento do HIV-1 *in vitro*. A espécie vegetal *Peschiera australis* (Mull. Arg.), do qual foi extraída a COR, pertence à família botânica Apocynaceae e pode ser encontrada na Argentina, no Uruguai, no Paraguai e no Brasil (Rio Grande do Sul e na Serra de Macaé de Cima, Rio de Janeiro), onde é conhecida popularmente como jasmim, leiteira-dois-irmãos, casca de cobra, jasmim-pipoca e sapiranguí (GEMTCHUJINICOU, 1976). Deste vegetal já foram extraídos sete alcalóides indólicos, a saber: cinco monoméricos (coronaridina, olivacina, catarinesina, tabersonina e coronaridina-hidroindolina) e dois diméricos (tabernamina e decarbometoxivoacamine) (RATES *et al.*, 1993).

A resistência à resposta imunológica humoral, a alta frequência de mutações genéticas e a geração de partículas infecciosas resistentes a quimioterápicos, são características do HIV-1 que apontam para a necessidade de uma permanente busca de formas profiláticas (campanhas de prevenção e vacinas anti-HIV) e terapêuticas, que restrinjam a disseminação do vírus na população e inibam a sua multiplicação no paciente infectado. A gigantesca diversidade de estruturas químicas encontradas em produtos naturais deve ser vista como uma fonte de novos quimioterápicos para a infecção pelo HIV-1, pois numerosas substâncias de origem vegetal, de um amplo espectro químico (alcalóides, carboidratos, flavonóides, quinonas, fosfolipídeos, terpenos, etc), já foram descritas como capazes de inibir a replicação deste vírus. Assim, nós pretendemos avaliar o efeito anti-HIV-1 do alcalóide indólico coronaridina e do seu análogo sintético 18M-COR, os quais são potentes agentes leishmanicidas *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para a identificação de novos fármacos capazes de inibir a replicação do HIV-1 *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 - Verificar se o alcalóide indólico coronaridina inibe a replicação do HIV-1 em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC).

2.2.2 - Investigar se a 18-metoxi-coronaridina (derivado sintético da coronaridina) inibe a replicação do HIV-1 em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e em macrófagos derivados de monócitos (MDM) humanos;

2.2.3 - Comparar o efeito inibitório da 18-metoxi-coronaridina com um antiretroviral já em uso na terapia anti-HIV-1;

2.2.4 –Investigar o mecanismo do efeito inibitório da 18-metoxi-coronaridina sobre a replicação do HIV-1.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CÉLULAS

3.1.1 – Células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram obtidas a partir de bolsas de sangue (“buffy coat”), de indivíduos soronegativos para o HIV-1, doadas pelo Hemocentro da Bahia (HEMOBA, Salvador, BA). O sangue doado é testado para HIV-1, assim como para HTLV-I/II, Sífilis, doença de Chagas e Hepatites, por diferentes métodos sorológicos utilizados neste Hemocentro. A purificação de PBMC foi feita por centrifugação em gradiente de densidade em Ficoll-hypaque 1077 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), para o quê dois volumes de sangue total diluído 1:1 em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma) foram acrescentados cuidadosamente sobre um volume de ficoll-hypaque, e centrifugados a 400xG, durante 20 minutos à 20^oC. Então, o anel de células, formado na interface entre o plasma diluído e o ficoll-hypaque, foi coletado e as células mononucleares foram lavadas e contadas em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi rotineiramente avaliada pelo corante vital Azul de Trypan, obtendo-se sempre viabilidade acima de 90%. Os PBMC foram, então, estimulados pelo mitógeno fito-hemaglutinina (2ug/ml) (PHA, Sigma) durante dois a três dias, em RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB, Hyclone, Logan, UT, USA), 10mM de ácido N-2-hydroxyethylpiperazina-N'-2-ethanesulfônico (HEPES, Sigma), glutamina (2mM) (Sigma), penicilina (100u/ml) e estreptomicina (100ug/ml), numa suspensão de 1,5x10⁶ células/ml. As células ativadas foram mantidas em meio de cultura suplementado com 5U/ml de interleucina-2 recombinante (rIL-2, Sigma) para os ensaios de infecção viral. A cultura celular foi sempre mantida em ambiente úmido, a 37^oC, 5% de CO₂.

3.1.2 Macrófagos primários humanos (MDM)

Para obtenção de macrófagos derivados de monócitos (MDM), PBMC foram submetidos à aderência em placas de 24 poços (Corning, New York, NY, EUA), em RPMI sem soro (3×10^6 cel/500 μ l/poço), durante 1h, a 37 °C e 5% CO₂. Em seguida, as células não-aderentes foram removidas, e os monócitos remanescentes foram mantidos em cultura com meio Dulbecco (Sigma) suplementado com 10% de soro humano (SH, Sigma), HEPES e penicilina-estreptomicina, durante 6 a 7 dias, a 37 °C e 5% CO₂, para diferenciação em macrófagos. Após diferenciação, estas células foram utilizadas para infecção pelo HIV-1. A pureza da população de macrófagos foi avaliada pela medida do número de células positivas para o marcador CD14, como descrito (FERRARO *et al.*, 2001). Em resumo, as células aderentes foram destacadas e analisadas com anticorpos monoclonais anti-CD3-FITC e anti-CD14-PE (Becton Dickinson, San Jose, CA) em citofluorimetria de fluxo (FacSort, Becton Dickinson), e o percentual de células CD14⁺ foi usualmente superior a 90%.

3.2 ISOLADOS VIRAIS

Foram selecionados três isolados primários de HIV-1, de acordo com as características fenotípicas requeridas para esse estudo: Ba-L, 95BRBA007 e 95BRRJ010. O vírus Ba-L nos foi doado pelo Dr. Michael A. Norcross (CBER, US FDA, Bethesda, MD, USA); os vírus 95BRBA007 e 95BRRJ010 foram isolados em nosso laboratório, como descrito (BRAZILIAN NETWORK FOR HIV-1 ISOLATION E CHARACTERIZATION, 2000).

Para a obtenção de uma maior concentração viral, PBMC de doadores normais foram infectados pelos respectivos isolados virais (10^7 cél/ml de sobrenadante positivo para o HIV-1) e incubados por 8 a 12 horas a 37⁰ C, 5% de CO₂. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio de cultura, como descrito anteriormente, e cultivadas em placas de 24 poços, distribuindo-se 10^6 cel/2ml em cada poço. A cada sete dias, durante duas semanas, os sobrenadantes foram colhidos e estocados a -70⁰C. Também semanalmente, as culturas foram alimentadas com células e meio de cultura frescos ($0,5 \times 10^6$ PBMC/ml). A replicação viral foi avaliada pela medida do antígeno p24, nos sobrenadantes de cultura, utilizando-se “kits” elisa comerciais (ZeptoMetrix Co., Buffalo, NY, USA), de acordo com as instruções do fabricante. As características fenotípicas e o uso preferencial de coreceptores destes isolados foram

previamente estudadas em nosso laboratório (FERRARO *et al.*, 2001), e estão resumidas na tabela 3.

Tabela 3- Características fenotípicas dos isolados virais utilizados neste estudo

Isolados	Formação de sincício ¹	Replicação viral ²		Uso de receptor ³	
		PBMC	MDM	CCR5	CXCR4
Ba-L	-	+	+	+	-
95BRBA007	+	+	+	+	+
95BRRJ010	+	+	-	-	+

Adaptado de Ferraro *et al.*, 2001

¹Capacidade de formar sincícios em célula tumoral CD4⁺ MT2

² +, positivo, e -, negativo para replicação viral

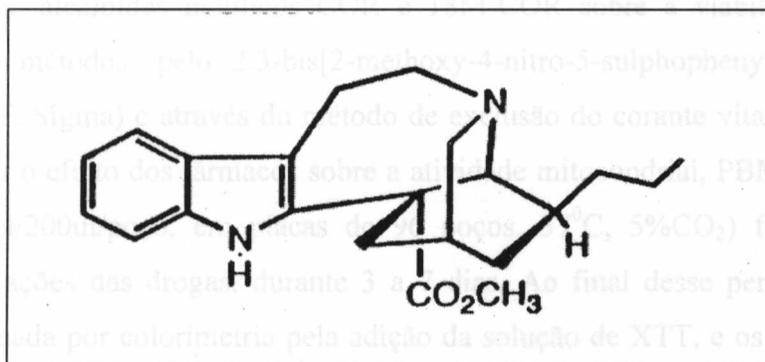
³ +, crescimento viral positivo em células tumorais U87 que expressam o receptor CD4 e o correceptor CCR5 ou CXCR4 e -, ausência de crescimento nas mesmas células.

3.3 DROGAS

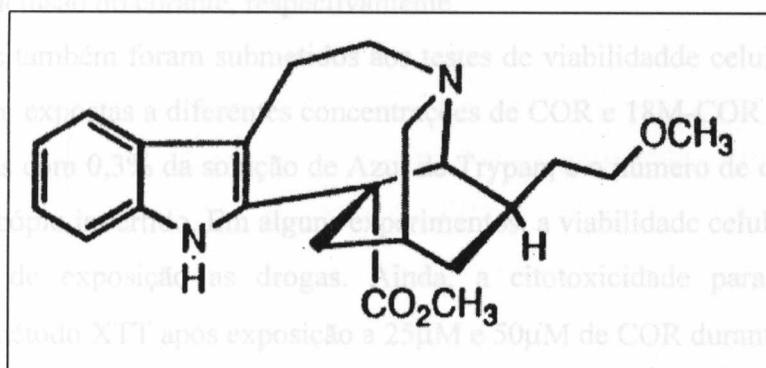
O alcalóide indólico coronaridina (COR) (Fig.2) foi isolado da fração clorofórmica de *Peschiera australis* (DELORENZI *et al.*, 2001) e gentilmente fornecido pela Dra. Elvira M. B. Saraiva (Depto. de Imunologia, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil). O derivado sintético 18-metoxi-coronaridina (18M-COR) (Fig.2), cloridrato solúvel em água, foi sintetizado de acordo com Bormann & Kuehne (1992) e Badarage e colaboradores (1999), e nos foi gentilmente doado pelo Dr. Martin Kuehne (Universidade de Vermont, Burlington, VT, USA). Os fármacos foram dissolvidos em meio de cultura RPMI puro para preparar soluções-estoque na concentração de 1mg/ml. A seleção das concentrações destes fármacos utilizadas no nosso estudo (12,5µM; 25µM e 50µM), foi baseada em estudos prévios (DELORENZI *et al.*, 2001).

3.4 AZIDOTIMIDINA (AZT)

Utilizamos o agente anti-retroviral 3'-azido-3'-deoxitimidina (AZT, Sigma) como padrão de inibição da replicação do HIV-1 em ensaios realizados em paralelo com 18M-COR, em concentrações (0,12µM; 0,25µM; 0,5µM e 1µM) igualmente selecionadas com base em trabalhos publicados por outros autores (MCMAHON *et al.*, 1995; e HEREDIA *et al.*, 2000).



a) **CORONARIDINA**



b) **18-METOXI-CORONARIDINA**

Figura 2 -Estruturas do alcalóide indólico coronaridina (a) e o seu análogo sintético 18-metoxi-coronaridina (b).

Adaptado de Glick (2000).

3.5 TESTES DE VIABILIDADE CELULAR (XTT E AZUL DE TRYPAN)

O efeito dos alcalóides indólicos COR e 18M-COR sobre a viabilidade celular foi avaliado por dois métodos: pelo 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]2H-tetrazolium-carboxanilida (XTT, Sigma) e através do método de exclusão do corante vital Azul de Trypan (Sigma). Para testar o efeito dos fármacos sobre a atividade mitocondrial, PBMC de indivíduos normais (2×10^5 cél/200ul/poço, em placas de 96 poços, 37°C , $5\%\text{CO}_2$) foram expostos a diferentes concentrações das drogas, durante 3 a 7 dias. Ao final desse período, a atividade celular foi determinada por colorimetria pela adição da solução de XTT, e os resultados foram analisados pela leitura da absorbância a 450nm, como descrito (SCUDIERO *et al.*, 1988).

Para testar a viabilidade celular, através da integridade da membrana, amostras de PBMC foram expostas às mesmas concentrações das drogas COR e 18M-COR, como acima, e tratadas pelo corante Azul de Trypan. As células foram discriminadas como vivas ou mortas pela exclusão ou inclusão do corante, respectivamente.

Macrófagos também foram submetidos aos testes de viabilidade celular citados acima. Estas células foram expostas a diferentes concentrações de COR e 18M-COR durante sete dias, lavadas e incubadas com 0,3% da solução de Azul de Trypan, e o número de células viáveis foi medido em microscópio invertido. Em alguns experimentos, a viabilidade celular foi avaliada ao final de 21 dias de exposição as drogas. Ainda, a citotoxicidade para macrófagos foi determinada pelo método XTT após exposição a $25\mu\text{M}$ e $50\mu\text{M}$ de COR durante sete dias.

