



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EVALUACIÓN DE NUEVOS COMPUESTOS DE TIPO PIRIDINONA DIRIGIDOS A LA
TRANSCRIPTASA INVERSA DEL VIH-1: ANÁLISIS ESTRUCTURA-FUNCIÓN

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biol. Julio Cesar Abarca Magaña

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Leonor Huerta Hernández
Departamento de Inmunología
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Bertha Josefina Espinoza Gutiérrez
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Isamel Bustos Jaimes
Facultad de Medicina, UNAM

Ciudad de México. Marzo, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Contenido

Agradecimientos.....	3
1. Resumen.....	5
2. Introducción.....	6
2.1. Virus de inmunodeficiencia humana.....	6
2.1.1. Infección.....	8
2.1.2. Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).....	10
2.2. Tratamientos antirretrovirales contra el VIH-1.....	11
2.2.1 Transcriptasa Inversa (TI).....	13
2.2.2. Inhibidores No Nucleósidos de la Transcriptasa Inversa (INNTI).....	14
2.2.3. Diseño de nuevos INNTIs.....	15
2.2.4. Optimización de INNTIs por química computacional.....	15
3. Antecedentes.....	17
4. Planteamiento del Problema.....	20
5. Hipótesis.....	21
6. Objetivo general.....	22
6.1. Objetivos Particulares.....	22
7. Metodología.....	22
7.1. Ensayo de inhibición de la actividad de la enzima transcriptasa reversa del VIH-1.....	22
7.2. Virus.....	23
7.3. Línea celular.....	23
7.4. Ensayo de viabilidad por MTT.....	25
7.5 Determinación de CI_{50} y CC_{50}	25
8. Resultados.....	26
8.1. Inhibición de la actividad de la transcriptasa inversa.....	27
9. Discusión.....	35
10. Conclusiones.....	42
11. Bibliografía.....	44
12. Anexo.....	50

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a toda mi familia en especial a mis padres Dalia María Magaña López y Julio Cesar Abarca Hernández, por su apoyo incondicional durante la realización de mis estudios maestría, siempre estaré agradecido por todo lo que me han dado y por todas sus enseñanzas.

Quiero agradecer a mi novia Carmen Acosta Noriega, por tu paciencia, risas, regaños, cariño y amor que todos los días me muestras tu apoyo y ánimos siempre me han ayudado a continuar durante los momentos más difíciles. A mi mejor amigo Ricardo Raña por su amistad y apoyo.

Quiero agradecer a mi tutora la Dra. Leonor Huerta Hernández por permitirme desarrollar mi proyecto bajo su tutela. Su paciencia y la confianza que ha puesto en mí es un tesoro. Siempre atesoraré todas las pláticas y conversaciones que he tenido con usted, me han enseñado mucho y aprecio también que se tome el tiempo de corregirme cuando me equivoco, esto es de lo que más me ha ayudado a lo largo de mi maestría.

A mis compañeros de laboratorio Rogelio con quien juntos codo con codo en el citómetro de flujo en viernes a las ocho de la noche o fines de semana, continuábamos trabajando sin parar por el gusto y pasión por el proyecto. Mirna, Isabel, que juntos vivimos las épocas intensas de los posgrados de cada uno. Son una fuente de inspiración por nunca rendirse. Al técnico del laboratorio QFB. Gisela Du pont por el técnico brindado en el laboratorio. A la Dra. Nora, que siempre se toma el tiempo de escucharme, sus consejos siempre los atesorare.

A los que se adelantaron a mi abuela Rosa, mi amigo Ernesto, a mi bello y hermoso Roth, mi perrito hermoso, que siempre recordare.

Al CONACYT por apoyarme con la beca de maestría y al Posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas por haberme aceptado, las clases fueron muy buenas

y aprendí mucho en ellas. Quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México por esta oportunidad de poder cursar una maestría y por qué este viaje no hubiera sido tan hermoso en otro lugar. Al Laboratorio Nacional de citometría de Flujo, al Dr. José Luis Medina Franco y al Dr. Daniel Chávez, por su apoyo durante la elaboración de este proyecto.

Este trabajo fue apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, proyectos IN215820 y IA201220, y el Programa Institucional Nuevas Alternativas contra Enfermedades Infecciosas del Instituto de Investigaciones Biomédicas

Hay muchas cosas más por las que agradecer, pero no me alcanzaría la vida para decirlas todas.

“No estudio para saber más, sino para ignorar menos” de Sor Juana Inés de la Cruz.

1. RESUMEN

La enzima transcriptasa inversa (TI) del VIH-1 es responsable por la transcripción del ARN viral en una molécula de doble cadena de ADN, la cual subsecuentemente se integra en el genoma de la célula hospedera. La TI es uno de los principales blancos terapéuticos en el tratamiento en personas infectadas con este virus. La aparición de variantes resistentes a los medicamentos más utilizados, los efectos colaterales que generan las terapias actuales, hacen necesario el desarrollo de nuevos medicamentos eficientes contra variantes silvestres y resistentes así y menos nocivos.

El anillo de piridinona es una estructura con potencial en el desarrollo de nuevos inhibidores de la transcriptasa inversa de tipo no nucleósido. Para este trabajo se diseñaron y sintetizaron nuevos análogos de piridinonas con potencial inhibitorio de la TI del VIH-1, utilizando el análisis de relación estructura actividad cuantitativa, la exploración virtual de bibliotecas de compuestos y análisis de acoplamiento molecular para determinar los compuestos con mejor interacción con la TI. Se sintetizaron 32 moléculas (familias DA, DH y DG), las cuales fueron evaluadas en tres pruebas: actividad inhibitoria contra la función de la TI, citotoxicidad hacia la línea celular linfocítica humana Jurkat T CD4+ JTLRG, y actividad inhibitoria de la replicación de la cepa viral IIIIB en la misma línea celular.

Los resultados mostraron que la mayoría de los compuestos pueden interaccionar, pero no inhibir a la enzima TI ni la replicación viral, y además mostraron diferentes porcentajes de citotoxicidad. Para los grupos DH y DA encontramos que la mayoría de los compuestos pueden interaccionar con la enzima, pero no inhiben ni su actividad ni la replicación. El efecto en el modelo de infección *in vitro* observado en estos compuestos es con excepciones, derivada de la citotoxicidad que generan en las células. Estos grupos podrían ser modificados estructuralmente para disminuir su citotoxicidad y mejorar su habilidad para inhibir a la enzima y la replicación viral. El compuesto que mejor capacidad inhibitoria mostró fue el DG-9, el cual tuvo un nivel de inhibición del 79% de la replicación viral ($CI_{50}= 28.78\mu\text{M}$) y de 39 % de inhibición de la actividad de la TI ($CI_{50}= 69.81\mu\text{M}$) y además de que no mostró una citotoxicidad significativa (27% a $100\mu\text{M}$). Por lo anterior proponemos la estructura del DG-9 (cómo base para el diseño de nuevos compuestos activos contra esta enzima.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Virus de Inmunodeficiencia Humana

El virus de inmunodeficiencia Humana de tipo 1 (VIH-1) pertenece al género de los Lentivirus dentro de la familia *Retroviridae*, es un virus de genoma de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva (Fields *et al*, 2013). El diámetro de la partícula viral varía entre 80-120 nm; dentro de ella se encuentra el genoma del virus que se compone de dos cadenas de ARN de polaridad positiva las cuales están rodeadas de nucleoproteínas que juntos forman la nucleocápside de forma cónica. Dentro de esta cápside se encuentra junto al material genético otras proteínas necesarias para llevar a cabo la infección de la célula hospedera. El genoma del virus (figura 1) tiene una longitud de cerca de 9.8 kb de largo, tiene en ambos extremos 5' y 3' secuencias no codificantes denominadas por sus siglas en inglés LTR (Long Terminal Repeats), las cuales tienen la función de secuencias de reconocimiento tanto para proteínas celulares implicadas en la replicación viral y del propio virus (Engelman y Cheparov, 2012).

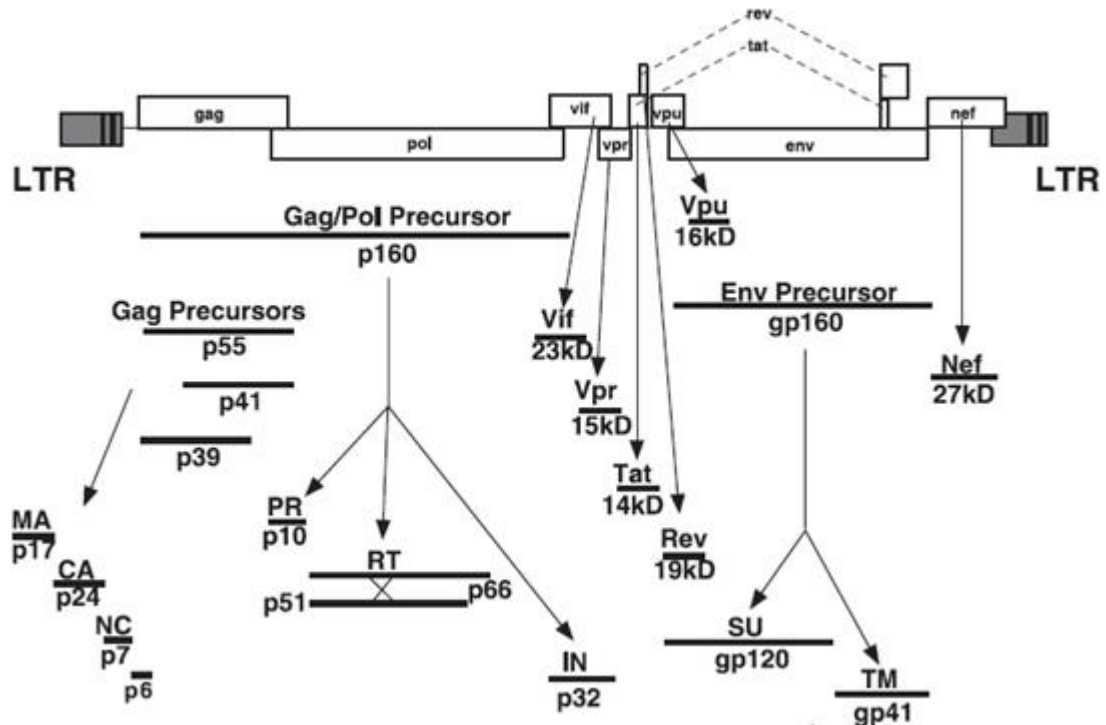


Figura 1. Representación gráfica del genoma del virus de inmunodeficiencia humana. Recuperado de Fields et al. 2013

Las proteínas del VIH-1 pueden ser clasificadas en tres categorías, estructurales (Gag, Pol y Env), reguladoras (Tat y Rev) y accesorias (Vpu, Vpr, Vif y Nef) ("Structure, Expression, and Regulation of the HIV Genome", 2018).

La infección de la célula blanco ocurre cuando la hetero glicoproteína (gp120 y gp41) interacciona con la proteína de superficie CD-4, esta primera interacción se da a través de gp120. esto genera que se exponga el sitio de unión a una segunda molécula receptor de quimiocinas CC-5 o CCR5 (en la infección inicial) o CXCR4 (receptor 4 de quimiocinas con motivo C-X-C) dentro de la misma gp120. Cuando se establece la interacción con el CCR5, esto promueve la inserción del péptido de fusión que se encuentra en el amino terminal de la proteína gp41 en la membrana celular, esto lleva a un re-arreglo de aminoácidos que forman la horquilla de seis hélices que hace que se acerquen y fusionen la membrana del virus y de la célula y la liberación intracelular de la nucleocápside (Engelman y Cheparov, 2012, Fields, 2013).

La nucleocápside está compuesta por proteínas de la cápside los cuales hacen un núcleo cónico que protege el material genético, la transcriptasa inversa, la integrasa. Cuando la nucleocápside ingresa a la célula ocurre una disolución parcial de núcleo de proteínas de la cápside, la cual es necesaria para que se lleva a cabo la transcripción inversa la cual transforma material genético de ARN en ADN de doble cadena por la actividad de la transcriptasa inversa. Este ADN se integra al genoma de la célula hospedera por la actividad de la integrasa (Engelman y Cheparov, 2012).