3.6 INFECÇÃO CELULAR PELO HIV-1 E EFEITO INIBITÓRIO DE COR E DE 18M-COR

3.6.1 Macrófagos

Os macrófagos foram infectados com o isolado monocitotrópico Ba-L (5 a 10ng/ml de p24; 37°C ; $5\%\text{CO}_2$), durante 16 a 18 horas. Em seguida, as células foram lavadas para remoção do vírus residual, e cultivadas na presença ou não de diferentes concentrações do alcalóide indólico sintético 18M-COR, durante três semanas. A cada sete dias, metade do meio de cultura era renovada e 18M-COR re-adicionado às culturas. A replicação viral foi avaliada pela medida de antígeno p24 em ensaio imunoenzimático e/ou da atividade da enzima transcriptase reversa

(TR) nos sobrenadantes de cultura colhidos no 7^o, 14^o e 21^o dias após a infecção viral. A atividade da enzima viral transcriptase reversa foi avaliada através da contagem por minuto (CPM) da emissão de partículas β . Resumidamente, a reação consta da mistura de um “primer” poli(rA)-oligo(dT), incluindo adenina e timidina tritiada, em um tampão adequado para o alongamento de fitas de DNA. A enzima transcriptase reversa presente no sobrenadante das culturas funciona como o catalizador da reação polimerizadora da fita em cintilador líquido. O antígeno p24 (Ag p24) foi quantificado em ensaios de captura (ELISA) específicos, como descrito anteriormente.

3.6.2 PBMC

PBMC foram infectados com sobrenadantes positivos dos isolados Ba-L, 95BRBA007 e 95BRRJ010 (5 a 10ng/mL; 37 ° C; 5% CO₂) durante 2 a 3 h. As células foram lavadas para remoção do vírus residual e cultivadas com diferentes concentrações de COR ou 18M-COR, em placas de 96 poços (2x10⁵ cel/200 μ l/poço), em triplicatas. As células infectadas foram mantidas em cultura por 7 a 10 dias, em meio RPMI completo, suplementado com IL-2. Após este período, a replicação viral foi avaliada pela medida de antígeno p24 em ensaio imunoenzimático e/ou da atividade de TR nos sobrenadantes de cultura, como mencionado acima.

Em alguns experimentos de infecção de PBMC foram executados procedimentos distintos. No primeiro deles (P1), os PBMC foram cultivados com 18M-COR, durante três dias. Então, o alcalóide foi removido e o meio de cultura foi readicionado à cultura, sem renovação da droga. No segundo procedimento (P2), a cultura foi mantida nas mesmas condições experimentais do procedimento anterior, sendo que a droga foi readicionada à cultura durante a renovação do meio no terceiro dia. Em ambos os procedimentos, as células foram mantidas em cultura por mais sete dias, e a replicação viral foi avaliada como descrito, após o décimo dia de cultura.

3.7 ANÁLISE DO MECANISMO DE AÇÃO DA 18M-COR

Tendo em vista a existência de relatos anteriores de que alcalóides inibem a enzima transcriptase reversa (TR) (TAN *et al.*, 1991a; MCMAHON *et al.*, 1995), nós resolvemos investigar se a 18M-COR também apresenta esta propriedade. Para isto, avaliamos o efeito inibitório da 18M-COR sobre a atividade polimerásica da enzima TR recombinante do HIV-1, obtida como descrito por Da Matta e colegas (1998). A reação de polimerização foi realizada como descrito (DA MATTA *et al.*, 1998), misturando-se 50 mM de Tris HCl (pH 7,8), 6 mM de MgCl₂, 1 mM de dithiothreitol, 50 mM de KCL, 20 uM de timidina tri-fosfato (dTTP), 10 uM de [³H]-dTTP (47 Ci/mmol), 150 ug/mL de poli(rA)-oligo(dT) (Pharmacia) e 1 U da enzima TR (definida como a quantidade da enzima que incorpora 1 pmol de dTTP nas condições padronizadas). Esta mistura foi incubada durante 30 min a 37⁰ C com a adição ou não de diferentes concentrações de 18M-COR ou de AZT, usado como controle positivo para inibição da TR. A reação foi interrompida acrescentando-se ácido tricloroacético gelado (5%) e 20 mM de pirofosfato de sódio. Os precipitados foram coletados em filtros de nitrocelulose, lavados com fosfato de sódio a 0,1 M, e a incorporação de [³H]-dTTP foi medida por cintilação líquida. Os resultados são apresentados na tabela 8 como percentagem de inibição da atividade da TR, em relação à atividade polimerásica observada na ausência de agentes inibidores da enzima.

4 RESULTADOS

4.1 CONCENTRAÇÕES DOS ALCALÓIDES INDÓLICOS COR E 18M-COR

As concentrações de COR e de 18M-COR que utilizamos nos nossos estudos (12,5 μ M, 25 μ M e 50 μ M) foram selecionadas com base em achados anteriores, que demonstraram que concentrações semelhantes foram efetivas no controle da infecção por leishmania em macrófagos murinos (DELORENZI *et al.*, 2001).

4.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS E PBMC EXPOSTOS A COR E 18M-COR

Para testar o efeito das drogas COR e 18M-COR sobre a viabilidade de células humanas, macrófagos e PBMC foram tratados com diferentes concentrações dos mesmos, e a viabilidade celular foi avaliada através do método de exclusão do corante Azul de Trypan. Macrófagos tratados com as concentrações de 25 μ M e 50 μ M de 18M-COR, durante 21 dias, mantiveram viabilidade celular de 99% e 96,6% (n = 4), respectivamente. Quando macrófagos foram expostos a 50 μ M de COR, durante 7 dias, a viabilidade celular não sofreu alteração (96%, n = 3). Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Delorenzi e colegas (2002), com macrófagos murinos os quais foram tratados com as referidas drogas, nas mesmas concentrações, durante 24h.

Quando PBMC humanos foram tratados com 25 μ M e 50 μ M de COR ou 18M-COR, durante 7 dias, não ocorreu alteração significativa na viabilidade destas células, avaliada pelo Azul de Trypan (Tab.4). A viabilidade celular foi de 94% para as duas concentrações de 18M-COR, e de 95% e 99% para 25 μ M e 50 μ M da COR, respectivamente.

Em paralelo à avaliação da viabilidade celular pelo Azul de Trypan, o efeito das duas drogas sobre a atividade mitocondrial foi avaliado em PBMC, utilizando-se o método XTT. Observamos que os alcalóides inibiram de leve a moderadamente a atividade mitocondrial dessas células (Tab.4). COR inibiu entre 16% e 21% a atividade mitocondrial quando PBMC foram tratados com 25 μ M e 50 μ M. A 18M-COR, por sua vez, apresentou um percentual de inibição entre 19% e 28% sob as mesmas condições experimentais.

Tabela 4- Viabilidade celular e atividade mitocondrial de PBMC pré-ativados com PHA, de diferentes doadores normais, expostos a 18M-COR ou COR.

Testes	18M-COR (μM)		COR (μM)	
	25	50	25	50
Azul de Trypan	94 \pm 3*	94 \pm 2	95 \pm 5	99 \pm 1
XTT	81 \pm 4	72 \pm 4	84 \pm 5	79 \pm 7

Os resultados apresentados correspondem ao percentual do controle (PBMC mantidos apenas em meio de cultura suplantado com IL-2). Os testes foram feitos com células de 6 doadores diferentes para cada droga, e a viabilidade celular foi avaliada após 7 dias de cultura, exceto o teste XTT, cujas leituras foram realizadas após 3 ou 7 dias de cultura, com resultados semelhantes.

*Média \pm erro padrão da média

Digno de nota, a atividade mitocondrial de macrófagos murinos tratados com 25 μM e 50 μM de COR (DELORENZI *et al.*, 2002), foi de 95% e 90% (n=5), respectivamente.

4.3 COR INIBE A REPLICAÇÃO DO HIV-1 EM PBMC (EFEITO DOSE-DEPENDENTE)

Em ensaios preliminares, verificamos o efeito inibitório do alcalóide indólico de origem natural coronaridina (COR) sobre a replicação dos isolados de HIV-1 Ba-L (R5) e 95BRBA007 (R5X4). Os resultados mostram que COR exerce efeito inibitório dose-dependente para os dois isolados de HIV-1 utilizados (Fig.3). A replicação do isolado Ba-L foi inibida em 62% e 96%, pelas concentrações de 25 μM e 50 μM de COR, respectivamente. O efeito inibitório crescente foi também observado para o isolado 95BRBA007, cuja replicação foi inibida em 30% e 74% pelas concentrações de 25 μM e 50 μM de COR, respectivamente.

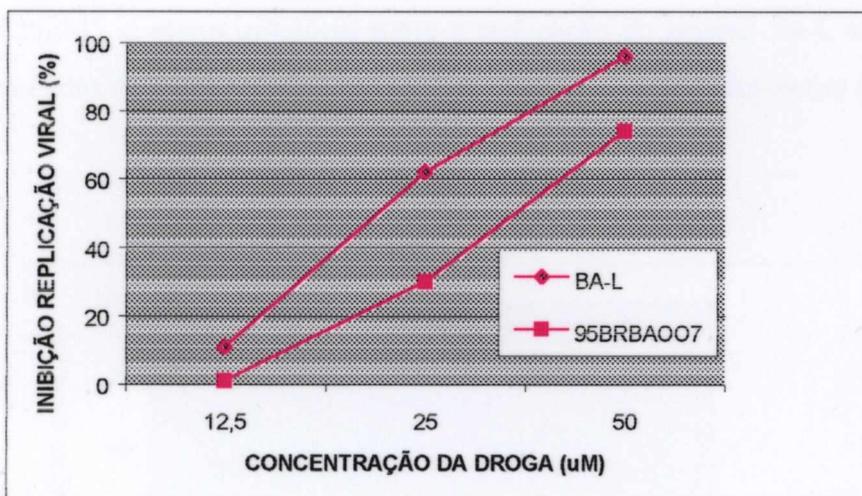


Figura 3- COR inibe a replicação do HIV-1 de modo dose-dependente. PBMC de doadores normais foram infectados com Ba-L ou 95BRBA007. As células foram lavadas, e a COR foi adicionada às culturas nas concentrações indicadas. Após 7 dias, a replicação do HIV-1 foi avaliada pela detecção da atividade da enzima transcriptase reversa, nos sobrenadantes de cultura.

4.4 18M-COR INIBE A REPLICAÇÃO DO HIV-1, EM PBMC, INDEPENDENTEMENTE DO TROPISMO CELULAR DO HIV-1

Tendo em vista que a COR apresentou efeitos tremorigênicos, em estudos anti-dependência a opióides, em ratos (GLICK *et al.*, 1994), esse alcalóide foi modificado para reduzir tais efeitos, resultando na 18M-COR, como relatado anteriormente. Como já dispomos deste alcalóide sintético em nosso laboratório, a 18M-COR passou a ser utilizada nas nossas investigações sobre o efeito inibitório da replicação do HIV-1.

Iniciamos, então, os estudos sobre a capacidade da 18M-COR em inibir a replicação do HIV-1 em células primárias. Em primeiro lugar, verificamos o efeito inibitório deste composto sobre isolados R5, X4 e R5X4 em PBMC. A 18M-COR inibiu a replicação dos três isolados virais que apresentam tropismos distintos para os receptores de quimiocinas. Encontramos

potente efeito deste produto sobre a replicação do vírus Ba-L (R5), igual ou superior a 60% do crescimento viral, para a concentração de 50 μ M desta droga (Fig.4). Na concentração intermediária (25 μ M), o efeito inibitório sobre a replicação do isolado Ba-L variou de leve a moderado, nas células de 2 doadores, atingindo mais de 90%, nas células de um doador.

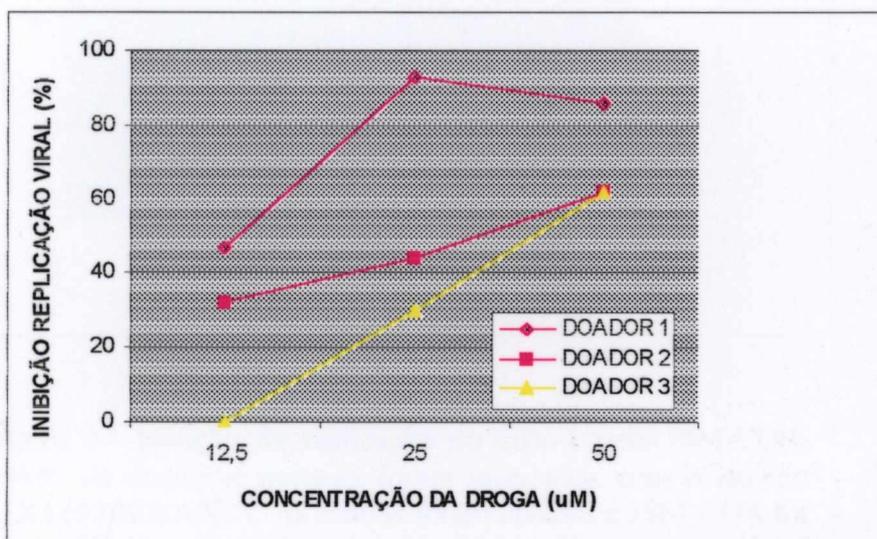


Figura 4— Inibição da replicação do HIV-1 pela 18M-COR. PBMC de doadores normais foram infectados com o isolado R5 (Ba-L). As células foram lavadas e a 18M-COR foi adicionada às culturas nas concentrações indicadas. Após 7 dias, a replicação do HIV-1 foi avaliada pela detecção da atividade da enzima transcriptase reversa, nos sobrenadantes de cultura.