Al inicio de la transcripción del material genético del virus, se genera un ARN mensajero que tiene el potencial de codificar para los 9 genes del VIH-1, el cual sufre un proceso de corte y empalme para codificar alguna de las proteínas o puede ser exportado sin modificaciones y ser empaquetado cómo genoma viral en los nuevos viriones (Rainer *et al.* 2016). Las proteínas de expresión temprana Tat y Rev son necesarias para que se lleve a cabo una producción eficiente de los ARN mensajeros del virus, mientras que los genes *gag* y *pol* se sintetizan en una poliproteína durante la fase productiva de la infección, los otros genes que componen el genoma tienen diferentes funciones, entre ellas inhibir la respuesta antiviral de la célula (Engelman y Cheparov, 2012).

Con base a la secuencia de los genes *gag*, *pol* y *env* se han descrito 3 grupos principales de VIH-1 el grupo M, B y O. Dentro del grupo M se encuentran los subtipos A, B y C, entre ellos representan el 50% de las infecciones a nivel mundial, dentro de este grupo se encuentran varios subtipos, siendo el subtipo B el que prevalece en América con 54% de infecciones y un aumento de casos de subtipo C (Bahls *et al.*, 2019, Buonaguro *et al.* 2007., Quesnel-Vallières *et al.* 2011). El subtipo C concentra el 80% de los infectados a nivel mundial, esto es debido a que es más predominante en Asia y África. La variabilidad genética en subtipos determina la “barrera genética”, la cual es el número de mutaciones requeridas para sé generen mutaciones que permitan escapar a la presión selectiva de los antirretrovirales. La capacidad de evasión que otorgan la mutación es diferente para cada tipo de medicamento. Una mutación el sitio de unión alostérico de los INNTI en la TI es suficiente en algunos casos para generar resistencia, mientras que para generar resistencia a los inhibidores de la integrasa es necesario más de una mutación (Buonaguro *et al.* 2007).

2.1.1. Infección por VIH-1

El VIH-1 puede transmitirse a través de relaciones sexuales con una persona infectada, por transfusión sanguínea y por transmisión perinatal. El virus infecta primero a macrófagos o células presentadoras de antígeno, estas células llevan al virus hasta los órganos linfoides donde se replica. En el tejido linfoide asociado a intestino (GALT, por sus siglas en inglés) es donde ocurre la primera replicación del virus en los linfocitos CD-4+ de memoria que residen ahí, además que ahí residen cerca del 40% de los linfocitos del cuerpo. El daño derivado de la replicación del virus genera la disrupción y deterioro del GALT; lo que origina una ruptura del epitelio intestinal, esto permite la migración de bacterianas y células infectadas hacia el torrente sanguíneo además de promover una inflamación que provoca un reclutamiento de células susceptibles de ser infectadas por el virus (Deek *et al.* 2015, Fields *et al.* 2013).

En la replicación inicial fuera del GALT se da en los nódulos linfáticos, ahí debido a la gran cantidad de partículas virales que se producen estos se llegan a hinchar, dando lugar a que se dañe el epitelio, esto provoca la producción de moléculas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β y permitiendo que liberen partículas virales al torrente sanguíneo. Durante el pico inicial de la viremia, denominada “aguda”, las poblaciones de células CD-4+ que se encuentran en circulación (especialmente Th-17 y Th de memoria) son destruidas y el cuerpo monta una respuesta de células citotóxicas, antes de que el cuerpo pueda. A la par se inicia una respuesta del sistema inmune innato dependiente de TLR, esto promueve la producción y liberación al torrente sanguíneo de interferón de tipo I y III, además de citocinas proinflamatorias, como las anteriormente mencionadas en este párrafo, las cuales activan a macrófagos, células asesinas naturales y células dendríticas. Estas células junto a los linfocitos T CD-8+, generan una respuesta que permite el “control” momentáneo de la replicación del virus al destruir las células infectadas (Deek *et al.* 2015, Moir *et al.* 2011., Teer *et al.* 2020).

El individuo infectado a la par que genera una respuesta celular también genera una respuesta inmune caracterizada por la generación de anticuerpos en los primeros 8 días post infección, es posible la detección de inmunoglobulinas M y G, que son capaces de neutralizar la infección en macrófagos y monocitos por mecanismos dependientes del receptor a Fc 1 (Fc γ R1). La presencia de anticuerpos neutralizantes y la respuesta celular provoca la disminución de la replicación viral y el establecimiento de un periodo de “eclipse” o “set point” manteniendo una replicación basal que puede durar varios años (Deek *et al.* 2015). Durante este periodo de latencia, continúa la disminución gradual en la cantidad de linfocitos T CD4+ en sangre de 1,200 células/ μ L de sangre a menos de 200 células/ μ L, lo que ocasiona la aparición de una inmunodeficiencia grave (Deek *et al.* 2015).

El VIH-1 infecta y destruye no solo linfocitos T CD-4+, también células de memoria que, en algunos casos, no inician una replicación viral inmediatamente si no que funcionan como reservorios virales. El virus también infecta otras células que expresan CD-4 como células dendríticas y de Langerhans, así como macrófagos y monocitos. Estas células pueden vivir muchos años y fungir como reservorios virales.

Aunado a esto la alta tasa de mutaciones durante la replicación del virus genera la aparición de variantes insensibles a anticuerpos y también capaces de escapar de la presión de las defensas inmunes (Teer *et al.* 2020., Lewis G. K., 2014.)

Durante la fase de eclipse ocurre una disminución de las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ efectoras se debe a muchos factores entre ellos la disminución de la producción de interleucina-2 (Sereti et al. 2004), la infección por el virus *per se* y la producción de partículas virales. Esto generan mecanismos de muerte celular de tipo apoptosis o piroptosis que afectan e impiden que nuevas poblaciones de linfocitos T CD-4⁺ se establezcan. Ante la ausencia de células claves para montar una respuesta inmune eficiente los pacientes son susceptibles a enfermedades oportunistas (Rainer et al. 2016., Ho et al. 1995., Herbein et al. 1998., Teer *et al.* 2020).

2.1.2. Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)

La disminución de las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ lleva a la incapacidad del organismo de montar una respuesta inmune eficiente, esto permite que enfermedades oportunistas se manifiesten de manera aguda y pueden generar serios problemas a la salud en el individuo (Murphy et al. 2016). Además de las infecciones oportunistas por el virus del herpes o citomegalovirus pueden llegar a ocurrir otro tipo de enfermedades como problemas neurológicos; se estima que entre el 10-20 % de los pacientes infectados desarrollan complicaciones en el sistema nervioso central, pérdida de visión, meningitis, demencia, ataxia cerebelar. Otras complicaciones ocurren en esófago y estómago como la disfagia; diarrea de manera multifactorial la pérdida de peso. (Gazzard, B. 1987). Todos los padecimientos que se presentan por la inmunodeficiencia generada por la replicación del virus son los que ocasionan la muerte de los pacientes con SIDA (Scutch field, F. D., y Benenson, A. S. 1989, Gazzard, B. 1987, Chang, C. C *et al.* 2013).

2.2. Tratamientos antirretrovirales contra el VIH-1

En 1987 se introdujo el primer inhibidor de la TI el Zidovudine (AZT) y desde entonces el desarrollo de inhibidores que afectan a otras proteínas virales ha permitido introducir el régimen de utilizar tres medicamentos al mismo tiempo (Montagnier, L. 2002).

La Terapia Antirretroviral de Gran Actividad (TARGA) es el esquema de tratamiento más utilizado para el control de la replicación del virus en la actualidad. En la figura 2 se esquematiza los medicamentos que se incluyen en TARGA inhiben la actividad de varias proteínas del virus que participan en el ciclo replicativo; el tratamiento incluye inhibidores de la proteasa (IP) que impide la maduración del virión, inhibidores de la integrasa (II) que inhiben la integración del genoma del virus al genoma de la célula hospedera, inhibidores del correceptor CCR5 que evitan las interacciones con la proteína viral, inhibidores de la fusión (IF) los cuales evitan la fusión de membranas entre la célula blanco y el virus, y de los inhibidores de la enzima transcriptasa inversa que evitan que se realice la conversión del genoma del virus de ARN (+) a ADN.

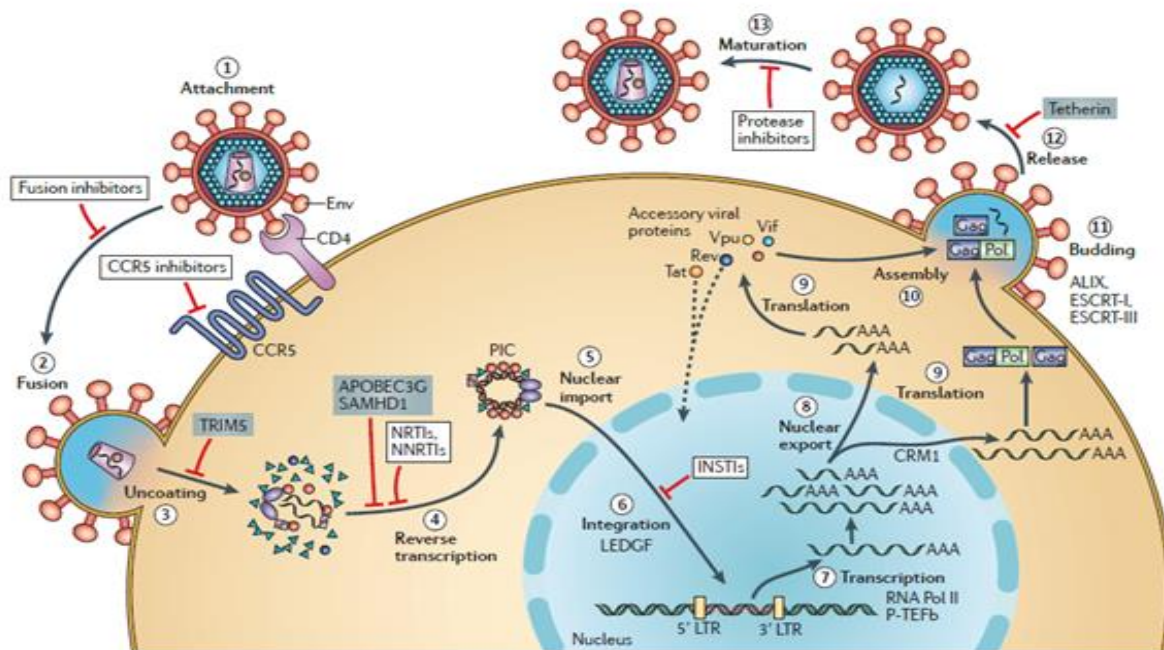


Figura 2. Esquema que muestra los sitios de inhibición del ciclo de vida del VIH-1 por los medicamentos que se utilizan en la terapia antirretroviral durante el ciclo replicativo del virus (tomado de Engelman & Cherapov, 2012)

La velocidad de replicación del VIH-1, los errores que se cometen durante la transcripción inversa y la falta de actividad de corrección de errores de la TI causan que el genoma del virus pueda acumular suficientes mutaciones que pueden promover la aparición de variantes del virus que son resistentes a los fármacos utilizados en los tratamientos (Sarafianos J. G., 2009, Rainer *et al.* 2016, Engelman & Cherapov, 2012).

Durante el tratamiento antirretroviral se generan reservorios virales en células como los linfocitos T CD4+ de memoria, células T foliculares ayudadoras y células dendríticas que tienen el virus integrado en su genoma (pro-virus) pero que no llevan a cabo la transcripción de las proteínas virales. Los reservorios se generan en sitios como la mucosa gastrointestinal, el sistema nervioso central, nódulos linfáticos y el tracto genital, es en estos órganos ocurre una replicación persistente del virus aun cuando el paciente lleva tratamiento antirretroviral. La falta de un tratamiento que elimine al pro-virus y el hecho de que los medicamentos no llegan a todos los órganos en las concentraciones necesarias para ejercer una inhibición eficiente de la replicación viral provoca que en pacientes con tratamiento puedan surgir estas variantes resistentes que pueden continuar replicándose (García M. *et a.* 2018). Por estos motivos los reservorios virales son la principal causa de que el virus no pueda ser erradicado del organismo.

Los fármacos tienen un tiempo de vida antes que el organismo los deseche mediante el ciclo de la urea; se ha establecido que es crucial la biodisponibilidad de los fármacos para tener un tratamiento óptimo por lo que se debe considerar su afinidad por los transportadores de fármacos. La familia de los transportadores de membrana dependientes de ATP (ATP-Binding Cassette) como la glicoproteína P que tiene actividad de bomba al expulsar fármacos del interior de la célula. Almond *et al.*, en 2005 y Vasilis *et al.*, en 2009 demostraron que a mayor expresión de glicoproteína P en linfocitos tratados con antirretrovirales no nucleósidos, por ejemplo, la nevirapina. La concentración intracelular en linfocitos de nevirapina es significativamente menor en comparación con en linfocitos donde se inhibe la expresión de esta proteína. Por lo que estos mecanismos celulares pueden ser en parte responsables influyen en la aparición de variantes de variantes del virus que son resistentes a los inhibidores actualmente usados en la TARGA y la interacción con este tipo de proteína es un factor para considerar para el desarrollo de nuevos fármacos.

2.2.1 Transcriptasa Inversa (TI)

La enzima transcriptasa inversa del virus VIH es una proteína heterodímerica que consta de las subunidades p66 (560 aminoácidos) en la que se encuentra el sitio catalítico donde se lleva a cabo la polimerización de la cadena de ADN, y también otro sitio con actividad de ARNasa H (degradación de ARN). La transcriptasa inversa contiene también una subunidad p51 (440 aminoácidos) que tiene una función estructural. (De Béthune, M.P., 2010).

El proceso de transcripción inversa de la enzima consiste en formación de una molécula de ADN de doble cadena a partir de dos copias del genoma viral de ARN (+), esto se lleva a cabo en el citoplasma después de que se ha formado el complejo de pre-integración.

La reacción de transcripción inversa inicia cuando el iniciador ARN_t_{3Lys} se une a una de las dos copias de ARN dentro de la cápside, la reacción de polimerización incorpora la secuencia de ADN complementaria a la cadena del ARN; mientras la ARNasa H hidroliza la cadena molde de ARN. Debido a la poca procesividad de la transcriptasa inversa (capacidad de polimerizar de manera continua una cantidad determinada de nucleótidos) esta se desacopla y continua la polimerización utilizando la otra copia de ARN presente en la cápside, finalmente el ARN es degradado y se termina de polimerizar la molécula de ADN (Sarafianos J. G., 2009; De Béthune, M.P., 2010).

Durante la transcripción inversa ocurren mutaciones en la secuencia de ADN, estos cambios en la secuencia pueden generar cambios de los aminoácidos que conforman la estructura de las proteínas virales. Debido a que la TI carece de la capacidad de corrección de errores se estima que comete 1 error cada 1000 nucleótidos que inserta en la cadena naciente de ADN, esto lleva a que dentro de una población se puedan detectar diferentes variantes del virus; incluso dentro de un mismo paciente la diversidad de secuencias del virus puede llegar ser elevada.

2.2.2. Inhibidores No Nucleósidos de la Transcriptasa Inversa (INNTI) y efecto de mutaciones en el sitio de unión

Los INNTI son un grupo de inhibidores heterogéneos en su estructura química, los cuales llevan a cabo una actividad inhibitoria cuando se unen a un sitio alostérico a 10 Å de distancia del sitio activo denominado sitio de unión de INNTIs dentro de la subunidad p66 de la transcriptasa inversa. La forma que adquiere el fármaco dentro del sitio alostérico al interaccionar con los aminoácidos del sitio de unión recuerda la forma de una “mariposa” con “alas hidrofóbicas”, este sitio tiene un ambiente hidrofóbico marcado por la presencia de aminoácidos aromáticos (Y181, Y188, F227, W229 y Y232), hidrofóbicos (P59, L100, V106, V179, L234 y P236) e hidrofílicos (K101, K103, S105, D132 y E224), y dos aminoácidos de la subunidad p51 (I135 y E138) (Kohlstaedt *et al.*,1992).

La unión de los INNTI induce un cambio conformacional que cambia la posición de los aminoácidos Y181 y Y188 hacia el sitio activo produciendo un cambio conformacional en el sitio activo por el movimiento de 2 Å de las cadenas de aminoácidos y los tres residuos de ácido aspártico que se utilizan en la reacción de polimerización del ADN. Son estos cambios los que se han propuesto como el mecanismo de inhibición de los INNTI. La forma de interaccionar con el sitio alostérico y la forma que este adopta por la interacción con el inhibidor no varían de manera significativa, aunque sean moléculas con estructuras muy diferentes (Hsiou *et al.* 1996, De Béthune, M.P., 2010, Das; K. *et al.*, 2012).

Las mutaciones que originan cambios en los aminoácidos en el sitio alostérico donde se unen los INNTI pueden causar que los fármacos no lleguen a realizar su efecto inhibitorio. Y188C, Y181C, K103N y L100I se han identificado como las mutaciones responsables de generar resistencia a los INNTI (Zhan *et al.* 2013) debido a que los inhibidores ya no pueden interaccionar de manera correcta con los aminoácidos con lo que interaccionan para ejercer su efecto, por esto pierden la capacidad de modificar la conformación del sitio alostérico en la TI.

2.2.3. Diseño de nuevos INNTIs

El descubrimiento de compuestos líderes es esencial para el diseño de nuevos fármacos, actualmente existen aproximaciones para el descubrimiento de compuestos líderes como el diseño *de novo* y el escaneo de bases de moléculas de alto rendimiento (HTS, por sus siglas en inglés); este último combina ensayos enzimáticos de transcripción inversa y modelos celulares de infección con VIH-1.

Es a partir de esta metodología que se han descubierto nuevas moléculas con potencial antirretroviral como benzofenona, sulfanil triazol, sulfonil tetrazol, oxindol, benzotiofeno tricíclico, N-aril pirrolidinona y el tiazolideno benzeno-sulfonamida. También existen aproximaciones para el descubrimiento de nuevos compuestos a partir de productos naturales, como los flavonoides, cumarinas, terpenos, taninos, alcaloides, polisacáridos y quinonas (Zhan *et al* 2013).

La metodología más utilizada para la identificación de moléculas líder es el escaneo virtual, el cual se basa en el acoplamiento molecular *in silico* para elaborar modelos que “predicen” cómo interactúan dos moléculas. Esto permite evaluar bibliotecas de más 70,000 compuestos sin llevar a cabo experimentos, generando modelos de interacción de compuestos pequeños con las proteínas de interés (Zhan *et al* 2013).

2.2.4. Optimización de INNTIs por química computacional

Existen herramientas computacionales que permiten modificar estructuralmente a los INNTIs, con la finalidad de generar análogos de estas moléculas que pudieran ser más efectivos y menos tóxicos. La metodología denominada relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR, por sus siglas en inglés) se basa en la creación de modelos que predicen la actividad biológica de compuestos nuevos o a partir de información experimental de la actividad biológica de una familia de compuestos de interés se puede hacer un análisis de su actividad. Esto permite

direccionar la optimización de las moléculas para realizar cambios estructurales que podrían hacer más eficiente la actividad de inhibición al quitar o adicionar ciertos grupos funcionales a la estructura de la molécula (Wang *et al.* 2015, Zhan *et al.* 2013).

La flexibilidad del sitio de unión de los INNTis en la TI es lo que ha permitido encontrar una gran diversidad de estructuras químicas con efectos inhibidores. Todos los inhibidores se unen a la enzima en una conformación similar lo que facilita descubrir nuevas moléculas con potencial terapéutico y optimizar las moléculas con función inhibitoria ya existentes. Las herramientas computacionales aquí mencionadas se emplean actualmente para identificar y diseñar nuevas moléculas con actividad inhibitorias contra variantes silvestres y resistentes del virus (Zhan *et al.* 2013, Medina-Franco *et al.* 2005).

3. ANTECEDENTES

Ante la falta de una vacuna efectiva que prevenga la infección del VIH-1, se debe continuar con el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad (Walker, B. D., & Burton, D. R., 2008). El uso de herramientas computacionales como el acoplamiento molecular, la relación estructura actividad y la relación estructura actividad cuantitativa en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos es una estrategia que tiene la finalidad de diseñar y optimizar moléculas con potencial terapéutico de una manera rápida y eficiente, lo que permite reducir los costos de síntesis y pruebas biológicas de miles de compuestos.

Otra utilidad de las herramientas computacionales anteriormente mencionadas es que permite explicar mecanismos de acción de fármacos actuales que están dirigidos contra la TI. A partir de la información adquirida en estos estudios informáticos se busca desarrollar medicamentos con una mejor actividad inhibitoria, que tengan una baja toxicidad y que inhiban a variantes de los virus resistentes a los fármacos actuales (Zhan *et al.* 2013, Medina-Franco, *et al.* 2004).

Las piridinonas fueron inicialmente descubiertas por Merck en 1991 como nuevos candidatos a INNTIs a partir del análisis de la revisión de una base de moléculas (Nunberg J. H. *et al.* 1991), algunas de ellas llegaron a pruebas clínicas. Sin embargo, la aparición de variantes resistentes hizo que se suspendieran su desarrollo. En la actualidad el trabajo con este tipo de moléculas se ha retomado para desarrollo de análogos que sean efectivos contra variantes resistentes.

En 2004 Medina-Franco y colaboradores hicieron un análisis de acoplamiento molecular de piridinonas de Merck como la L-967, 661 y análogos de piridinonas diseñadas por ellos; en este estudio también analizaron híbridos de piridinonas, y otros INNTIs de primera y segunda generación como la nevirapina y el efavirenz. Las piridinonas analizadas en este artículo habían tenido buenos resultados contra variantes silvestres del virus en pruebas biológicas, pero perdieron capacidad inhibitoria contra variantes con mutaciones de aminoácidos en el sitio de unión de los INNTIs. En este trabajo los autores determinaron que las piridinonas y sus derivados tienen un mecanismo de inhibición de la transcriptasa inversa similar a la Nevirapina, el

denominado modelo “mariposa”; también se determinó que las piridinonas iniciales y otros análogos de ellas interactúan en el sitio alostérico por un anillo de benzoxazol con aminoácidos (Y181 y Y188). (Medina-Franco *et al.* 2004)

Las mutaciones que generan cambio en estos aminoácidos durante la transcripción inversa son reconocidos como principales causantes de la aparición de la resistencia a este tipo de inhibidores. Se encontró que el INNTI de segunda generación UC-781 presenta un grupo (3-metilbut-2-enil) oxy en lugar de un grupo aromático, lo que provoca que se generen menor número de interacciones con el aminoácido Tyr181. A partir de este resultado se teorizó que la sustitución del grupo aromático por un grupo (3-metilbut-2-enil) oxy podría tener actividad contra variantes del virus con la mutación Y181C. Se propusieron a partir de estos resultados estructuras híbridas piridinona/UC-781 con potencial inhibitorio contra variantes resistentes del VIH-1. (Medina-Franco *et al.* 2004)

Posteriormente con la metodología QSAR Medina-Franco y colaboradores en 2005 utilizaron la información de acoplamiento molecular de inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa como el nevirapina e híbridos piridinonas-UC-781 para buscar en bases de datos del Instituto Nacional de Cancerología de los Estados Unidos moléculas que de acuerdo con el modelo tendrían una actividad inhibitoria contra la TI. Las moléculas que se identificaron en el fueron del tipo pirazo [3, 4-d] pirimidinas, a estas moléculas se les realizó un análisis de acoplamiento molecular contra la TI que permitió obtener un modelo del mecanismo de unión de estas moléculas el cual predice que posiblemente se unen como lo hacen otros INNTIs (Medina-Franco *et al.* 2005)

De los resultados obtenidos por los análisis informáticos se concluyó que dos sustituciones en diferentes carbonos de las moléculas podrían mejorar su actividad inhibitoria contra la TI y que la incorporación de un grupo metilo en los carbonos 4 y 7 son modificaciones que harían a los compuestos más inhibitorios. También se estableció que estas moléculas interactúan con el aminoácido Y181, aunque esta interacción no es relevante como en otros INNTIs. Esto sería

importante para el futuro diseño de nuevas moléculas con actividad inhibitoria contra la TI. (Medina-Franco *et al.* 2005)

En 2007 Medina-Franco y colaboradores utilizando acoplamiento molecular y QSAR diseñaron moléculas híbridas piridinonas-UC 781, estos compuestos contienen en su estructura sustituyentes alifáticos en el carbono 4 y sustituyentes polares en el carbono 3. También se diseñaron compuestos híbridos quinolona/UC-781 con sustituyentes insaturados en el carbono 4 y un grupo polar en el carbono 3; los modelos computacionales predicen la posible interacción entre estos compuestos y la enzima TI. A partir de estos análisis sintetizaron diferentes compuestos híbridos como la piridinona-UC-781 y la Quinolona-UC-781 (figura 3) (Cabrera *et al.* 2018., Medina-Franco *et al.* 2007., Vite Caritino H. *et al.* 2016).