A 18M-COR foi também capaz de inibir a replicação do isolado 95BRBA007 (R5X4) (Fig. 5). O efeito inibitório foi igual a $54 \pm 9\%$ e $75 \pm 3\%$, nas concentrações de 25 μ M e 50 μ M, respectivamente, para três doadores. Como para o isolado R5 (Fig.4), a concentração de 12,5 μ M apresentou efeito inibitório abaixo de 50% para o isolado R5X4 (Fig. 5).

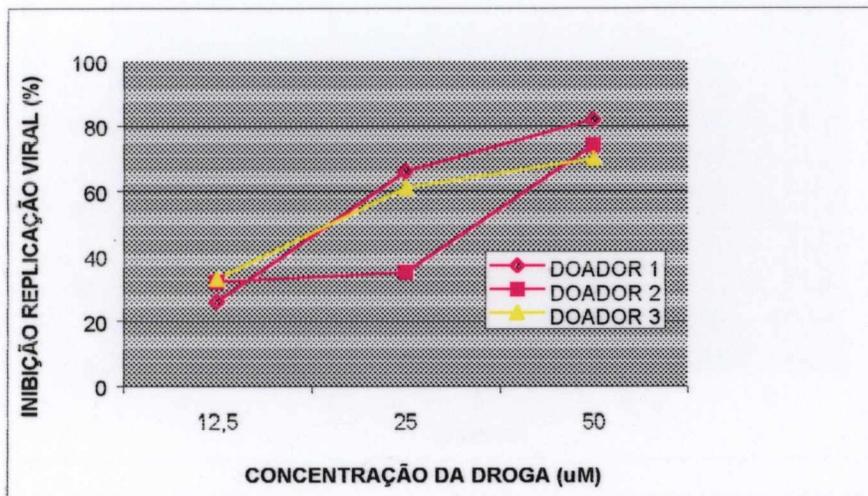


Figura 5– Inibição da replicação do HIV-1 pela 18M-COR. PBMC de doadores normais foram infectados com o isolado R5X4 (95BRBA007). As células foram lavadas e 18M-COR foi adicionada às culturas nas concentrações indicadas. Após 7 dias, a replicação do HIV-1 foi avaliada pela detecção da atividade da enzima transcriptase reversa, nos sobrenadantes de cultura.

Tendo em vista que a concentração de 50µM da 18M-COR inibe eficientemente a replicação dos isolados R5 e R5X4, e também pela limitada disponibilidade do produto, resumimos a esta dose a avaliação do efeito deste alcalóide sobre a replicação do isolado X4 (95BRRJ0010). Constatamos que a 18M-COR também exerce potente atividade inibitória ($72 \pm 6\%$, $n = 5$) sobre a replicação do isolado trópico para CXCR4 (Fig.6).

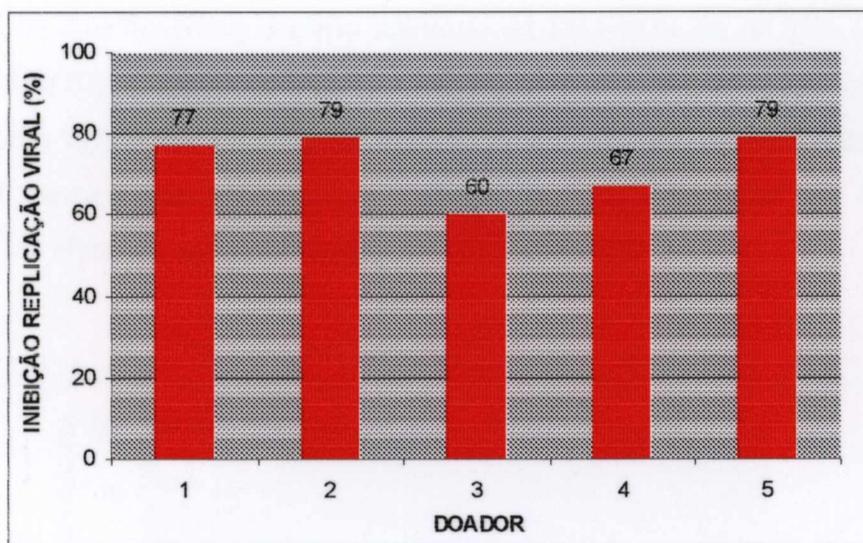


Figura 6- Inibição da replicação do HIV-1 pela 18M-COR. PBMC de doadores normais foram infectados com o isolado X4 (95BRRJ0010). As células foram lavadas e 18M-COR foi adicionada às culturas na concentração de 50 μ M. Após 7 dias, a replicação do HIV-1 foi avaliada pela detecção da atividade da enzima transcriptase reversa, nos sobrenadantes de cultura.

Nossos dados sugerem que o alcalóide indólico sintético 18M-COR inibe a replicação do HIV-1, independentemente do uso preferencial de receptores de quimiocinas dos isolados virais.

4.5 O EFEITO INIBITÓRIO PRONUNCIADO DEPENDE DA PERMANÊNCIA DA 18M-COR EM CULTURA

Como pode ser visto nos resultados anteriores, dentre as concentrações da 18M-COR capazes de inibir a replicação do HIV-1, a de 50 μ M exibe o efeito inibitório mais intenso. Sendo assim, esta concentração foi usada em testes de inibição da replicação do HIV-1, estando a 18M-COR presente na cultura de PBMC infectados em distintos períodos de tempo. Em um procedimento (P1), as células infectadas foram expostas a 18M-COR durante apenas 3 dias. Então, as células foram lavadas e o meio de cultura renovado, sem readição da droga. No 10^o dia de cultura (ou seja, sete dias após a remoção da 18M-COR), os sobrenadantes foram

colhidos para avaliação da replicação do HIV-1. No outro procedimento (P2), a cultura de células foi submetida às mesmas condições, exceto pela permanência da droga durante 10 dias. Em PBMC de dois doadores, o efeito inibitório da 18M-COR foi de 35% (doador 1) e 49% (doador 2) para P1, enquanto que em P2 a inibição foi de 61% e 69%, respectivamente (Fig.7). Estes números significam uma amplificação do efeito inibitório de 74% (doador 1) e de 40% (doador 2). Esses dados sugerem que a permanência da 18M-COR nas culturas celulares favorece o seu efeito neutralizador ótimo *in vitro* sobre o HIV-1.

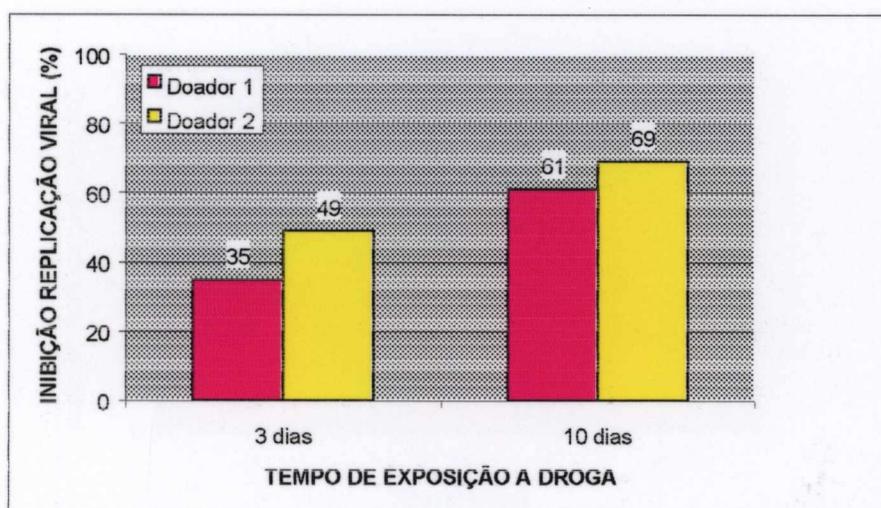


Figura 7- Efeito inibitório sobre a replicação do HIV-1 pela 18M-COR de acordo com a permanência na cultura celular. PBMC de doadores normais foram infectados com o isolado R5 (Ba-L), e mantidos na presença da 18M-COR durante 3 ou 10 dias. A replicação do HIV-1 foi avaliada pela detecção da atividade da transcriptase reversa, nos sobrenadantes, ao final do décimo dia de cultura.

4.6 INIBIÇÃO A REPLICAÇÃO DO HIV-1 EM MACRÓFAGOS PELA 18M-COR

A atividade anti-HIV-1 da 18M-COR foi também avaliada sobre a replicação do HIV-1 em macrófagos primários humanos infectados *in vitro*. Esta análise é importante, tendo em vista que os macrófagos são um dos principais reservatórios para o HIV-1, pois, por serem resistentes aos efeitos citopáticos mediados pelo vírus e refratários aos anti-retrovirais correntes, podem

replicar o HIV-1 continuamente. Nossos dados demonstram que 18M-COR é capaz de inibir a replicação do isolado monocitotrópico Ba-L nas duas concentrações testadas (Fig. 8). O efeito inibitório é claramente observado após o 14^o dia de cultura, quando a replicação viral atinge níveis mais elevados. Neste ponto, encontramos entre 49±11% e 61±18% de inibição, e entre 66±6% e 83±8% após 21 dias, para 12,5µM e 25µM, respectivamente.

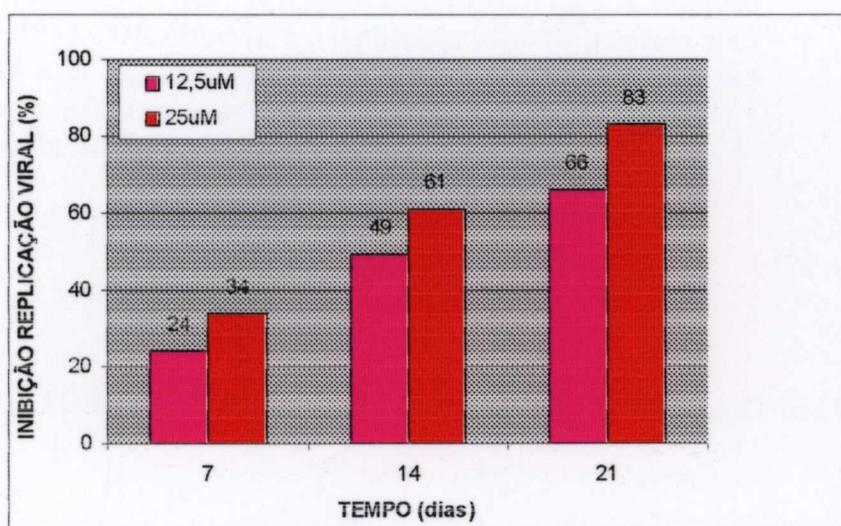


Figura 8- Inibição da replicação do HIV-1 em MDM pela 18M-COR. MDM infectados pelo HIV-1 (isolado R5 Ba-L) foram cultivados com ou sem 18M-COR durante 21 dias, nas concentrações indicadas. A replicação viral foi avaliada 7, 14 e 21 dias após a infecção, pela medida do antígeno p24, nos sobrenadantes de cultura. São mostrados os resultados de três experimentos.

Experimentos adicionais foram realizados utilizando-se apenas a concentração de 50µM. Nestes, a replicação viral foi avaliada após 14 e 21 dias, e os resultados confirmaram os achados anteriores (Tab.5). A concentração de 50µM da 18M-COR apresentou efeito inibitório da replicação viral semelhante ao da concentração de 25µM (Fig.8).

Tabela 5- Inibição da replicação do HIV-1 em macrófagos, pela 18M-COR.

Doador	Dias após infecção	
	14	21
1	61*	87
2	68	54
3	77	92
4	95	89
X±EPM	75±7	80,5±9

Macrófagos foram infectados pelo isolado Ba-L e expostos à 18M-COR (50µM), e a replicação viral foi avaliada após 14 e 21 dias de cultura, pela medida do antígeno p24, nos sobrenadantes de cultura.