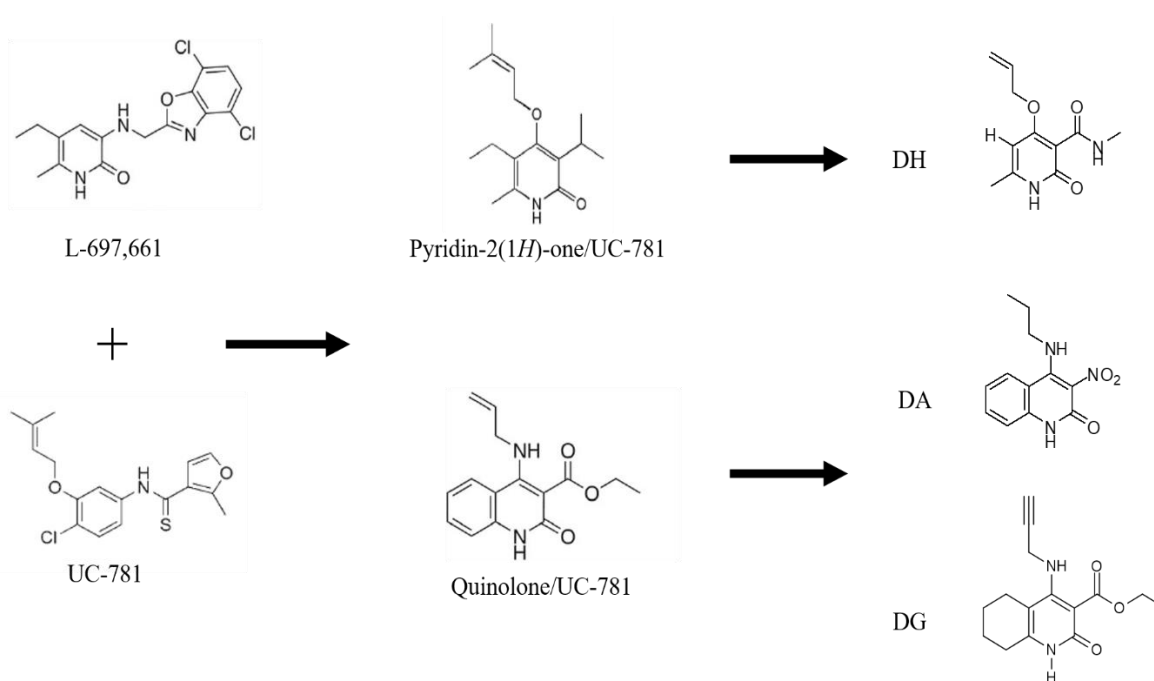


Figura 3. Ruta de diseño de nuevas moléculas híbridas piridinona/UC781 evaluadas en este proyecto.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La falta de corrección de errores de la enzima transcriptasa inversa durante la conversión de ARN a ADN y los procesos de selección que se ejerce en los pacientes que reciben tratamientos antirretrovirales originan en parte la aparición de variantes resistentes a medicamentos de primera línea promoviendo el aumento de casos de falla en el tratamiento antirretroviral. Además, existe un aumento de nuevas infecciones con cepas resistentes lo que dificulta el tratamiento inicial. Esta situación ha motivado que exista la necesidad continua de encontrar nuevos inhibidores de las proteínas virales, priorizando aquellos que sean efectivos contra variantes resistentes del virus. Se estima que cerca entre el 8-14 % de personas infectadas desarrollan resistencia a los INNTI durante el tratamiento antirretroviral (Snedecor, S. J. *et al.* 2014., Watera C. *et al.* 2021., Sterrantino, G. *et al.* 2019)

Este trabajo evaluó los compuestos híbridos piridinona-UC-781 y Quinolona-UC-781 diseñados por los Dres. José Luis Medina Franco de la Facultad de Química de la UNAM y Daniel Chávez del Instituto Tecnológico de Tijuana, sobre la actividad de la transcriptasa inversa y la replicación viral. Las estructuras de estas moléculas se proponen con base a estudios de relación estructura-actividad, los cuales predicen que estas moléculas podrían poseer actividad de inhibición de la enzima transcriptasa inversa del virus. En caso de encontrar algún compuesto activo, se elaborarán modelo *in silico* que buscará determinar la forma de interacción del compuesto con el sitio alostérico de la enzima.

Las pruebas de estos compuestos se realizaron en un ensayo de transcripción inversa del VIH-1 y sobre la infección *in vitro* de una línea celular reportera derivada de linfoma (JLTRG) la cual expresa la proteína fluorescente EGFP cuando están infectadas por el VIH-1. Esto permite determinar el efecto de compuestos sobre la replicación viral por citometría de flujo (Ochsenbauer-Jambor *et al.* 2006). Por otra parte, se evalúa la citotoxicidad de los compuestos mediante un ensayo de viabilidad celular basado en la transformación en sales de formazan por la actividad mitocondrial de las células.

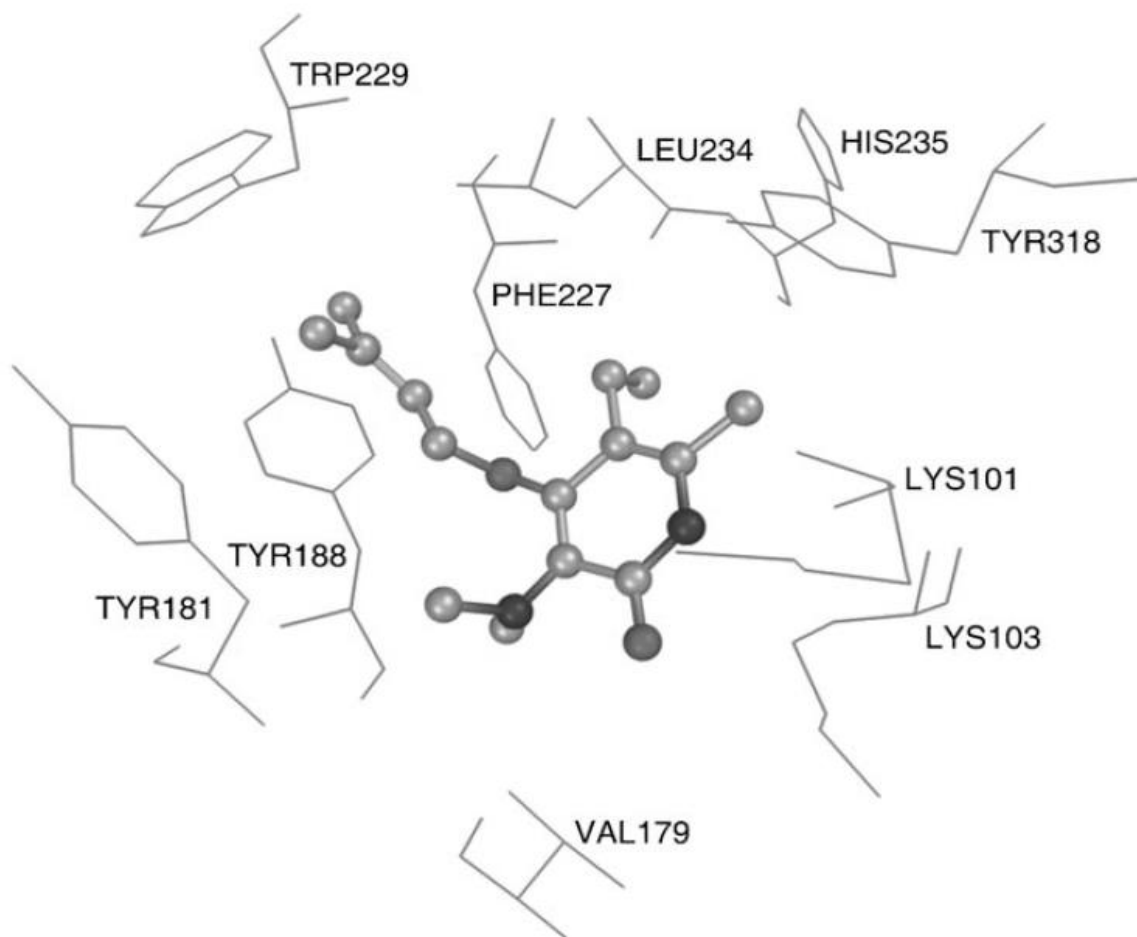


Figura 4. Modelo de unión de una molécula híbrida piridinona-UC781, retomado de Medina-Franco et al. 2007.

5. HIPÓTESIS

Análisis *in silico* indican que compuestos de tipo piridinona-UC-781 y Quinolona-UC-781 pueden acoplarse al sitio de inhibición alostérico de la enzima transcriptasa inversa del VIH-1, por lo que tienen la capacidad de inhibir la actividad de la enzima y la replicación del virus *in vitro*.

6.OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto inhibitorio de los compuestos en la actividad de la enzima transcriptasa inversa, sobre la replicación del virus en una línea celular reportera de linfocitos T CD4+.

6.1. Objetivos Particulares

1. Evaluar el efecto inhibitorio de los compuestos sobre la actividad de la enzima transcriptasa inversa del VIH-1.
2. Evaluar la capacidad de los compuestos para disminuir la replicación del VIH-1 en la línea celular linfocitaria humana Jurkat.
3. Analizar la citotoxicidad de los compuestos en células Jurkat.

7. METODOLOGÍA

7.1. Ensayo de inhibición de la actividad de la enzima transcriptasa reversa del VIH-1.

Los ensayos de inhibición de la enzima transcriptasa reversa fueron realizados en cajas de cultivo celular de 96 pozos utilizando el kit EnzChek® Reverse Transcriptase Assay (invitrogen, EUA) según el manual de usuario. En un microtubo se alinearon los oligos dT y poly A₁₈ durante 1 hora se colocó 10 µl de la mezcla de oligonucleótidos alineados en cada pozo, después se adicionaron los compuestos a concentraciones de 100, 40, 4, 1, 0.5 y 0.1 µM para posteriormente agregar 0.625 unidades de una enzima transcriptasa inversa recombinante (Merck, Alemania) diluida en buffer diluyente de la enzima (50mM Tris-HCl (pH 8.3, 25°C), 75mM KCl, 3mM MgCl₂ y 10mM DTT).

En el diseño experimental se incluyó un control negativo que contiene todos los elementos necesarios para la reacción menos la transcriptasa inversa y un control positivo que

contiene todos los componentes sin ningún fármaco y un control de inhibición con fármacos de referencia (Efavirenz, Nevirapina); la reacción se llevó a cabo durante 45 minutos y se detuvo adicionando 200 mM de EDTA. Posteriormente se adicionó al pozo 173 μ L de solución picogreen, que es un colorante que se intercala específicamente al hetero-dúplex de ARN-ADN o ADN el cual se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, la medición de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro (BioTek, EUA), las muestras se excitaron a 485 nm y se realizó la medición en 520 nm.

7.2. Virus

Las infecciones se realizaron con la cepa del VIH-1(IIB), esta cepa proviene de sangre periférica o médula espinal de pacientes con SIDA. Esta cepa viral tiene una alta capacidad de replicarse en líneas celulares de linfocitos T, utiliza como correceptor de la infección a CXCR4 por lo que pertenecen al tipo X4 (Popovic et al., 1984; Ratner *et al.* 1985). La cepa IIB fue donada por el NIH AIDS a través del Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH en los Estados Unidos, esta cepa fue desarrollada por el laboratorio de Robert Gallo.

Para estandarizar un protocolo de infección con el VIH-1, se probaron diferentes títulos de sobrenadante viral, así como diferentes tiempos de infección; se determinó que para observar un efecto de nuestros compuestos la infección de 48h era la mejor opción para observar un solo ciclo de replicación viral utilizando una Multiplicidad de la infección (MOI) de 0.1 (Cetina, 2013, Ruelas, 2015).

7.3. Línea celular

La línea celular ocupada en estos ensayos fueron las Jurkat LTR-GFP (JLTRG) de Olaf Kutsch donadas por el *NIH AIDS Reagent Program* (EU) las cuales son derivadas de la línea celular Jurkat (linfocitos T inmortalizados obtenidos de un paciente con leucemia); estas células fueron transfectadas con el plásmido pLTRGFP, el cual les permite expresar la proteína EGFP, este constructo se encuentra bajo el control del LTR del VIH-1, cuando la proteína viral Tat se expresa por la infección del virus, esta lleva a la polimerasa para también transcribir el mensajero de la proteína verde fluorescente (Kutsch *et al.* 2004).

Se ha demostrado que estas células son un modelo apropiado para la exploración de la actividad inhibitoria de nuevos compuestos contra la infección por el VIH-1, como demostró Ochsenbauer-jambor y colaboradores en el 2006, ya que tienen altos niveles de expresión del correceptor CXCR4 y la baja inespecificidad de la señal de la EGFP, hacen posible la evaluación de fármacos utilizando ensayos de inhibición de la replicación viral (IC50) de los compuestos en células JLTRG infectadas con VIH-1 (EGFP+) y su detección por citometría de flujo (Ochsenbauer-jambor *et al.* 2006)

Los ensayos de inhibición de la replicación viral se llevaron a cabo sembrando células JLTRG por duplicado en cajas de cultivo celular de 96 pozos a una densidad de 156,230 células/cm² en cada pozo, se añadieron inmediatamente después los compuestos en concentraciones de 100, 40, 4, 1, .05, .01 μM y se co-incubaron durante 1 hora. Posteriormente se añadió el sobrenadante con virus suspendido en medio RPMI 1X con 10% de suero fetal bovino para obtener una concentración necesaria para obtener una MOI de 0.1; los cultivos se mantuvieron en incubación con los compuestos y el virus a 37°C, 5% de CO₂ y 95% aire atmosférico durante 48 horas.

Las muestras fueron colectadas en microtubos donde se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 30 minutos a 4°C, después se realizaron dos lavados con PBS 1X. El porcentaje de células fluorescentes que expresan la proteína EGFP, se midió en por citometría de flujo utilizando el citómetro Attune Azul/Violeta (Thermo Fisher, EUA) utilizando el láser azul (488 nm), la proteína EGFP emite a 520 nm, utilizando el detector BL1 se detectó el porcentaje de células EGFP positivas.

7.4. Ensayo de viabilidad por MTT

Los ensayos de citotoxicidad fueron realizados en placas de cultivo celular de 96 pozos donde se sembraron 156,230 células/cm² de células JTLRG por triplicado, se les adicionó los compuestos a concentraciones de 100, 40, 4, 1, 0.05, 0.01 μM durante 48 horas. Posteriormente se realizó la prueba de viabilidad utilizando el kit CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay de Promega (Madison, EUA) el cual es una modificación del ensayo original propuesto por Monsman en 1983.

El ensayo se basa en la obtención de valores de densidad óptica proporcionada por la cantidad de cristales de formazan que se formaron a partir del compuesto MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl bromida de tetrazolium el cual es adicionado a los pozos experimentales durante 4 horas a 37°C, 5% CO₂/95% aire atmosférico. Durante el periodo de incubación las mitocondrias de las células que esta vivas metabolizan el MTT y forman los cristales de formazan, estos cristales se disolvieron en el medio cultivo presente en el pozo al adicionar 100 μL de una solución de paro (Tris HCL 0.01N, 10% SDS) como sugiere el fabricante. La absorbancia se midió a 570 nm utilizando el lector de placa iMarck de Bio-Rad (EUA).

7.5 Determinación de IC₅₀ y CC₅₀

La determinación de IC₅₀ y CC₅₀ se realizó en el programa Graphpad Prism versión 6.0. Se realizó una regresión no lineal de los datos obtenidos al realizar una curva dosis respuesta de cada compuesto. Los datos fueron normalizados con respecto al control positivo (Células infectadas con VIH-1 sin tratamiento).

8.RESULTADOS

Para investigar si los compuestos derivados de piridinonas pueden ser candidatos a moléculas que se utilicen para el desarrollo de nuevo inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa; analizamos 26 moléculas de las cuales se muestran los resultados resumidos en la tabla 1. Se evaluó el efecto inhibitor de la actividad enzimática de la TI utilizando dos modelos diferentes. El primero consistió en un ensayo de síntesis de ADN a partir de oligonucleótidos (Oligo dT y Poly A) que permite determinar si las moléculas inhiben a una transcriptasa inversa recombinante. Posteriormente en el segundo modelo se analizó si estas moléculas son capaces de inhibir la replicación de virus infecciosos en la línea celular linfocitaria Jurkat. Simultáneamente, se determinó el efecto citotóxico de los compuestos sobre la misma línea celular.

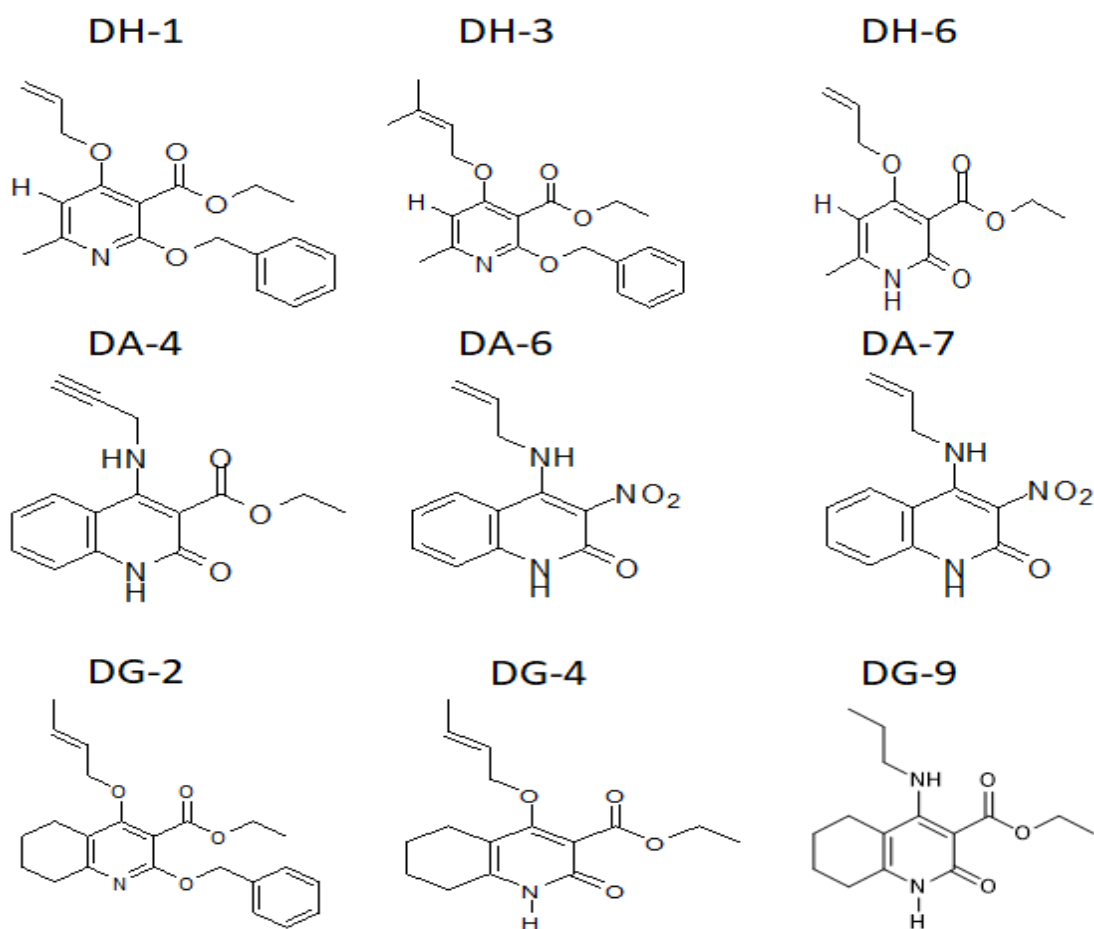


Figura 5. Ejemplos de las estructuras químicas de cada familia de compuestos.

8.1. Inhibición de la actividad de la transcriptasa inversa

Se analizaron 26 compuestos en el ensayo de transcripción inversa para identificar las moléculas que interaccionan con la enzima y que además tienen un efecto inhibitorio. Se realizó una curva de inhibición con 6 concentraciones en un rango entre 0.1 μM y 100 μM para determinar la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}), la cual nos permite conocer la concentración a la cual se inhibe a la mitad la actividad de la enzima; este parámetro es de los más usados en el desarrollo y descubrimiento de nuevos fármacos en biomedicina.

Para esta prueba se utilizó como control positivo de inhibición a los fármacos comerciales Nevirapina y Efavirenz, el efecto de estos fármacos sobre la actividad de la TI se muestra en la figura 6; el efecto de ambos fue evaluado por que son INNTI de primera línea en el tratamiento antirretroviral de nuevos pacientes. El efecto de los compuestos de las diferentes familias de piridinonas (DH, DA y DG) se muestra en la figura 7. El efecto para el resto de los compuestos se incluye en el apartado de graficas en la sección de anexo.

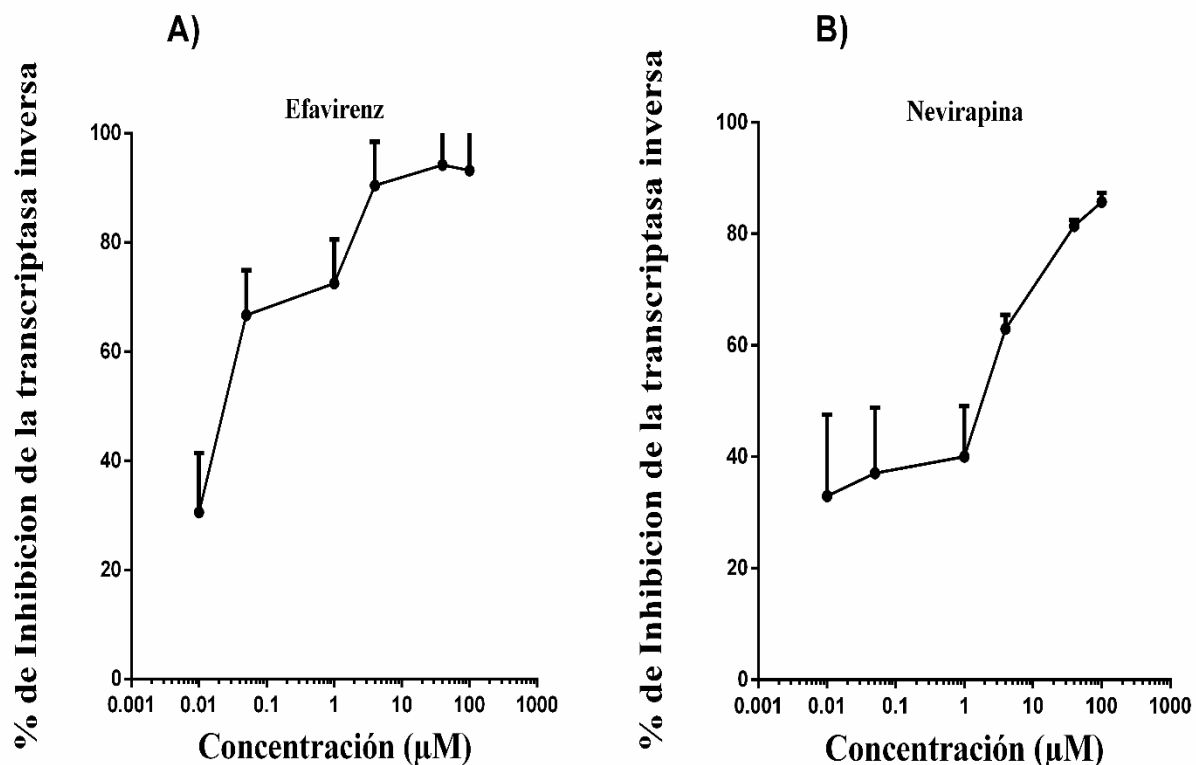


Figura 6. Efecto inhibitorio de los INNTI comerciales Nevirapina y Efavirenz en la actividad de la transcriptasa inversa. Porcentaje de inhibición de la transcriptasa inversa medido con el kit EnzChek® Reverse Transcriptase Assay. A, B) Efavirenz y Nevirapina inhiben de manera dependiente a la concentración del inhibidor. Los paneles A y B corresponden a los valores promedio de $n = 3$ en ensayos independientes, las barras de error representan la desviación estándar.

La evaluación de la inhibición de los compuestos mostró que la mayoría de los derivados de piridinona interactúan e inhiben en diferente medida a la transcriptasa inversa recombinante de VIH-1, entre todos los compuestos evaluados destaca el compuesto DG-9 el cual presentó un valor de IC_{50} de $39.8 \mu\text{M}$. El DG-9 es el compuesto que mostró mejor inhibición; mientras que con los resultados del resto de los compuestos no fue posible determinar el valor de IC_{50} en las concentraciones evaluadas.