*Inibição da replicação viral (%)

4.7 EFEITO INIBITÓRIO DA 18M-COR EM COMPARAÇÃO COM AZT EM PBMC E

MDM

Outros ensaios de inibição da replicação do HIV-1 em PBMC e MDM pela 18M-COR foram executados em paralelo com o AZT, um inibidor análogo de nucleosídeo da transcriptase reversa utilizado na terapia anti-retroviral. Nestes ensaios foram utilizados os isolados primários 95BRRJ0010 (X4) e Ba-L (R5) para os experimentos com PBMC e MDM, respectivamente. Nós encontramos que o efeito inibitório da 18M-COR (50µM) sobre a replicação do isolado X4 em PBMC foi apenas ligeiramente inferior ao exercido pelo AZT (Tab.6). Com relação ao efeito sobre a replicação do isolado R5 em macrófagos, observamos que estas drogas inibiram o crescimento viral com a mesma intensidade (Tab. 7)

Tabela 6- Comparação entre o efeito anti-retroviral da 18M-COR e do AZT, em PBMC infectados pelo HIV-1.

Droga (μ M)	Inibição da replicação viral (%)			X \pm EPM
	Doador 1	Doador 2	Doador 3	
18M-COR 50	60	67	79	69 \pm 10
AZT 0,12	67	88	100	83 \pm 10
AZT 0,25	89	94	100	93 \pm 3
AZT 0,5	96	100	100	99 \pm 1

PBMC foram infectados pelo isolado 95BRRJ0010 (X4) e expostos à 18M-COR e AZT, nas concentrações indicadas. A replicação viral foi avaliada após 7 dias de cultura, pela medida do antígeno p24, nos sobrenadantes de cultura.

Tabela 7- Comparação entre o efeito anti-retroviral da 18M-COR e do AZT, em macrófagos infectados pelo HIV-1.

Dias após infecção	Inibição da replicação viral (%)			
	18MCOR (50 μ M)	AZT (0,12 μ M)	AZT (0,25 μ M)	AZT (0,5 μ M)
14	86 \pm 9	85 \pm 10	85 \pm 10	82 \pm 12
21	90 \pm 1	90 \pm 1	90 \pm 1	90 \pm 1

Macrófagos foram infectados pelo isolado Ba-L e expostos à 18M-COR e AZT, nas concentrações indicadas. A replicação viral foi avaliada após 14 e 21 dias de cultura, pela medida do antígeno p24, nos sobrenadantes de cultura.. Esses dados foram obtidos de dois experimentos.

4.8 18M-COR INIBE A ENZIMA TRANSCRIPTASE REVERSA DO HIV-1

Nossos dados preliminares demonstram que as concentrações de 12.5 μ M, 25 μ M e 50 μ M de 18M-COR inibem 10%, 64% e 73%, respectivamente, da atividade da enzima transcriptase reversa do HIV-1. O AZT inibiu 77% da atividade da mesma enzima, quando foi utilizado 1 μ M deste IANTR (Tab.8).

Tabela 8 –Efeito da 18M-COR sobre a atividade da TR do HIV-1, em comparação com o efeito do AZT.

Inibição da transcriptase reversa (%)			
	18M-COR (μM)		AZT (μM)
	12,5	25	50
			1
	10	64	73
			77

A reação de polimerização foi executada durante 30 minutos (37⁰C) na presença ou ausência da 18M-COR. Os resultados são apresentados como percentual de inibição da atividade da TR, em relação à atividade polimerásica observada na ausência de agentes inibidores da enzima. O AZT foi utilizado como controle positivo para a inibição da TR.

5 DISCUSSÃO

A emergência de isolados de HIV-1 resistentes ao tratamento anti-retroviral atualmente disponível, a dificuldade de adesão dos pacientes ao mesmo, os efeitos colaterais das drogas, assim como o alto custo do tratamento, são alguns empecilhos para o efetivo controle clínico da infecção e erradicação da epidemia de AIDS. Este quadro compele os investigadores a buscar substâncias alternativas para o tratamento antiretroviral, visando descobrir agentes eficazes, com distintas características químicas, capazes de interferir em diferentes pontos do ciclo replicativo do HIV-1.

Vários estudos demonstraram que os alcalóides apresentam efeitos anti-HIV-1, atuando em diferentes estágios do ciclo de replicação viral. Alguns exemplos podem ser citados: cloroquina, que afeta a glicosilação da gp120 e, por isso, diminui a infectividade das novas partículas virais e a formação de sincícios (SAVARINO *et al.*, 2001); 0-metilpsicotrina, que inibe a atividade da transcriptase reversa do HIV-1 (TAN *et al.*, 1991); triptonina B, que inibe a replicação do HIV-1, cujo mecanismo de ação não foi ainda investigado (DUAN *et al.*, 2000). As investigações sobre o mecanismo de ação de alguns alcalóides nos revelam que um único composto dessa natureza química pode atuar em mais de uma via do ciclo de replicação do HIV-1: a miquelamina B inibe a formação de sincícios e a transcriptase reversa (MCMAHON *et al.*, 1995); a castanospermina inibe a formação de sincícios e a infecção de células T CD4⁺, ao diminuir a taxa de clivagem da gp160 e, portanto, diminuindo a expressão da gp120 (WALKER *et al.*, 1987). Efeitos semelhantes foram relatados para agentes de outra natureza química, como do ácido micofenólico, que apresenta efeito anti-HIV-1 por mais de uma via (inibindo a síntese da guanosina de nucleotídeo, um substrato da transcriptase reversa, e depletando os linfócitos T CD4⁺ ativados), isoladamente ou em sinergismo com outros anti-retrovirais (MARGOLIS *et al.*, 1999; CHAPUIS *et al.*, 2000).

Neste estudo, nós relatamos que os alcalóides indólicos COR e 18M-COR apresentam potente atividade inibitória sobre a replicação do HIV-1. Estas drogas inibiram fortemente a replicação de isolados primários do HIV-1, em testes de infecção de PBMC e macrófagos humanos primários. Em nossos primeiros ensaios, vimos que a COR inibiu os isolados Ba-L e 95BRBA007, de modo dose-dependente (Fig.3). Como Glick e colegas (2000) descreveram que a COR, embora capaz de controlar a dependência a drogas, também produzia efeitos

indesejáveis, como a redução da ingestão de água em animais de experimentação, decidimos investigar se o seu derivado sintético 18M-COR também seria capaz de inibir a infecção pelo HIV-1. Já foi demonstrado que o alcalóide sintético 18M-COR não apresenta aquele efeito colateral da COR e, além disso, este alcalóide congênera da ibogaína não produz alterações motoras, cerebelares e nos ritmo e frequência cardíacos (GLICK *et al.*, 2000). Neste estudo, a 18M-COR apresentou ampla atividade contra isolados trópicos para CCR5 (Ba-L), para R5X4 (95BRBA007) e para CXCR4 (95BRRJ010) (Fig. 4, 5 e 6, respectivamente). A atividade inibitória da 18M-COR foi obtida com concentrações que não alteram a viabilidade das células (azul de Trypan) ou afetam apenas marginalmente a função mitocondrial celular (XTT) (Tab.4). A inibição da replicação do HIV-1 pela 18M-COR foi evidente, apesar das pequenas variações na intensidade de inibição viral nos diferentes ensaios, ou para cada isolado testado. Além disso, o efeito anti-HIV-1 foi exercido contra isolados primários, independentemente do seu uso preferencial de receptores de quimiocinas. No entanto, a atividade inibitória ótima da 18M-COR parece depender de sua permanência nas culturas celulares (Fig.7), pois a redução do tempo de exposição das células infectadas pelo HIV-1 a esta droga resulta em um efeito menos pronunciado sobre a replicação do isolado testado. A magnitude do efeito anti-HIV-1 da 18M-COR foi semelhante ou pouco inferior ao efeito do AZT, em ensaios comparativos, quando utilizamos PBMC e MDM, respectivamente (Tab.6 e 7).

Um dos grandes obstáculos para alcançar a completa erradicação viral em pacientes com o esquema terapêutico atual, são os reservatórios celulares do HIV-1 (células T CD4⁺ em repouso e macrófagos infectados), que funcionam como nichos de replicação viral e perene manutenção da carga viral. Por exemplo, Chun e colegas (1997) e Finzi e colaboradores (1999) demonstraram que, após um prolongado período de tratamento com antiretrovirais, foram detectadas células T CD4⁺ infectadas em pacientes com carga viral plasmática abaixo do nível de detecção. É possível que compostos naturais possam inibir a replicação do HIV-1 nestes reservatórios, como o resveratrol, que inibiu a infecção do HIV-1 em linfócitos T CD4⁺ em repouso, quando associado aos inibidores análogos de nucleotídeos da transcriptase reversa (HEREDIA *et al.*, 2000). Em nossos estudos, vimos que a 18M-COR foi capaz de inibir fortemente a replicação do HIV-1 em macrófagos primários (Fig. 8 e Tab. 5), sugerindo que este reservatório poderá ser suscetível a esta droga nos tecidos linfóides de pacientes infectados.

Muitos agentes de origem natural apresentam potencial efeito inibitório da replicação do HIV-1 *in vitro*. A diferença entre o presente estudo e outros (WALKER *et al.*, 1987; TAN *et al.*, 1991; MCMAHON *et al.*, 1995; DUAN *et al.*, 2000; SAVARINO *et al.*, 2001), igualmente reveladores do importante efeito farmacológico anti-HIV-1 de agentes de origem natural, é que nós utilizamos isolados primários, o que acreditamos representar mais apropriadamente a população viral em indivíduos infectados. Um outro ponto que deve ser ressaltado é que neste estudo foram utilizadas células humanas primárias, diminuindo-se, assim, a possibilidade de mudanças genotípicas e fenotípicas passíveis de ocorrer durante passagens virais em células de linhagem (ORLOFF *et al.*, 1995).

É possível que diferentes mecanismos estejam envolvidos na atividade anti-HIV-1 da 18M-COR. Já foi descrito que alguns alcalóides, como a morfina (FECHO *et al.*, 1996), a ibogaina, a coronaridina (DEECHER *et al.*, 1992; GLICK *et al.*, 2000) e a própria 18M-COR (GLICK *et al.*, 2000) tem afinidades pelos receptores κ opióides. Tais receptores estão presentes nas membranas de macrófagos (CHAO *et al.*, 2001) e linfócitos T CD4⁺ (PETERSON *et al.*, 2001). Já foi descrito por alguns grupos de pesquisadores que a substância U50,488 se liga ao receptor κ , inibindo a replicação do HIV-1, em culturas de macrófagos e linfócitos T CD4⁺. Assim, é possível que a 18M-COR também iniba a replicação do HIV-1 ao se ligar aos receptores de opióides do tipo κ .

Outro possível mecanismo diz respeito a inibição da proliferação celular. Alguns agentes de origem natural apresentam propriedades imunossupressoras, indutoras de apoptose e inibidoras da linfoproliferação. Quanto aos alcalóides, a morfina (LYSLE *et al.*, 1993) e a sinomenina (VIEREGGE *et al.*, 1999) reduzem a produção de IL-2 e a resposta proliferativa de PBMC; a criproleptina e a neocriptoleptina induzem apoptose em células tumorais (DASSONNEVILLE *et al.*, 2000); e o harmalol reduz a proliferação de células leucêmicas (AYOUB *et al.*, 1994). Como a 18M-COR tem características farmacológicas semelhantes aos alcalóides mencionados, é possível que este composto apresente as mesmas propriedades. Estudos preliminares em nosso laboratório sugerem que a 18M-COR diminui a blastogênese de PBMC pré-ativados pela PHA e mantidos em IL-2 (dados não mostrados). Substâncias que reduzem a blastogênese de linfócitos T também podem inibir o HIV-1, como, por exemplo, o ácido micofenólico, que exerce potente efeito anti-HIV-1 através da inibição da proliferação de PBMC pré-ativados com PHA (MARGOLIS *et al.*, 1999), e também por indução de apoptose

de células T CD4⁺ ativadas (CHAPUIS *et al.*, 2000). Futuramente, pretendemos verificar a possibilidade de que uma das formas de inibição da replicação viral pela 18M-COR seja através da redução da resposta proliferativa da população de linfócitos T CD4⁺, células alvo do HIV-1. É possível que este efeito interfira na resposta imunológica específica, tanto para o HIV-1, como para outros patógenos. No entanto, alguns autores (DE BOER *et al.*, 1998, MARGOLIS *et al.*, 1999; CHAPUIS *et al.*, 2000) acreditam que a inibição da proliferação celular é benéfica para o paciente e desvantajosa para o vírus, porque diminui o número de células disponíveis para novos ciclos de infecção, e reduz a produção de novas partículas virais pelas células T CD4⁺ já infectadas.

Diferentes aspectos relativos à atividade anti-HIV-1 pela 18M-COR merecem futuras investigações. Mesmo em concentrações intermediárias, a 18M-COR inibiu a replicação do HIV-1 (Fig. 4, 5, 6 e 8) e, por isso, pretendemos testar *in vitro* o efeito inibitório sinérgico desta droga, naquelas concentrações, em associação com outros agentes que apresentam efeito semelhante, ou associá-la aos anti-retrovirais em uso. Ainda, em nosso estudo, vimos que 18M-COR inibiu isolados primários do sub-tipo B, e pretendemos, mais tarde, investigar se isolados de outros sub-tipos são também susceptíveis ao efeito anti-retroviral da 18M-COR.