Compuesto	IC ₅₀ vs TI (μM)	IC ₅₀ vs Infección (μM)	CC ₅₀ (μM)
DH-1	>100	31.16	X
DH-2	>100	>100	>100
DH-3	>100	>100	64.22
DH-4	>100	>100	35.88
DH-6	>100	>68.17	0.03
DH-8	>100	>100	>100
DH-10	>100	>100	>100
DH-13	>100	>100	>100
DH-14	>100	>100	>100
DA-1	>100	>100	>100
DA-4	>100	>100	>100
DA-3	>100	>100	>100
DA-5	>100	>100	>100
DA-6	>100	>100	>100
DA-7	>100	>100	>100
DA-8	>100	>100	>100
DA-11	>100	>100	>100
DA-12	>100	>100	>100
DG-2	>100	>100	60
DG-4	>100	71.42	69
DG-6	>100	>100	35
DG-7	>100	>100	>100
DG-8	>100	>100	>100
DG-9	69.81	28.78	>100
DG-10	>100	>3.86	0.02138
DG-11	>100	>100	>100

Tabla 1. Valores de IC₅₀ en los ensayos de inhibición de la actividad de la TI, de la replicación viral y CC₅₀ de las moléculas evaluadas.

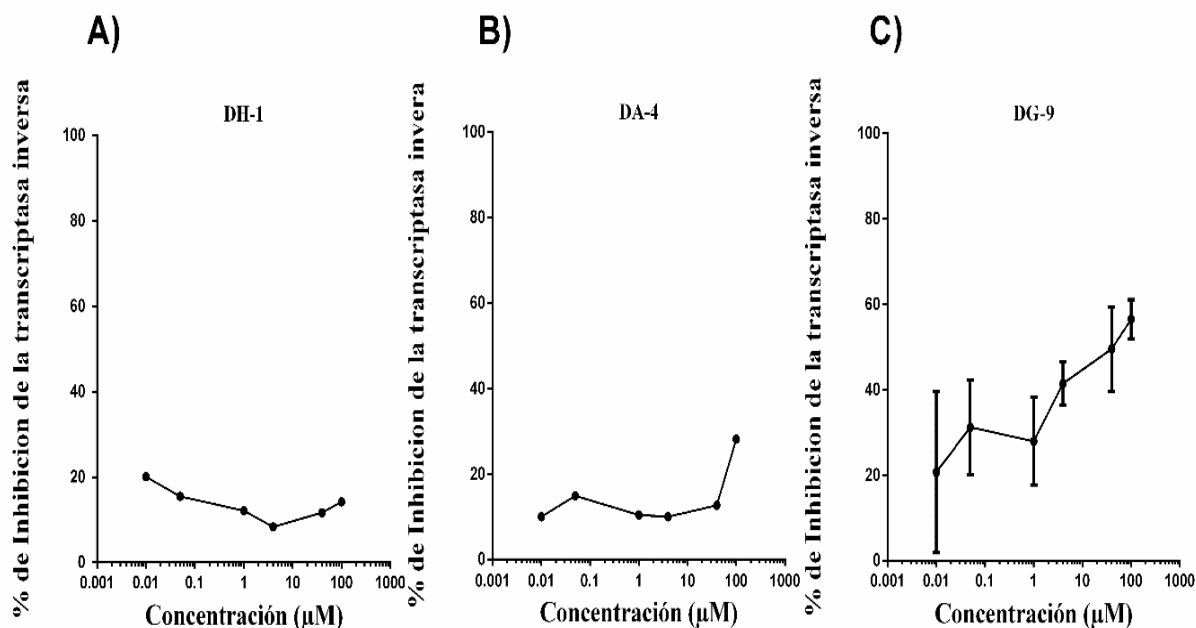


Figura 7. Efecto inhibitorio de la piridinonas DH-1, DA-4 y DG-9, en la actividad transcriptasa inversa. Porcentaje de inhibición de la transcriptasa inversa medido con el kit EnzChek® Reverse Transcriptase Assay. A, B) DH-1 y DA-4 no mostraron inhibición dependiente de la concentración del fármaco. C) DG-9 presentó una tendencia de inhibición dependiente de concentración. Los paneles (A) y (B) corresponden a un ensayo experimental. Los círculos indican medidas independientes. Los puntos en (C) representan valores promedio de $n = 3$ ensayos independientes, las barras de error indican desviación estándar.

Posteriormente se analizó si los compuestos tenían un efecto inhibitorio en un modelo de infección *in vitro*, para este ensayo se utilizó la línea celular reportera JLTRG, de origen linfocitario, la cual expresa EGFP cuando son infectadas con VIH-1 (figura 8).

Para la evaluación de la inhibición de la infección se pre-incubaron las células con los compuestos durante una hora previo a la adición del virus al cultivo celular, se infectó el cultivo con la cepa VIH-1-IIIB; después de 48 horas se analizó la expresión de la proteína EGFP por citometría de flujo como se describe en la metodología, los resultados del efecto inhibitorio de los fármacos de referencia efavirenz y nevirapina se muestran en la figura 9. La evaluación del efecto inhibitorio y la actividad citotóxica de los compuestos sobre la viabilidad celular se evaluaron simultáneamente en ensayos separados. Ambos resultados se muestran en la figura 10.

Los resultados de los demás compuestos se muestran en las gráficas y en la tabla 1 de la sección de anexo.

La viabilidad celular se determinó utilizando las mismas concentraciones de compuestos y tiempos de incubación que se usaron para los estudios de inhibición de la replicación. Los resultados de ambos ensayos se muestran en las mismas figuras para cada compuesto. Se utilizó Nevirapina y Efavirenz como control positivo de inhibición y de viabilidad celular.

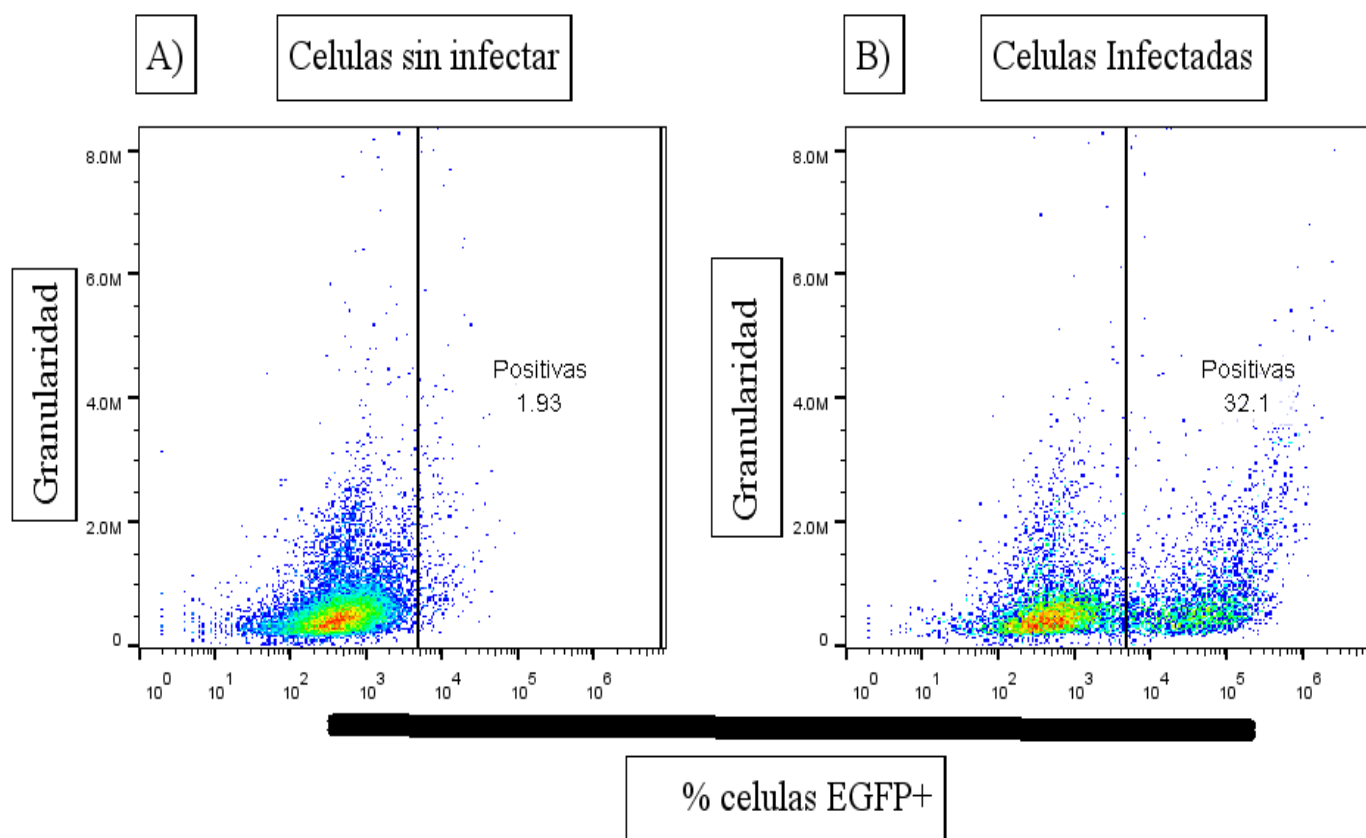


Figura 8. Porcentaje de células JLTRG que expresan EGFP al ser infectadas con la cepa IIB de VIH-1. Porcentaje de células JLTRG que expresan EGFP 48 horas post infección con la cepa IIB medido por citometría de flujo. A) Las células expuestas al virus mostraron un aumento en la expresión de EGFP. B) Las células no expuestas al virus, pero con mismas condiciones experimentales no muestran un aumento de la expresión de EGFP. Los paneles (A) y (B) corresponden a una lectura de 10000 células.

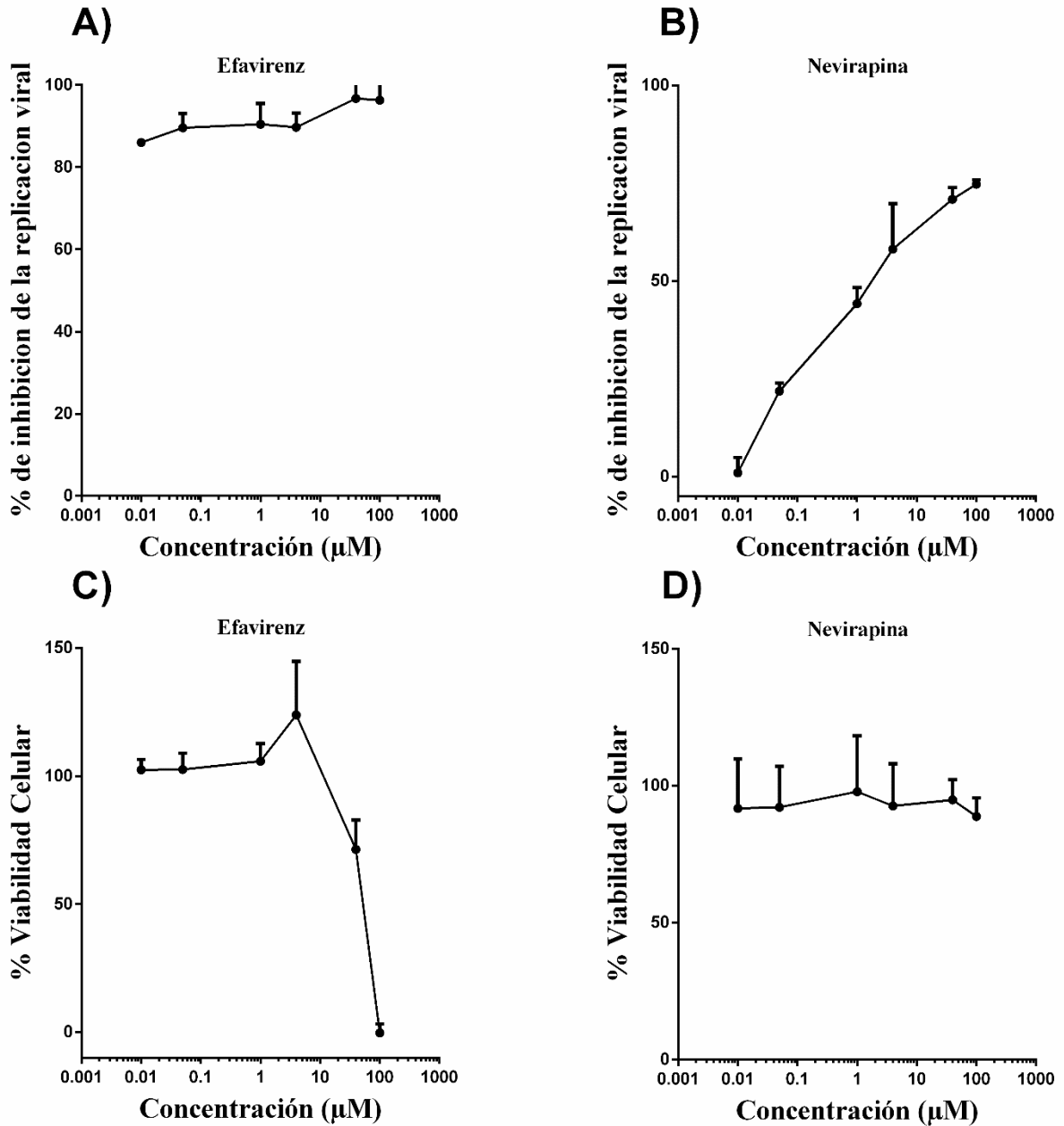


Figura 9. Efecto de inhibición de la replicación y de citotoxicidad de los INNTI comerciales efavirenz y nevirapina.

Porcentaje de células que expresan EGFP al ser infectadas con la cepa IIIB medido con citometría de flujo y porcentaje de citotoxicidad medido con el ensayo de MTT. A) Efavirenz mostró inhibición desde concentraciones nano molares y esta se mantuvo en todas concentraciones evaluadas. C) Efavirenz mostró baja citotoxicidad en concentraciones nanomolares, pero alta citotoxicidad arriba de 40 μM. B) Nevirapina mostró inhibición

dependiente de la concentración del fármaco. D) Nevirapina no generó disminución de la viabilidad celular. Todos los paneles corresponden al valor promedio de $n = 3$ ensayos independientes. Las barras de indican desviación estándar.

Para medir la capacidad de inhibir la replicación viral se determinó la IC_{50} en este modelo de infección *in vitro* utilizando los datos normalizados obtenidos del porcentaje de células positivas por citometría de flujo. Encontramos que la mayoría de los compuestos mostraron efecto inhibitorio de la replicación del virus en diferente medida, los compuestos con valores de IC_{50} más bajos fueron DG-9 (27.31 μM) y DG-4 (71.42 μM) y DH-1 (31.16 μM), encontramos que la mayoría de las moléculas pertenecientes al grupo DG muestran una capacidad inhibitoria mejor en comparación con las otras familias de moléculas evaluadas.

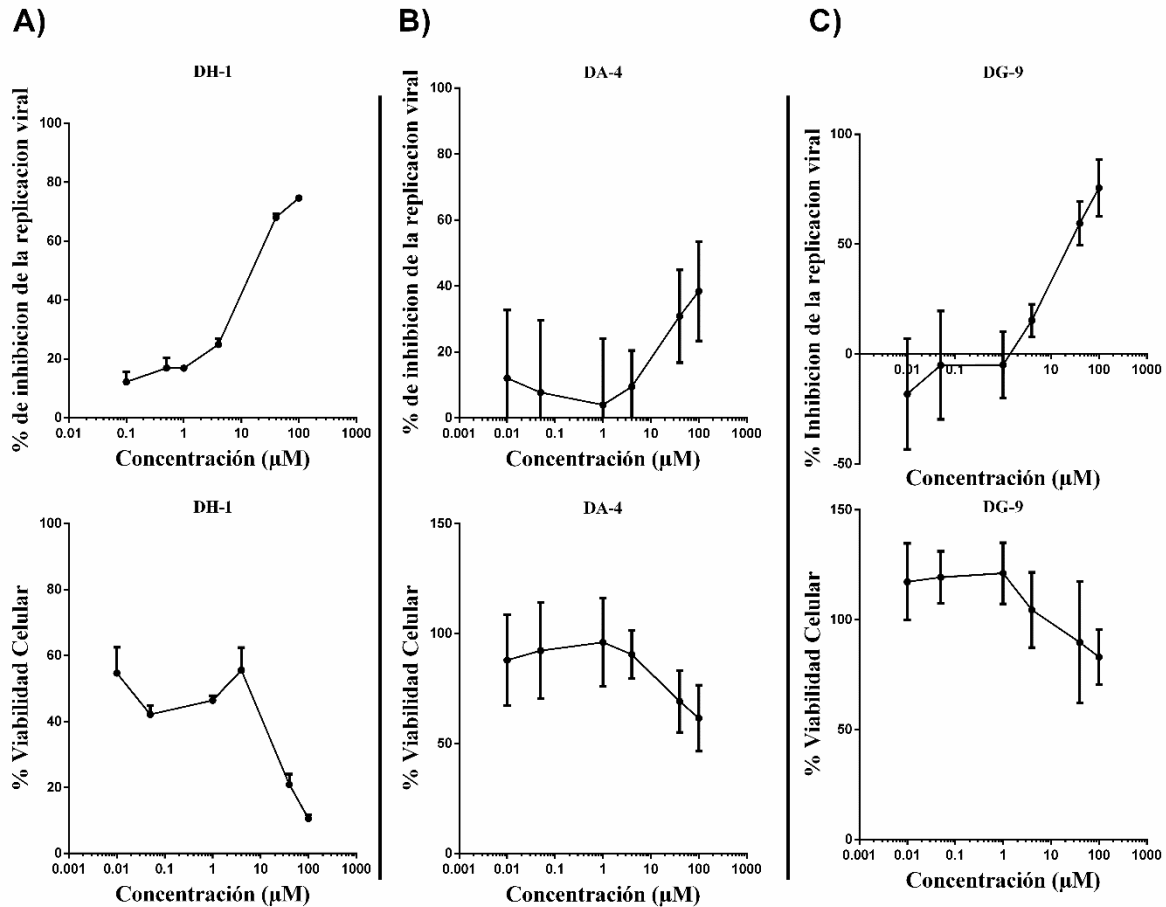


Figura 10. Efecto inhibitorio de las piridinonas de DH-1, DA-4 y DG-9 sobre la replicación viral de la cepa IIB en células JLTRG y su efecto citotóxico correspondiente. Porcentaje de células que expresan EGFP al ser infectadas con la cepa IIB medido con citometría de flujo y porcentaje de citotoxicidad medido con el ensayo de MTT. A), B) DH-1 y DA-4 presentaron una tendencia de inhibición dependiente de la concentración (graficas superiores), sin embargo, mostraron citotoxicidad correspondiente en las mismas concentraciones (graficas inferiores). C) DG-9 mostro una inhibición dependiente de la concentración (grafica superior) y una baja citotoxicidad (grafica inferior). El panel (A) corresponde a $n = 2$. Los puntos en (B) y (C) representan los valores promedio de $n = 3$ en ensayos independientes, las barras de error indican desviación estándar.

Posteriormente, para evaluar la citotoxicidad que pudieran generar estos compuestos sobre las células se utilizó el método de MTT para determinar la concentración citotóxica 50 (CC₅₀), la cual nos permite conocer la concentración a la cual una molécula reduce la viabilidad celular en un 50% comparado con el control. Encontramos que la mayoría de los compuestos evaluados muestran un cierto grado de toxicidad, principalmente en concentraciones micromolares; con excepción de algunos compuestos como el DG-9 el cual no pudimos determinar su CC₅₀ en las concentraciones evaluadas.

De todos los compuestos analizados el compuesto DG-9 inhibió la actividad de la transcriptasa inversa en concentraciones micromolares. Este compuesto también inhibió la infección celular *in vitro* y no mostró citotoxicidad a las mismas concentraciones.

9. DISCUSIÓN

El diseño de nuevos fármacos asistido por computadora de nuevos fármacos es actualmente la metodología más utilizada en el descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades incluidas las que son provocadas por las infecciones virales como la del VIH-1 o el ZIKA, infecciones con bacterias patógenas como tuberculosis o el desarrollo de fármacos anticancerígenos (*Phillips et al.* 2018).

El diseño asistido por computadora en donde se utiliza acoplamiento molecular y QSAR han generado fármacos contra la infección del VIH-1 que superaron todas las fases clínicas y que fueron aprobados para su comercialización como el caso del inhibidor de la integrasa Raltegravir y el inhibidor de la proteasa Saquinavir. En ambos casos se han podido identificar y desarrollar análogos de estos medicamentos, que tienen efecto sobre variantes resistentes contra el fármaco original (*Phillips et al.* 2018).

Las moléculas evaluadas en este trabajo fueron diseñadas a partir de un núcleo de piridin-2(1H)-ona con diversas modificaciones que dieron lugar a tres diferentes grupos de moléculas. El grupo de análogos DH son moléculas con núcleo de piridin-2(1H)-ona, tienen un grupo metilo en el carbono 6 y un grupo éster en el carbono 3. Además, cada molécula del grupo DH tiene diferentes sustituyentes en el carbono 4 (fig 3) (Reyes-Tapia, 2014) (Fig.3)

El grupo de análogos DA son moléculas con núcleo que originalmente era piridin-2 (1H)-ona al que se le adiciono un anillo benceno para formar un núcleo de quinolona (2-oxo-1,2-dihidroquinolona) (figura 3). El grupo DG son compuestos en donde al núcleo de piridin-2 (1H)-ona al cual se añadió un ciclohexino lo que produjo un cliclohexanpiridinona. La adición de un carbono en la posición 2 produce el núcleo 2-oxo-1,2,5,6,7,8-hexahidroquinolona (figura 3). Se hicieron modificaciones de todos los compuestos en los carbonos 3 y 4 (Reyes-Tapia, 2014, Rodríguez Vega, 2018 y 2014 y Cabrera, 2015).

El grupo DH tiene como característica el núcleo híbrido de piridinona-UC781. En su diseño se contempló la adición de un grupo alquiloxi o alqueniloxi en el carbono 4 y un grupo éster etílico como grupo polar en el carbono 3. El compuesto DH-14 difiere de los otros compuestos debido a que tiene un derivado de la urea en el carbono 3 (figura 5). En nuestra evaluación del efecto de estos compuestos contra la actividad de la TI encontramos que los compuestos DH inhiben la actividad de la enzima entre el 2-20 % comparada contra los valores del control de enzima sin inhibidor (Reyes-Tapia, 2014).

Encontramos que los derivados que contienen el grupo 4-(aliloxi) como sustituyente (DH-1, 6, 8, 13 y 14) y grupos carboxilato, carboxílico y 1,1-dietilurea en el carbono 3 tuvieron un efecto 8inhibitorio diferente en los ensayos de inhibición a los compuestos DH (2, 3, 4, 10) que poseen 4 (but-2-en-1-iloxi), 4 (3-metilbut-2-en-1-iloxi), 4-propiloxi o el grupo aliloxi modificado como el caso del DH-10 (4-(aliloxi)-N). Estos últimos compuestos incorporan carboxilato o carboxiamida (anexo 12.4). A continuación, se mencionan los diferentes efectos en las pruebas de inhibición y viabilidad de las moléculas del grupo DH.

- En la prueba de inhibición de la TI los compuestos DH que poseen el grupo aliloxi en la posición 4 (DH-1, 6, 8, 13 y 14) presentaron una inhibición entre el 18-40% (anexo 12.1), mientras que los compuestos que no lo tienen o lo tienen modificado presentan una inhibición entre el 7 y 57.7 %. El compuesto que presentó el porcentaje de inhibición más alto fue el DH-10, que tiene en la posición 4 al grupo 4-(aliloxi)-N, que es el mismo grupo 4-(aliloxi) pero modificado.
- En el modelo de infección celular *in vitro* el porcentaje de inhibición que presentan las moléculas DH se observó a la par de su efecto citotóxico, por lo cual la disminución de la replicación viral no se pudo atribuir a un efecto de los compuestos. esto es porque en algunos compuestos no fue posible medir la inhibición de la replicación en nuestro modelo de infección *in vitro* debido a que su efecto citotóxico fue muy elevado. Los compuestos con el sustituyente 4-(aliloxi), tuvieron inhibición de replicación viral en un rango de 0-73%, pero tuvieron valores similares de citotoxicidad. El único compuesto al que se le pudo determinar la IC₅₀ (31.6 µM) en el ensayo de infección *in vitro* fue el DH-1, pero resulto ser citotóxico en la misma concentración y magnitud que su inhibición. (figura 7)
- En el grupo DH los compuestos más citotóxicos son los que presentan el grupo 4-(aliloxi) (DH-1, 6, 8, 13 y 14) (anexo 12.1) comparados contra los que no lo tienen. Esto parece indicar que el grupo 4-(aliloxi) es el responsable de generar la citotoxicidad, esta se presenta independientemente de la presencia de otros sustituyentes en la molécula.
- El compuesto DH que tuvo mayor porcentaje de inhibición de la actividad enzimática fue el DH-3, este tiene el sustituyente 4 (3-metilbut-2-en-1-iloxi) y un grupo carboxamida en el carbono 3. Sin embargo, no encontramos un efecto inhibitorio del DH-3 en el modelo de infección *in vitro*. En cambio, los compuestos que si tuvieron efecto inhibitorio en este modelo presentan el grupo carboxilato en el carbono 3 (DH 1, 2, 3, 4, 6) (anexo 12.1).
- Los compuestos DH que poseen un grupo carboxamida en el carbono 3 no presentaron un efecto de inhibición en el modelo de infección *in vitro*. Incluso, los resultados de inhibición y de citotoxicidad del DH-13 parecen indicar que la combinación 3 carboxamida y 4 (aliloxi)

en la misma molécula DH podría ser la responsable de la citotoxicidad del compuesto. Esto porque DH-13 fue citotóxico, mientras que otros compuestos con la misma estructura, pero sin el grupo 4 (aliloxi) no presentaron los mismos niveles de citotoxicidad (DH 1, 2, 3, 4, 6).