Um dos principais motivos para a falha da terapia anti-HIV-1 é a emergência de isolados virais resistentes aos inibidores da transcriptase reversa e inibidores de protease. No entanto, dois grupos distintos de pesquisadores (MARGOLIS *et al.*, 1999; HEREDIA *et al.*, 2000) demonstraram que agentes de origem natural associados aos inibidores análogos de nucleotídeos da transcriptase reversa (ácido micofenólico associado ao abacavir, e resveratrol associado ao ddi) foram capazes de inibir a replicação de isolados de HIV-1 resistentes a estes anti-retrovirais. Assim, acreditamos que é interessante avaliar se a 18M-COR é capaz de exercer o mesmo efeito. E, por fim, analisaremos o mecanismo de ação pelo qual a 18M-COR inibe a replicação do HIV-1. Dados preliminares sugerem que uma das formas de inibição do ciclo replicativo do HIV-1, pela 18M-COR, é através da inibição da enzima viral transcriptase reversa (Tab.8)

Em resumo, os nossos achados mostram que o alcalóide indólico sintético 18M-COR é capaz de inibir, *in vitro*, a replicação de isolados primários de HIV-1, com diferentes tropismos para os receptores de quimiocinas, provavelmente através da inibição da transcriptase reversa viral. Esta substância foi eficiente em inibir a replicação do HIV-1 tanto em PBMC como em

macrófagos primários, que são um dos principais reservatórios virais. Tendo em vista que a COR (DELORENZI *et al.*, 2001) e a 18M-COR (DELORENZI *et al.*, 2002) apresentam potente atividade leishmanicida *in vitro*, as suas potenciais propriedades terapêuticas poderão ser úteis no tratamento de duas infecções que acometem a população brasileira e de outros países, isoladamente ou em episódios de co-infecção. Além disso, a ibogaina, da qual a 18M-COR foi originada, já foi utilizada em humanos, para o tratamento de dependência a derivados de opióides (ALPER *et al.*, 2000), o que antecipa a possibilidade de utilização da 18M-COR em pacientes portadores do HIV-1.

6 CONCLUSÕES

- 1- Neste estudo, nós verificamos que o alcalóide indólico sintético 18M-COR apresentou atividade inibitória sobre a replicação do HIV-1, *in vitro* em concentrações que não alteram a viabilidade celular;
- 2- A 18M-COR inibiu o crescimento do HIV-1 em células primárias, tanto em PBMC como em macrófagos;
- 3- O efeito inibitório da 18M-COR foi observado sobre isolados primários de HIV-1, independentemente do uso preferencial de correceptores (CCR5 ou CXCR4, ou ambos) destes isolados;
- 4- A permanência da 18M-COR na cultura favoreceu o seu efeito inibitório ótimo sobre a replicação do HIV-1;
- 5- Ensaios preliminares sugerem que uma das vias de atuação da 18M-COR para neutralizar a replicação do HIV-1 é a inibição da atividade da enzima viral transcriptase reversa.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos no nosso estudo nos revelaram o grande potencial anti-HIV-1 do alcalóide indólico sintético 18M-COR. Sendo assim, pretendemos investigar, no futuro, outros aspectos relativos à sua atividade anti-retroviral, tais como:

- a) efeito inibitório sinérgico, associado a outros agentes que apresentam efeitos semelhantes, ou aos constituintes do HAART;
- b) a susceptibilidade de isolados virais de diferentes sub-tipos, ao efeito anti-retroviral da 18M-COR;
- c) efeito inibitório sobre a replicação de isolados de HIV-1 resistentes aos componentes da multiterapia;
- d) os mecanismos de ação pelos quais a 18M-COR inibe a replicação do HIV-1.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. Congenital and acquired immunodeficiencies. In: _____. **Cellular and molecular immunology**. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997. Cap 21, p.439-461.

ALKHATIB, G.; COMBADIÈRE, C.; BRODER, C.C.; FENG, Y.; KENNEDY, P.; MURPHY, P.M.; BERGER, E.A. CC CKR5: a RANTES, MIP-1, MIP-1 receptor as a fusion co-factor for macrophage-tropic HIV-1. **Science**, **272**:1955-1958, 1996.

ALMEIDA, M.Z. **Plantas Medicinai s e Ritualísticas**. Salvador: EDUFBA, 2000. 192p.

ALPER, K.R.; LOTSOFF, H.S.; FRENKEN, G.M.N.; LUCIANO, D.J.; BASTIAANS, J. Ibogaine in acute opioid withdrawal: an open label case series. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **909**:257-259, 2000.

ASJO, B.; MORFELDT-MANSON, L.; ALBERT, J.; BIBERFELD, G.; KARLSSON, A.; LIDMAN, K.; FENYO, E.M. Replicative capacity of human immunodeficiency virus from patients with varying severity of HIV infection. **Lancet**, **2**:660-662, 1986.

AYOUB, M.T.; AL-ALLAF, T.A.K.; RASHAN, L.J. Antiproliferative of Harmalol. **Fitoterapia**, **65**:14-18, 1994.

BANDARAGE, U.K.; KUEHNE, M.E.; GLICK, S.D. Total synthesis of racemic albifloranine and its anti-addictive congeners, including 18-methoxycoronaridine. **Tetrahedron**, **55**:9405-9424, 1999.

BANNERT, N.; SCHENTEN, D.; CRAIG, S.; SODROSKI, J. The level of CD4 expression limits infection of primary rhesus monkey macrophages by a T-tropic simian immunodeficiency virus. **J. Virol.**, **74**:10984-10993, 2000.

BERGER, E.A.; DOMS, R.W.; FENYÖ, E.M.; KORBER, B.T.M.; LITTMAN, D.R.; MOORE, J.P.; SANTTENTAU, Q.J.; SCHUITEMAKER, H.; SODROSKI, J.; WEISS, R.A. A new classification for HIV-1. **Nature**, **391**:240, 1998.

BERGER, E.A.; MURPHY, P.M.; FARBER, J.M. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: Roles in viral entry, tropism and disease. **Annu. Ver. Immunol.**, **17**:657-700, 1999.

BLOND, D.; RAOUL, H.; LE GRAND, R.; DORMONT, D. Nitric oxide synthesis enhances human immunodeficiency virus replication in primary human macrophages. **J. Virol.**, **74**:8904-8912, 2000.

BORMANN, W.E.; KUEHNE, M.E. A common intermediate providing synthesis of Ψ -tabersonine, coronaridine, iboxyphylline, vinamidine and vinblastine. **J. Org. Chem.**, **57**:1752, 1992.

BORROW, P.; LEWICKI, H.; WEI, X.; HORWITZ, M.S.; PEFFER, N.; MEYERS, H.; NELSON, J.Á.; GAIRIN, J.E.; HAHN, B.H.; OLDSTONE, M.B.; SHAW, G.M. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. **Nat. Med.**, **3**:205-211, 1997.

BOU-HABIB, D.C.; RODERIQUEZ, R.; ORAVECZ, T.; BERMAN, P.W.; LUSSO, P.; NORCROSS, M.A. Cryptic nature of envelope V3 region epitopes protects primary monocytotropic human immunodeficiency virus type 1 from antibody neutralization. **J. Virol.**, **68**:6006-6013, 1994.

BRAZILIAN NETWORK FOR HIV ISOLATION AND CHARACTERIZATION. HIV-1 diversity in Brazil: genetic, biologic, and immunologic characterization of HIV-1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, **23**:184-193, 2000.

BRITES, C.; BAHIA, F.; GILBERT, M.; PEDROSO, C.; BADARÓ, R. Evaluation of viral resistance to reverse transcriptase inhibitors (RTI) in HIV-1 infected patients before and after 6 months of single and double antiviral therapy. **Braz. J. Infect. Dis.**, **5**:177-182, 2001.

BURTON, D.R. A vaccine for HIV type 1: the antibody perspective. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **94**:10018-10023, 1997.

CAMPBELL, W.E.; NAIR, J.J.; GAMMON, D.W.; BASTIDA, J.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.; SMITH, P.J.; ALBRECHT, C.F. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from *Brunsvigia littoralis*. **Planta Med.**, **64**:91-93, 1998.

CARIBÉ, J.; CAMPOS, J.M. **Plantas medicinais que ajudam o homem: guia prático para a época atual.** São Paulo: Pensamento, 1999.

CARR, J.K.; SALMINEN, M.O.; ALBERT, J.; SANDERS-BUELL, E.; GOTTE, D.; BIRX, D.L.; MCCUTCHAN, F.E. Full genome sequences of human immunodeficiency virus type I subtypes G and intersubtypes recombinants. **Virology**, **247**:22-31, 1998.

CECILIA, D.; KEWAL, R.; AMANI, V.N.; O'LEARY, J.; VOLSKY, B.; NYAMBI, P.; BURDA, S.; XU, S.; LITTMAN, D.R.; ZOLLA-PAZNER, S. Neutralization profiles of primary human immunodeficiency virus type isolates in the context of coreceptor usage. **J. Virol.**, **72**:6988-6996, 1998.

CHAO, C.C.; GEKKER, G.; HU, S.E.; SHENG, W.S.; SHARK, K.B.; BU, D.F.; ACHER, S.; BIDLACK, J.M.; PETERSON, P.K. K-opioid receptors in human microglia downregulate human immunodeficiency virus 1 expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **93**:8051-8056, 1996.

CHAO, C.C.; GEKKER, G.; SHENG, W.S.; HU, S.; PETERSON, P.K. U50488 inhibits HIV-1 expression in acutely infected monocyte-derived macrophages. **Drug Alcohol Depend.**, **62**:149-154, 2001.

CHAPUIS, A.G.; RIZZARDI, G. P.; DÁGOSTINO, C.; ATTINGER, A.; KNABENHANS, C.; FLEURY, S.; ACHA-ORBEA, H.; PANTALEO, G. Effects of mycophenolic acid on human immunodeficiency virus infection *in vitro* and *in vivo*. **Nat. Med.**, **6**:762-768, 2000.

CHEN, Y.; RINALDO, C.; GUPTA, P. A semiquantitative assay for CD8⁺ T-cell-mediated suppression of human immunodeficiency virus type 1 infection. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, **4**:4-10, 1997.

CHEN, Z.; TELFER, P.; GETTIL, A.; REED, P.; ZHANG, L.; HO, D.D.; MARX, P.A. Genetic characterization of new west african simian immunodeficiency virus SIVsm: geographic clustering of household-derived SIV strains with human immunodeficiency virus type 2 subtypes and genetically diverse viruses from a single feral sooty mangabey troop. **J. Virol.**, **70**:3617-3627, 1996.

CHEN, Z.; LUCKAY, A.; SODORA, D.L.; TELFER, P.; REED, P.; GETTIE, A.; KANU, J.M.; SADEK, R.F.; YEE, J.; HO, D.D.; ZHANG, L.; MARX, P.A. Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) seroprevalence and characterization of distinct HIV-2 genetic subtype from the natural range of simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. **J. Virol.**, **71**:3953-3960, 1997.

CHESEBRO, B.; WEHRLY, K.; NISHIO, J.; PERRYMAN, S. Macrophage-tropic human immunodeficiency virus isolates from different patients exhibit unusual V3 envelope sequence homogeneity in comparison with T-cell-tropic isolates: definition of critical amino acids involved in cell tropism. **J. Virol.**, **66**:6547-6554, 1992.

CHO, M.W.; LEE, M.K.; CAENEY, M.C.; BERSON, J.F.; DOMS, R.W.; MARTIN, M.A. Identification of determinants on a dualtropic human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein that confer usage of CXCR4. **J. Virol.**, **72**: 2509-2515, 1998.

CHUN, T.W.; STUYVER, L.; MIZELL, S.B.; EHLER, L.A.; MICAN, J.A.M.; BASELER, M.; LLOYD, A.L.; NOWAK, M.A.; FAUCI, A.S. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **94**:13193-13197, 1997.

COCCHI, F.; DEVICO, A.L.; GARZINO-DEMO, A.; ARYA, S.K.; GALLO, R.C.; LUSSO, P. Identification of RANTES, MIP-1a, and MIP-1b as the major HIV-suppressive factors produced by CD8⁺ T cells. **Science**, **270**:1811-1815, 1995.

COHEN, J. Jitters jeopardize AIDS vaccine trials. **Science**, **262**: 980-981, 1993.

COHEN, O.; WEISSMAN, D.; FAUCI, A.S. The immunopathogenesis of HIV infection. In: PAUL, W.E. **Fundamental Immunology**. 4.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1999. p.1455-1494.

COHEN, J. Confronting the limits of success. **Science**, **296**:2320-2324, 2002.

- CONNOR, R.I.; HO, D.D. Human immunodeficiency virus type 1 variants with increased replicative capacity develop during the asymptomatic stage before disease progression. **J. Virol.**, **68**:4400-4408, 1994.
- CONNOR, R.I.; SHERIDAN, K.E.; CERADINE, D.; CHOE, S.; LANDAU, N.R. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals. **J. Exp. Med.**, **185**:621-628, 1997.
- COVAS, D.T.; BISCARO, T.A.; KASHIMA, S.; DUARTE, G.; MACHADO, A.A. High frequency of the GWG (Pro Trp) envelop variant of HIV-1 in southeast Brazil. **J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, **19**:74-79, 1998.
- DA MATTA, A .D.; SANTOS, C.V.E.; PEREIRA H.S.; FRUGULHETTI, I.C.P.P.; OLIVEIRA, M.R.P.; SOUZA M.C.B.V.; MOUSSATCHÉ N.; FERREIRA V.F. Synthesis of novel nucleosides of 4-oxoquinoline-3-carboxylic acid analogues. **Heteroatom Chemistry**, **10**:197-202, 1999.
- DASSONEVILLE, L.; LANSIAUX, A.; WATTELET, A.; WATTES, N.; MAHIEU, C.; MIERT, S.V.; PIETERS, L.; BAILLY, C. Cytotoxicity and cell cycle effects of the plant alkaloids cryptoline and neocryptoline: relation to drug-induced apoptosis. **Eur. J. Pharmacol.**, **409**:9-18, 2000.
- DE BOER, R.J.; BOUCHER, C.A.B.; PERELSON, A.S. Target cell availability and the successful suppression of HIV by hydroxyurea and didanosine. **AIDS**, **12**:1567-1570, 1998.
- DEECHER, D.C.; TEITLER, M.; SODERLUND, D.M.; BORNMANN, W.G.; KUEHNE, M.E.; GLICK, S.D. Mechanisms of a action of ibogaine and harmaline congeners based on radioligand binding studies. **Brain Res.**, **571**:242-247, 1992.
- DELORENZI, J.C.; ATTAS, M.; GATTASS, C.R.; ANDRADE, M.; REZENDE, C.; PINTO, A.C.; HENRIQUES, A.T.; BOU-HABIB, D.C.; SARAIVA, E.M.B. Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **45**:1349-1354, 2001.
- DELORENZI, J.C.; FREIRE-DE-LIMA, L.; GATTASS, C.R.; DE ANDRADE COSTA, D.; HE, L.; KUEHNE, M.E.; SARAIVA, E.M.B. In vitro activities of iboga alkaloid congeners coronaridine and 18-methoxycoronaridine against *Leishmania amazonensis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **46**:2111-2115, 2002.
- DENG, H.; LIU, R.; ELLMEIER, W.; CHOE, S.; UNUTUMAZ, D.; BURKHART, M.; MARZIO, P.; MARMON, S.; SUTTON, R.E.; HILL, C.M.; DAVIS, C.B.; PEIPER, S.C.; SCHALL, T.J.; LITTMAN, D.R.; LANDAU, N.R. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. **Nature**, **381**:661-666, 1996.
- DI STASI, L.C.; SANTOS, E.M.G.; SANTOS, C.M.; HIRUMA, C.A. As plantas medicinais. In: _____ **Plantas medicinais na Amazônia**. São Paulo: UNESP, 1989. p.25-148.

DOMÍNGUEZ, X.A. **Métodos de Investigación Fitoquímico**. Mexico/Buenos Aires: Limuse e Centro Regional para Desarrollo Internacional (AID), 1973.

DRAGIC, T.; LITWIN, V.; ALLAWAY, G.P.; MARTIN, S.R.; HUANG, Y.; NAGASHIMA, K.A.; CAYANAN, C.; MADDON, P.J.; KOUP, R.A.; MOORE, J.P.; PAXTON, W.A. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. **Nature**, **381**:667-673, 1996.

DUAN, H.; TAKAISHI, Y.; IMAKURA, Y.; JIA, Y.; LI, D.; COSENTINO, L.M.; LEE, K.H. Sesquiterpene alkaloids from *Tripterygium hypoglaucum* and *Tripterygium wilfordii*: A new class of potent anti-HIV agents. **J. Nat. Prod.**, **63**:357-361, 2000.

FAUCI, A.S. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. **Science**, **262**:1011-1018, 1993.

FAUCI, A.; PANTALEO, G.; STANLEY SWEISMAN, D. Immunopathogenic mechanism of HIV infection. **Ann. Intern. Med.**, **124**:654-663, 1996.

FAUCI, A.S. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. **Nature**, **384**:529-534, 1996.

FECHO, K.; MASLONEK, K.A.; DYKSTRA, L.A.; LYSLE, D.T. Assessment of the involvement of central nervous system and peripheral opioid receptors in the immunomodulatory effects of acute morphine treatment in rats. **J. Pharm. Exp. Ther.**, **2**:626-636, 1996.

FENG, Y.; BRODER, C. C.; KENNEDY, P.E.; BERGER, E.A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. **Science**, **272**:872-877, 1996.

FENYÖ, E.M.; MORFELDT-MANSON, L.; CHIODI, F.; LIND, B.; GEGERFELT, A.V.; ALBERT, J.; OLLAUSON, E.; ASJÖ, B. Distinct replicative and cytopathic characteristic of human immunodeficiency virus isolates. **J. Virol.**, **62**:4414-4419, 1988.

FERRARO, G.A.; MELLO, M.A.G.; WEYENBERG, J.V.; SHINDO, N.; GALVÃO-CASTRO, B.; BOU-HABIB, D.C. Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization, Biological characterization and chemokine receptor usage of HIV type 1 isolates prevalent in Brazil. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, **17**:1253, 2001.

FINZI, D.; BLANKSON, J.; SILICIANO, J.D.; MARGOLICK, J.B.; CHADWICK, K.; PIERSON, T.; KENDALL, S.; LISZIEWICZ, J.; LORI, F.; FLEXNER, C.; QUINN, T.C.; CHAISSON, R.E.; ROSEMBERG, E.; WALKER, B.; GANGE, S.; GALLANT, J.; SILICIANO, R.F. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. **Nat. Med.**, **5**:512-517, 1999.

FINZI, D.; SILICIANO, R.F. Taking aim at HIV replication. **Nat. Med.**, **6**:735-736, 2000.

FLAMAND, L.; CROWLEY, R.W.; LUSSO, P.; COLOMBINI-HATACH, S.; MARGOLIS, D.M.; GALLO, R.C. Activation of CD8⁺ T lymphocytes through the T cell receptor turns on CD4 gene expression: implications for HIV pathogenesis. **Proc. Natl. Acad. USA.**, **95**:3111-3116, 1998.

FLEXNER, C. HIV-protease inhibitors. **Drug Therapy**, **338**:1281-1292, 1998.

GAO, F.; YUE, L.; ROBERTSON, D.L.; HILL, S.C.; HUI, H.; BIGGAR, R.J.; NEEQUAYE, A.E.; WHELAN, T.M.; HO, D.D.; SHAW, G.M.; SHARP, P.M.; HAHN, B.H. Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. **J. Virol.**, **68**:7433-7447, 1994.

GAO, F.; ROBERTSON, D.L.; MORRISON, S.G.; HUI, H.; CRAIG, S.; DECKER, J.; FULTZ, P.N.; GIRARD, M.; SHAW, G.M.; HAHN, B.H.; SHARP, P.M. The heterosexual human immunodeficiency virus type 1 epidemic in Thailand is caused by a new intersubtype (A/E) recombinant of African origin. **J. Virol.**, **70**:7013-7029, 1996.

GEMTCHUJINICOU, I.D. Sub-classe asteridae. In: _____. **Manual de taxonomia vegetal: plantas de interesse econômico, agrícolas, ornamentais e medicinais**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1976. p.240-279.

GLICK, S.D.; KUEHNE, M.E.; RAUCCI, J.; WILSON, T.E.; LARSON, D.; KELLER, J.R.; CARLSON, J.N. Effects of iboga alkaloids on morphine and cocaine self-administration in rats: relationship to tremorigenic effects on dopamine release in nucleus accumbens and striatum. **Brain Res.**, **657**:14-22, 1994.

GLICK, S.D.; KUEHNE, M.E.; MAISONNEUVE, I.M.; BANDARAGE, U.K.; MOLINARI, H.H. 18-Methoxycoronaridine, a non-toxic iboga alkaloid congener: effects on morphine and cocaine self-administration and on mesolimbic dopamine release in rats. **Brain Res.**, **719**:29-35, 1996.

GLICK, S.D.; MAISONNEUVE, M.I. Development of novel medications for drug addiction: the legacy of an African shrub. **Ann N. Y. Acad. Sci.**, **909**:88-103, 2000a.

GLICK, S.D.; MAISONNEUVE, I.M.; SZUMLINSKI, K.K. 18-methoxy-coronaridine (18-MC) and ibogaine: comparison of antiaddictive efficacy, toxicity and mechanisms of action. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **914**:369-386, 2000b.

GLUSHAKOVA, S.; YI, Y.; GRIVEL, J.C.; SINGH, A.; SCHOLS, D.; DE CLERCQ, E.; COLLMAN, R.G.; MARGOLIS, L. Preferential coreceptor utilization and cytopathicity by dual-tropic HIV-1 in human lymphoid tissue *ex vivo*. **J. Clin. Invest.**, **104**:R7-R11, 1999.

GOULDER, J.R.; PHILLIPS, R.E.; COLBERT, R.A.; MCADAM, S.; OGG, G.; NOWAK, M.A.; GIANGRANDE, P.; LUZZI, G.; MORGAN, B.; EDWARDS, A.; MCMICHAEL, A.J.; ROWLAND-JONES, S. Late escape from a dominant immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associates with progression to AIDS. **Nat. Med.**, **3**:212-217, 1997.

GÜNTHARD, H.F.; WONG, J.K.; IGNACIO, C.C.; GUATELLI, J.C.; RIGGS, N.L.; HAVLIR, D.V.; RICHMAN, D.D. Human immunodeficiency virus replication and genotypic resistance in blood and lymph nodes after a year of potent antiviral therapy. **J. Virol.**, **72**:2422-2428, 1998.

HATTORI, T.; IKEMATSU, S.; KOITO, A.; MATSUSHITA, S.; MOEDA, Y.; HADA, M.; FUJIMAKI, M.; TAKATSUKI, K. Preliminary evidence for inhibitory effect of glycyrrhizin on HIV replication in patients with AIDS. **Antiviral Res.**, **11**:255-262, 1989.

HAY, C.M.; RUHL, D.; BASGOZ, N.O.; WILSON, C.C.; BILLINGSLEY, J.M.; DEPASQUALE, M.P.; D'AQUILA, R.T.; WOLINSKY, S.M.; CRAWFORD, J.M.; MONTEFIORI, D.C.; WALKER, B.D. Lack of viral escape and defective in vivo activation of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes in rapidly progressive infection. **J. Virol.**, **73**:5509-5519, 1999.

HENRIQUES, A.T.; MELO, A.A.; MORENO, P.R.; ENE, L.L.; HENRIQUES, J.A.; SCHAPOVAL, E.E. Ervatina coronaria: chemical constituents and some pharmacological activities. **J. Ethnopharmacol.**, **50**:19-25, 1996.

HEILMAN, C.A.; BALTIMORE, D. HIV vaccines – where are we going? **Nat. Med. Vaccine Suppl.**, **4**:532-534, 1998.

HEREDIA, A.; DAVIS, C.; REDFIELD, R. Synergistic inhibition of HIV-1 in activated and resting peripheral blood mononuclear cells, monocyte-derived macrophages, and selected drug-resistant isolates with nucleoside analogues combined with a natural product, resveratrol. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, **25**:246-255, 2000.

HIRSCH, M.S.; CONWAY, B.; D'AQUILA, R.T.; JOHNSON, V.A.; BRUN-VEZINET, F.; CLOTET, B.; DEMETER, L.M.; MAMMER, S.M.; JACOBSEN, D.M.; KURITZKES, D.R.; LOVEDAY, C.; MELLORS, J.W.; VELLA, S.; RICHMAN, D.D. Antiretroviral drug resistance testing in adults with HIV infection: implications for clinical management. International AIDS society—USA panel. **JAMA.**, **279**:1984-1991, 1998.

HOUGHTON, P.J.; WOLDEMARIAM, T.Z.; KHAN, A.I.; BURKE, A.; MAHMOOD, N. Antiviral activity of natural and semi-synthetic chromone alkaloids. **Antiviral Res.**, **25**:235-244, 1994.

IKAN, R. **Natural products: a laboratory guide**. 2.ed. USA: Academic Press, Inc. 1991.

IVERSEN, A.K.N.; SHAFER, R.W.; WEHRLY, K.; WINTERS, M.A.; MULLINS, J.I.; CHESEBRO, B.; MERIGAM, T.C. Multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 strains resulting from combination antiretroviral therapy. **J. Virol.**, **70**:1086-1090, 1996.

JANSSENS, W.; HEYNDRICKX, L.; VAND DER AUWERA, G.; NKENGASONG, J.; BEIRNAERT, E.; VEREEKEN, K.; COPPENS, I.; WILLEMS, B.; FRANSEN, K.

PEETERS, M.; NDUMBE, P.; DELAPORTE, E.; VAN DER GROEN, G. Interpatient genetic variability of HIV-1 group O. **AIDS**, **13**:41-48, 1999.

JANSSENS, W.; NKENGASONG, J.; HEYNDRICKX, L.; VAND DER AUWERA, G.; VEREEKEN, K.; COPPENS, I.; WILLEMS, B.; BEIRNAERT, E.; FRANSEN, K.; PEETERS, M.; VAN DER GROEN, G. Inpatient variability of HIV type 1 group O ANT70 during a 10-year follow-up. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, **15**:1325-1332, 1999.

JIN, X.; BAUER, D.E.; TUTTLETON, S.E.; LEWIN, S.; GETTIE, A.; BLANCHARD, J.; IRWIN, C.E.; SAFRIT, J.T.; MITTLE, J.; WEINBERG, L.; KOSTRIKIS, L.G.; ZHANG, L.; PERELSON, A.S.; HO, D.D. Dramatic rise in plasma viremia after CD8⁺ T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. **J. Exp. Med.**, **189**:991-998, 1999.

KAHN, J.O.; GORELICK, K.J.; GATTI, G.; ARRI, C.J.; LIFTSON, J.D.; GAMBERTOGLIO, J.G.; BOSTROM, A.; WILLIAMS, R. Safety, activity, and pharmacokinetics of GLQ223 in patients with AIDS and AIDS-related complex. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, **38**:260-267, 1994.

KOHLSTAEDT, L.A.; WANG, J.; FRIEDMAN, J.M.; RICE, P.A.; STEITZ, T.A. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with a inhibitor. **Science**, **256**:1783-1790, 1992.

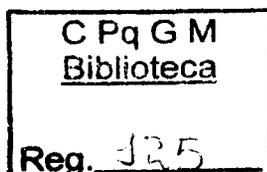
KOUP, R.A.; FRIT, J.T.; CAO, Y.; ANDREWS, C.A.; MCLEOD, G.; BORKOWSKY, W.; FARTHING, C.; HO, D.D. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. **J. Virol.**, **68**:4650-4655, 1994.

KOZAL M.J.; SHAFER, R.W.; WINTERS, M.A.; KATZENSTEIN, D.A.; MERIGAN, T.C. A mutation in human immunodeficiency virus reverse transcriptase and decline in CD4 lymphocyte numbers in long-term zidovudine recipients. **J. Infect. Dis.**, **167**:526-532, 1993.

LACASSE, R.A.; FOLLIS, K.E.; MOUDGIL, T.; TRAHEY, M.; BINLEY, J.M.; PLANELLES, V.; ZOLLA-PAZNER, S.; NUNBERG, J.H. Coreceptor utilization by human immunodeficiency virus type 1 is not a primary determinant of neutralization sensitivity. **J. Virol.**, **72**:2491-2495, 1998.

LACEY, S.F.; MCDANAL, C.B.; HORUK, R.; GREENBERG, M.L. The CXC chemokine stromal cell-derived factor 1 is not responsible for CD8⁺ T cell suppression of syncytia-inducing strain of HIV-1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **94**:9842-9847, 1997.

LAMBOTTE, O.; TAOUFIK, Y.; GOËR, M.G.; WALLON, C.; GAUJARD, C.; DELFRAISSY, J.F. Detection of infectious HIV in circulating monocytes from patients on prolonged highly active antiretroviral therapy. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, **23**:114-119, 2000.



LAMCHOURI, F.; SETTAF, A.; CHERRAH, Y.; HASSON, M.; ZEMZAMI, M.; ATIF, N.; NADORI, E.B.; ZAID, A.; LYOUSSE, B. In vitro cell-toxicity of peganum harmala alkaloids on cancerous cell-lines. **Fitoterapia**, **72**:50-54, 2000.

LARDER, B.A.; KEMP, S.D. Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase after high-level resistance to zidovudine (AZT). **Science**, **246**:1155-1158, 1989.

LATHEY, J.L.; SPECTOR, D.H.; SPECTOR, S.A. Human cytomegalovirus-mediated enhancement of human immunodeficiency virus type-1 production in monocyte-derived macrophages. **Virology**, **199**:98-104, 1994.

LAZDINS, J.K.; KLIMKAIT, T.; ALTERI, E.; WALKER, M.; WOODS-COOK, K.; COX, D.; BILBE, G.; SHIPMAN, R.; CERLETTI, N.; MCMASTER, G. TGF-beta: upregulation of HIV replication in macrophages. **Res. Virol.**, **142**:239-242, 1991.

LIITSOLA, K.; TASHKINOVA, I.; LAUKKANEN, T.; KOROVINA, G.; SMOLSKAJA, T.; MOMET, O.; MASHKILLEYSON, N.; CHAPLINSKAS, S.; BRUMMER-KORVENKONTIO, H.; BANHATALO, J.; LEINIKKI, P.; SALMINEN, M.O. HIV-1 genetic subtype A/B recombinant strain causing an explosive epidemic in injecting drug users in Kaliningrad. **AIDS**, **12**:1907-1919, 1998.

LIM, Y.A.; KOJIMA, S.; NAKAMURA, N.; MIYASHIRO, H.; FUSHIMI, H.; KOMATUSU, K.; HATTORI, M.; SHIMOTOHNO, K.; GUPTA, M. P.; CORREA, M. Inhibitory effects of *Cordia spinescens* extracts and their constituents on reverse transcriptase and protease from human immunodeficiency virus. **Phytother. Res.**, **11**:490-495, 1997.

LIMA, R.G.; WEYENBERGH, J.V.; SARAIVA, E.M.; BARRAL-NETO, M.; GALVÃO-CASTRO, B.; BOU-HABIB, D.C. The replication of human immunodeficiency virus type 1 in macrophages is enhanced after phagocytosis of apoptotic cells. **J. Infect. Dis.**, **185**:1561-1566, 2002

LORI, F.; MALYKH, A.; CARA, A.; SUN, D.; WEINSTEIN, J.N.; LISZIEWICZ, J.; GALLO, R.C. Hydroxiurea as an inhibitor of human immunodeficiency virus-type 1 replication. **Science**, **266**:801-804, 1994.

LOUWAGIE, J.; DELWART, E.L.; MULLINS, J.I.; MCCUTCHAN, F.E.; EDDY, G.; BURK, D.S. Genetic analysis of HIV-1 isolates from Brazil reveals presence of two distinct genetic subtypes. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, **10**:561-567, 1994.

LYSLE, D.T.; COUSSONS, M.E.; WATTS, V.J.; BENNETT, E.H.; DYKSTRA, L.A. Morphine-induced alterations of immune status: dose dependency, compartment specificity and antagonism by naltrexone. **J. Pharm. Exp. Ther.**, **3**:1071-1078, 1993.

MA, W.G.; FUKUSHI, Y.; TAHARA, S. Fungitoxic alkaloids from Hokkaido *Cordalis* species. **Fitoterapia**, **70**:258-265, 1999.

MA, W.G.; FUKUSHI, Y.; TAHARA, S.; OSAWA, T. Fungitoxic alkaloids from Hokkaido Papaveraceae. **Fitoterapia**, **71**:527-534, 2000.

MARGOLIS, D.; HEREDIA, A.; GAYUSEE, J.; OLDACH, D.; DRUSANS, G.; REDFIELD, R. Abacavir and mycophenolic acid, an inhibitor of inosine monophosphate dehydrogenase, have profound and synergistic anti-HIV activity. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, **21**:362-370, 1999.

MARTIN, J.C.; BANDRÉS, J.C. Cells of the monocyte-macrophage lineage and pathogenesis of HIV-1 infection. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, **22**:413-429, 1999.

MATTHÉE, G.; WRIGHT, A.D.; KÖNIG, G.M. HIV reverse transcriptase inhibitors of natural origin. **Planta Med.**, **65**:493-506, 1999.

MCCUNE, J.M. The dynamics of CD4+T-cell depletion in HIV disease. **Nature**, **410**: 974-979, 2001.

MCCUTCHAN, F.E. Understanding the genetic diversity of HIV-1. **AIDS**, **14**:S31-S44, 2000. Supplemento 3.

MCCMAHON, J.B.; CURRENS, M.J.; GULAKOWSKI, R.J.; BUCHEIT, R.W.; LACKMAN-SMITH, C.; HALLOCK, Y.F.; BOYD, M.R.; MICHELLAMINE, B. A novel plant alkaloid, inhibits human immunodeficiency virus-induced cell killing by at least two distinct mechanisms **Antimicrob. Agents Chemother.**, **39**:484-488, 1995.

MELLORS, J.W.; GRIFFITH, B.P.; ORTIZ, M.A.; LANDRY, M.L.; RYAN, J.L. Tumor necrosis factor- α /cachectin enhances human immunodeficiency virus type 1 replication in primary macrophages. **J. Infect. Dis.**, **163**:78-82, 1991.

MELLORS, J.W.; RINALDO JUNIOR, C.R.; GUPTA, P.; WHITE, R.M.; TODD, J.A.; KINGSLEY, L.A. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. **Science**, **272**:1167-1170, 1996.

MONTAVON, C.; BIBOLLET-RUCHE, F.; ROBERTSON, D.; KOUMARE, B.; MULANGA, C.; SEU-WILLIAMS, E.; TOURE, C.; MBOUP, S.; SAMAN, E.; DELAPORT, E.; PEETERS, M. The identification of a complex A/G/I/J recombinant HIV type 1 virus in various west african countries. **AIDS Res. Hum. Retrovirus**, **15**:1707-1712, 1999.

MONTEFIORI, D.C.; COLLMAN, R.G.; FOUTS, T.R.; ZHOU, J.Y.; BILSKA, M.; HOXIE, J.A.; MOORE, J.P.; BOLOGNESI, D.P. Evidence that antibody-mediated neutralization of human immunodeficiency virus type 1 by sera from infected individuals is independent of coreceptor usage. **J. Virol.**, **72**:1886-1893, 1998.

MOORE, J.P.; CAO, Y.; QING, L.; SATTENTAU, Q.J.; PYATI, J.; KODURI, R.; ROBINSON, J.; BARBAS, III C.F.; BURTON, D.R.; HO, D.D. Primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 are relatively resistant to neutralization by monoclonal

antibodies to gp120, and their neutralization is not predicted by studies with monomeric gp120. **J. Virol.**, **69**:101-109, 1995.

MOORE, J.P.; STEVENSON, M. New targets for inhibitors of HIV-1 replication. **Nature**, **1**:40-49, 2000.

MOORE, J.P.; PARREN, P.W.H.I.; BURTON, D.R. Genetic subtypes, humoral immunity and human immunodeficiency virus type 1 vaccine developed. **J. Virol.**, **75**:5721-5729, 2001.

MORGADO, M.G.; SABINO, E.C.; SHPAER, E.G.; BONGERTZ, V.; BRIGIDO, L.; GUIMARA, M.D.; CASTILHO, E.A.; GALVÃO-CASTRO, B.; MULLINS, J.I.; HENDRY, R.M.; *et al.* V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from north american/european prototype and detection of subtype E. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, **10**:569-576, 1994.

MORGADO, M.G.; GUIMARÃES, M.L.; GRIPP, C.B.; COSTA, C.I.; NEVES, J.R.; VELOSO, V.G.; LINHARES-CARVALHO, M.I.; CASTELLO-BRANCO, L.R.; BASTOS, F.I.; KUIKEN, C.; CASTILHO, E.A.; GALVÃO-CASTRO, B.; BONGERTZ, V. Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: high prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Evandro Chagas Hospital AIDS clinical research group. **J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, **18**:488-494, 1998.

NAIF, H.M.; LI, S.; ALALI, M.; SLOANE, A.; WU, L.; KELLY, M.; LYNCH, G.; LLOYD, A.; CUNNINGHAM, A.L. CCR5 expression correlates with susceptibility of maturing monocytes to human immunodeficiency virus type 1 infection. **J. Virol.**, **72**:830-836, 1998.

OLALLA, P.G; KNOBEL, H.; CARMONA, A.; GUEJAR, A.; LOPEZ-COLOMÉS, J.L.; CAYLÀ, J.A. Impact of adherence and highly active antiretroviral therapy on survival in HIV-infected patients. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, **30**:105-110, 2002.

ORENSTEIN, J.M.; MELTZER, M.S.; PHIPPS, T.; GENDELMAN, H.E. Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus type 1 and 2 in recombinant human colony-stimulation factor-1-treated human monocytes: an ultrastructural study. **J. Virol.**, **62**:2578-2586, 1988.

ORLOFF, S.L.; BADEA, C.I.; KENNEDY, M.S.; ALLAWAY, G.P.; MADDON, P.J.; MCDOUGAL, J.S. Increase in sensitivity to soluble CD4 by primary HIV type 1 isolates after passage through C8166 cells: association with sequence differences in the first constant (C1) region of glycoprotein 120. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, **11**:335-342, 1995.

PALLELA, F.J.; DELONEY, K.M.; MOORMAN, A.C.; LOVELESS, M.O.; FUHNER, J.; SATTEN, G.A.; ASCHMAN, D.J.; HOLMBERG, S.D. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. **New Engl. J. Med.**, **338**:853-860, 1998.

PANTALEO, G.; GRAZIOSI, C.; DEMAREST, J.F.; BUTINI, L.; MONTRONI, M.; FOX C.H.; ORENSTEIN, J.M.; KOTLER, D.P.; FAUCI, A.S. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. **Nature**, **362**: 355-358, 1993.

PANTALEO, G.; FAUCI, A.S. New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. **Annu. Rev. Immunol.**, **13**:487-512, 1995.

PEETERS, M.; SHARP, P.M. Genetic diversity of HIV-1: the moving target. **AIDS**, **14**:S129-S140, 2000.

PEETERS, M.. Recombinant HIV sequences: their role in the global epidemic. In: KUIKEN, C.; FOLEY, B.; HAHN, B.; MARX, P.; MCCUTCHAN, F.; MELLORS, J.; MULLINS, J.; SODROSKI, J.; WOLINSKY, S.; KORBER, B (Eds). **HIV sequence compendium 2000**. Los Alamos: Theoretical Biology and Biophysics Group T-10, 2000. P. 54-72.

PERELSON, A.S.; NEUMANN, A.U.; MARKOWITZ, M.; LEONARD, J.M.; HO, D.D. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. **Science**, **271**:1582-1586, 1996.

PERRIN, L.; TELENTI, A. HIV treatment failure: testing for HIV resistance in clinical practise. **Science**, **280**:1871-1873, 1998.

PETERSON, P.K.; GEKKER, G.; LOKENSGARD, J.R.; BIDLACK, J.M.; CHANG, A.C.; FANG, X.; PORTOGHESE, P.S. K-opioid receptor agonist suppression of HIV-1 expression in CD4+ lymphocytes. **Biochem. Pharmacol.**, **61**:1145-1151, 2001.

POIGNARD, P.; KLASSE, P.J.; SATTENTAU, Q.J. Antibody neutralization of HIV-1. **Immunol. Today**, **17**: 239-246, 1996.

POMMIER, Y.; MARCHAND, C.; NEAMATI, N. Retroviral integrase inhibitors year 2000: update and perspectives. **Antiviral Res.**, **47**:139-148, 2000.

POTTS, K.E.; KALISH, M.L.; LOTT, T.; ORLOFF, G. LUO, C.C.; BERNARD, M.A .; ALVES, C.B.; BADARO, R.; SULEIMAN, J.; FERREIRA, O.; *et al*. Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelop glycoprotein in Brazil. Brazilian Collaborative AIDS Research Group. **AIDS**, **7**:1191-1197, 1993.

PRANCE, G.T. Plantas medicinais. In:_____. **Manual de botânica econômica**. Maranhão: Gráfica universitária, s.d., cap 8. p.81-89.

PRESTON, B.D.; POIESZ, B.J.; LOEB, L.A. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. **Science**, **242**:1168-1171, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Brasileiro de DST e AIDS**. 1ª ed, 2000.

RATES, S.M.K.; SCHAPOVAL, E.E.S.; SOUZA, I.A.; HENRIQUES, A.T. Chemical constituents and pharmacological activities of *Peschiera australis*. **J. Pharmacog.**, **31**: 288-294, 1993.

RICHMAN, D.; STASZEWSKI, S. **A practical guide to HIV drug resistance and its implications for antiretroviral treatment strategies**. London: International Medical Press, 1997. p.1-34.

RICHMAN, D.D. How drug resistance arises. **Sci. Am.**, 68-69, 1998.

RICHMAN, D.D. HIV chemotherapy. **Nature**, **410**:995-1001, 2001.

RINALDO, C.; HUANG, X.; FAN, Z.; DING, M.; BELTZ, L.; LOGAR, A.; PANICALE, D.; MAZZARA, G.; LIEBMANN, J.; COTTRILL, M.; GUPTA, P. High levels of anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) memory cytotoxic T-lymphocyte activity and low viral load are associated with lack of disease in HIV-1 infected long-term nonprogressors. **J. Virol.**, **69**:5838-5842, 1995.

RINALDO, C.R.; BELTZ, L.A.; HUANG, X.L.; GUPTA, P.; FAN, Z.; TORPEY, D.J. **3rd**. Anti-HIV type 1 cytotoxic T lymphocyte effector activity and disease progression in the first 8 years of HIV type 1 infection of homosexual men. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, **11**:481-489, 1995.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. Alcalóides. In: _____. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Ed. Premier, 1997. Cap. 9, p.163-208.

SABINO, E.C.; SHPAER, E.G.; MORGADO, M.G.; KORBER, B.T.; DIAZ, R.S.; BONGERTZ, V.; CAVALCANTE, S.; GALVÃO-CASTRO, B.; MULLINS, J.I.; MAYER, A. Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil. **J. Virol.**, **68**:6340-6346, 1994.

SATTENTAU, Q.J.; MOORE, J.P. Human immunodeficiency virus type 1 neutralization is determined by epitope exposure on the gp120 oligomer. **J. Exp. Med.**, **182**:185-196, 1995.

SAVARINO, A.; GENNERO, L.; CHEN, H.C.; SERRANO, D.; MALAVASI, F.; BOELAERT, J.R.; SPERBER, K. Anti-HIV effects of chloroquine: mechanism of inhibition and spectrum of activity. **AIDS**, **15**:2221-2229, 2001.

SCHMITZ, J.E.; KURODA, M.J.; SANTRA, S.; SASSEVILLE, V.G.; SIMON, M.A.; LIFTON, M.A.; RACZ, P.; TENNER-RACZ, K.; DALESANDRO, M.; SCALLON, B.J.; GHAYEB, J.; FORMAN, M.A.; MONTEFIORI, D.C.; RIEBER, E.P.; LETVIN, N.L.; REIMANN, K.A. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8⁺ lymphocytes. **Science**, **283**:857-860, 1999.

SCHUITEMAKER, H.; KOOT, M.; KOOTSTRA, N.A.; DERCKSEN, M.W.; DE GOEDE, R.E.; VA STEENWIJK R.P.; LANGE, J.M.; SCHATTENKERK, J.K.; MIEDEMA, F.; TERSMETTE, M. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population. **J. Virol.**, **66**:1354-1360, 1992.

SCHWARTZ, O.; MARÉCHAL, V.; LE GALL, S.; LEMONNIER, F.; HEARD, J. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 nef protein. **Nat. Med.**, **2**:338-342, 1996.

SCUDIERO, D.A.; SHOEMAKER, R.H.; PAUL, K.D.; MONKS, A.; TIERNEY, S.; NOFZIGER, T.H.; CURRENS, M.J.; SENIFF, D.; BOYD, M.R. Evaluation of a tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. **Cancer Res.**, **48**:4827-4833, 1988.

SILICIANO, R.F. Latency and reservoirs for HIV-1. **AIDS**, **13**:S549-S59, 1999.

SIMON, F.; MAUCLERE, P.; ROQUES, P.; LOUSSERT-AJAKA, I.; MÜLLER-TRUTWIN, M.C.; SARAGOSTI, S.; GEORGES-COURBOT, M.C.G.; BARRÉ-SINOSSI, F.; BRUN-VÉZINET, F. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. **Nat. Med.**, **4**:1032-1037, 1998.

SOLOMOS, T.W.G. Tópicos especiais III. In: _____ **Química Orgânica**. 1.ed. Rio de Janeiro: Ed. LTC - Livros Técnicos e Científicos, 1983. v.3, Cap. 22, p.887-909

SPERBER, K.; CHIANG, G.; CHEN, H.; ROSS, W.; CHUSID, E.; GONCHAR, M.; CHOW, R.; LIRIANO, O. Comparison of hydroxicloroquine with zidovudina in asymptomatic patients infected with human immunodeficiency virus type 1. **Clin. Ther.**, **19**:913-923, 1997.

SPERBER, K.; LOUIE, M.; KRAUS, T.; PRONER, J.; SAPIRA, E.; LIN, S.; STECHER, V.; MAYER, L. Hydroxicloroquine treatment of patients with human immunodeficiency virus type 1. **Clin. Ther.**, **17**:622-636, 1995.

STANTCHEV, T.S.; BRODER, C.C. Consistent and significant inhibition of human immunodeficiency virus type 1 envelope-mediated membrane fusion by β -chemokines (RANTES) in primary human macrophages. **J. Infect. Dis.**, **182**:68-78, 2000.

TAN, G.T.; KINGHORN, D.; HUGHES, S.H.; PEZZUTO, J.M. Psychotrine and its O-methyl ether are selective inhibitors of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase. **J. Biol. Chem.**, **266**:23529-23536, 1991a.

TAN, G.T.; PEZZUTO, J.M.; KINGHORN, A.D. Evolution of Natural Products as Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Reverse Transcriptase. **J. Nat. Prod.**, **54**:143-154, 1991b.

TRIQUES, K.; BOURGEOIS, A.; VIDAL, N.; MPOUDI-NGALE, E.; MULANGA-KABEYA, C.; NZILAMBI, N.; TORIMINO, N.; SAMAN, E.; DELAPORTE, E.; PEETERS,

M. Near-full-length genome sequencing of divergent african HIV type 1 subtype F virus leads to the identification of a new HIV type 1 subtype designated K. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, **16**:139-151, 2000.

TROKOLA, A.; KETAS, T.; KEWALRAMANI, V.N.; ENDORF, F.; BINLEY, J.M.; KATINGER, H.; ROBISON, J.; LITTMAN, D.R.; MOORE, J.P. Neutralization sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 primary isolates to antibodies and CD4-based reagents is independent of coreceptor usage. **J. Virol.**, **72**:1876-1885, 1998.

TUTTLE, D.L.; HARRISON, J.K.; ANDERS, C.; SLEASMAN, J.W.; GOODENOW, M. M. Expression of CCR5 increases during monocyte differentiation and directly mediates macrophages susceptibility to infection by human immunodeficiency virus type 1. **J. Virol.**, **72**:4962-4969, 1998.

VAN DER LOEFF, M.; AABY, P. Towards a better understanding of the epidemiology of HIV-1. **AIDS**, **13**: S69-S84, 1999. Supplemento A.

VIEREGGE, B.; RESCH, K.; KEAVER, V. Synergistic effects of the alkaloid sinomenine in combination with the immunosuppressive drugs tacrolimus and mycophenolic acid. **Planta Med.**, **65**:80-82, 1999.

VIRELIZIER, J.L. Suppression of HIV-1 replication by chemokines. **Onzième Colloque des cent Gardes**, 1997.

VLIETINCK, A.J.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; PIETERS, L.A. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. **Planta Med.**, **64**:97-109, 1998.

WALKER, B.D.; KOWALSKI, M.; GOH, W.C.; KOZARSKY, K.; KRIEGER, M.; ROSEN, C.; ROHRSCHEIDER, L.; HASELTINE, W.A.; SODROSKI, J. Inhibition of human immunodeficiency virus syncytium formation and virus replication by castanospermine. **Proc. Natl. Sci. USA**, **84**:8120-8124, 1987.

WEISS, R.A. How does HIV cause AIDS? **Science**, **260**:1273-1279, 1993.

WEISS, R.A. Gulliver's travels in HIVland. **Nature**, **410**:963-967, 2001.

WEISSMAN, J.D.; BROWN, J. A.; HOWCROFT, T.K.; HWANG, J.; CHAWLA, A.; ROCHE, P.A.; SCHILTZ, L.; NAKATANI, Y.; SINGER, D.S. HIV-1 tat binds TAFII250 and presses TAFII250-dependent transcription of major histocompatibility class I genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **95**:11601-11606, 1998.

WHO. **Guidelines for Standard HIV Isolation Procedures**. WHO/GPA/RID/VAD/94.2. Geneva, 1994.

WIT, F.W.N.M.; VAN LEEUWEN, R.; WEVERLING, G.J.; JURRIAANS, S.; NAUTA, K.; STEINGROVER, R.; SCHUIJTEMAKER, J.; EYESSE, X.; FORTUIN, D.; WEEDA, M.;

WOLF, F.; REISS, P.; DANNER, S.A.; LANGE, J.M.A. Outcome and predictors of failure of highly active antiretroviral therapy: one-year follow-up of a cohort of human immunodeficiency virus type 1-infected persons. **J. Infect. Dis.**, **179**:790-798, 1999.

WU, L.; GERARD, N.P.; WYATT, R.; CHOE, H.; PAROLIN, C.; RUFFING, N.; BORSETTI, A.; CARDOSO, A.A.; DESJARDIN, E.; NEWMAN, W.; GERARD, C.; SODROSKI, J. cd4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. **Nature**, **384**:179-183, 1996.

WU, L.; PAXTON, W.A. CCR5 levels and expression pattern correlate with infectibility by macrophage-tropic HIV-1, *in vitro*. **J. Exp. Med.**, **185**:1681-1691, 1997.

ZEICHNER, S.L. The molecular biology of HIV: insights into pathogenesis and targets for therapy. **Perinatal AIDS**, **21**:39-63, 1994.