Los resultados de la evaluación en los modelos de inhibición de la actividad enzimática de la RT, de la infección *in vitro* y de viabilidad por MTT para los compuestos DH, generaron información importante que servirá en una futura optimización. Las características más importantes para destacar son: 1) Estas moléculas tienen la capacidad de inhibir la actividad de la transcriptasa inversa. 2) El grupo 4-(aliloxi) parece ser importante para que la inhibición de la RT ocurra, pero también confiere una propiedad citotóxica a los compuestos). Los compuestos que tienen un grupo 3-carboxamida no inhiben la replicación en el modelo de infección *in vitro*. En el diseño de futuros compuestos con núcleo de piridin-2(1H)-ona se debería omitir el grupo carboxamida en el carbono 3. 4) Los compuestos con el grupo 4-(aliloxi) modificado, generan una menor citotoxicidad comparada con los compuestos con 4-(aliloxi) sin modificar, por lo que la modificación de este grupo serviría para optimizar estos compuestos para hacerlos menos citotóxicos y mejorar la inhibición.

El grupo de compuestos DA tiene como características el tener un núcleo de quinolona (2-oxo-1,2-dihidroquinolona) y diferentes sustituyentes en el carbono 3 con grupos carboxilato, nitroquinolin y quinolin-4-ilo, y en el carbono 4 con grupos 4-(ter-butilamina), 4-(propargilamino), 4-(propilamino), 4-(alilamina) y but-2-enoato de 2-oxo-1,2-dihidroquinolin (anexo 12.4). Los compuestos DA se pueden clasificar en tres grupos diferentes de acuerdo con su sustituyente en el carbono 3. Los compuestos DA 1, 3 y 4 tienen como característica tener un carboxilato, los DA 6 y 7 que tienen un grupo nitroquinolin y los DA 11 y 12 que tienen un grupo quinolin-4-ilo. El grupo de compuestos DA tiene la mayor variedad de sustituyentes en el carbono 4 comparado con los grupos DH y DG. Los compuestos DA tuvieron mayores porcentajes de inhibición y tuvieron menos citotoxicidad en comparación del grupo DH, pero aun así ninguno de los compuestos DA alcanzó una inhibición del 50% de la TI o la replicación viral en las concentraciones probadas.

- Todos los compuestos DA inhibieron en un porcentaje diferente la actividad de la TI en el ensayo de inhibición enzimática (anexo 12.2), esta diferencia parece estar relacionada a los diferentes grupos funcionales en el carbono 4, porque las moléculas que tienen sustituyente en el carbono 3 todas presentan inhibición. Los compuestos con 3-carboxilato (DA-1, DA-3 y DA-4) presentaron una inhibición en un rango del 14-28%. Particularmente, DA-1 mostró inhibición del 28% de la actividad de la TI a 1 μ M, aunque este nivel de inhibición no aumentó a concentraciones mayores. Lo que cambia entre estos tres compuestos es el sustituyente en el carbono 4.
- Los compuestos DA que presentan el grupo 3-nitroquinolin (DA-6 y DA-7) presentaron una inhibición de la actividad de la TI del 28 y 23 %, respectivamente a la concentración máxima de (100 μ M). Entre ambos compuestos la diferencia es el grupo funcional en el carbono 4. Los compuestos con 3-quinolin-4-ilo (DA-11 y DA-12) inhiben la actividad de la TI entre 14-33%, la estructura de ambas moléculas cambia solamente en el sustituyente en el carbono 4.
- Los compuestos DA-3 y DA-6 poseen el mismo grupo propilamino en la posición 4 de su estructura. Sin embargo, ambos compuestos inhiben la actividad de la transcriptasa inversa de manera diferente; el DA-3 inhibe 23% mientras que el DA-6 28% (anexo 12.2). La diferencia entre ambas moléculas es el grupo que se encuentra en el carbono 3, donde el DA-3 tiene un grupo carboxilato, y el DA-6 tiene un grupo nitroquinolin. Estos resultados indican que el determinante de que la molécula tenga actividad inhibitoria es el núcleo de quinolona y el sustituyente en el carbono 3, en cambio son las modificaciones en el carbono 4 el que aumenta o disminuye el efecto inhibitorio.
- Los compuestos DA con 3-carboxilato DA-1, DA-3 y DA-4 mostraron inhibición de la replicación viral en forma aparejada con su nivel de citotoxicidad, por lo que no se puede concluir que presentaron actividad antiviral (anexo 12.2). Los compuestos DA-1, DA-3 y DA-4 tienen diferentes sustituyentes en el carbono 4. El DA-4 incorpora un 4-(propargilamino) y es el que presentó menor citotoxicidad de entre los compuestos con 3-

carboxilato. Estos resultados refuerzan la idea de que lo importante es conservar el núcleo y el sustituyente en carbono 3 y hacer modificaciones a los sustituyentes en el carbono 4.

- Los compuestos con 3-nitroquinolin (DA-6 y DA-7) no mostraron inhibición de la replicación viral muestran porcentaje de inhibición del 28% para el DA-6 y 38% para el DA-7 en el ensayo de infección *in vitro*. Ambos compuestos solo se diferencian entre sí por el grupo que tienen en el carbono 4; siendo el 4-(propilamino) y la 4-(alilamina) respectivamente. El DA-6 tiene 4-(propilamino) igual que el DA-3; como mencionamos en el párrafo anterior el DA-3 presenta una citotoxicidad elevada, aunque ambas moléculas tienen casi la misma estructura; lo que cambia es la que en el carbono 3 hay un sustituyente diferente. Los resultados de inhibición y citotoxicidad sugieren que cuando el 4-(propilamino) está en presencia del 3-nitroquinolin, no solo no genera una citotoxicidad elevada como cuando está en presencia del 3 carboxilato, sino que presentan una inhibición parecida en los ensayos de inhibición de la TI y de la inhibición de la replicación viral.
- El diseño de moléculas que tengan como base de la estructura la combinación quinolona+nitroquinolin (DA-6, DA-7) es viable porque las moléculas que tienen esta combinación e inhiben moderadamente a la TI y su nivel de citotoxicidad es moderado. Se necesita encontrar el sustituyente en el carbono 4 que aumente la inhibición.
- El DA-11 y DA-12 son moléculas que tienen un grupo quinolin-4-ilo en el carbono 3 y produjeron una inhibición de entre el 14-33% contra la TI, aunque no mostraron actividad inhibitoria de la replicación del virus. Nuevamente la diferencia entre ambas moléculas es el grupo en el carbono 4. Estas moléculas no mostraron una citotoxicidad elevada, lo que indica que su estructura podría ser utilizada como base para la adición de sustituyentes con capacidad inhibitoria.

Los resultados muestran que los compuestos del grupo DA inhiben la transcripción inversa, aunque sin alcanzar el 50% de inhibición a las concentraciones probadas y no inhiben la replicación viral. Notablemente muestran una baja citotoxicidad en la mayoría de los casos.

En este grupo parece ser que el núcleo de quinolona independientemente del sustituyente en el carbono 3 y 4 produce una leve actividad inhibitoria de la TI (anexo 12.2)

Todos los compuestos DG inhiben moderadamente la actividad de la transcriptasa inversa y la replicación del virus con porcentajes de inhibición del 23 al 56 % contra la actividad de la TI y 26-79% de inhibición de la replicación viral, aunque con actividad citotóxica similar (a excepción de DG-9, que tuvo citotoxicidad moderada) Todos los compuestos DG el grupo carboxilato en el carbono 3 y se diferencian entre sí por tener grupos funcionales diferentes en el carbono 4, incluyendo los sustituyentes 4-(but-2-en-1-iloxi), 4-((3-metilbut-2-en-1-il) oxi), 4-(cianometoxi), 4-((4-metilpent-3-en-1-il) oxi), 4-(propilamino) y 4-(hexilamino) (anexo 12.4).

- Las moléculas DG-2 y DG-4 comparten el sustituyente 4-(but-2-en-1-iloxi). DG-4 presentó citotoxicidad moderada, mientras que DG-2 no presentó una alta citotoxicidad. Sin embargo, el compuesto DG-2 no tuvo una actividad inhibitoria consistente a las concentraciones probadas, mientras que DG-4 inhibió a la enzima de forma dependiente de la concentración hasta alcanzar un 40% de inhibición a 100 μ M. La diferencia entre ambas moléculas es el tipo de sustitución en el carbono 2. DG-4 tiene un grupo 2-oxo mientras que en el DG-2 tiene (E)-2-(benciloxi). Estas observaciones indican que la combinación de sustituyentes (4-(but-2-en-1-iloxi) y 2-oxo) favorecen la actividad inhibitoria de la TI en DG-4. Estos resultados indican que los compuestos DG presentan actividad inhibitoria sobre la TI. No fue posible evaluar su actividad sobre la replicación viral debido a su citotoxicidad. Independientemente de los sustituyentes en el carbono 3 y 4. Su combinación en realidad. Es lo que le otorga mayor o menor capacidad inhibitoria y determinan la citotoxicidad de la molécula.
- Los compuestos con núcleo de 2-oxo-1,2,5,6,7,8-hexahidroquinolona (DG 6, 7, 8, 9,10 y 11) y 3-carboxilato difieren en su estructura solamente en el sustituyente en el carbono 4. Todos estos compuestos inhiben la actividad de la TI a bajo nivel y de manera no consistente con la concentración. Por otro lado, la inhibición que muestran sobre la replicación viral va emparejada con su actividad citotóxica, por lo que no se puede atribuir a un efecto sobre el virus (anexo 12.3).

- Notablemente, se determinó una IC_{50} de $69 \mu\text{M}$ para el compuesto DG-9 en el ensayo de inhibición de la TI. En comparación, DG-4 inhibió el 37% de la actividad de la TI a esta concentración. Por otra parte, DG-9 tuvo una IC_{50} de $28.78 \mu\text{M}$ en el ensayo de inhibición de la replicación de viral. DG-9 además mostró una citotoxicidad baja en comparación con otras moléculas de este grupo, de modo que a la concentración inhibitoria del 50% de la replicación viral ($28.78 \mu\text{M}$) su citotoxicidad fue solo del 20%. Entre estos dos compuestos la única diferencia es el sustituyente en el carbono 4. El compuesto más citotóxico (DG-4), tiene un grupo 4-(but-2-en-1-iloxi) en esta posición, mientras que el DG-9 tiene un grupo 4-(propilamino). Por lo tanto, el núcleo de hidroquinolona confiere capacidad inhibitoria a las moléculas DG y depende del sustituyente en el carbono 4 que tan inhibitoria y citotóxica es la molécula.

10. CONCLUSIONES

En el presente trabajo los compuestos fueron evaluados en pruebas biológicas que nos permitieron determinar si las estructuras propuestas tienen actividad inhibitoria contra la transcriptasa inversa del VIH-1, su capacidad de inhibir la replicación del virus en células infectadas, y medir su efecto sobre la viabilidad celular (citotoxicidad).

Los resultados muestran que algunas de las estructuras propuestas inhiben a la transcriptasa inversa en menor o mayor proporción de los cuales solo el DA-6 y el DG-4 y DG-9 lo hacen de manera dependiente de la concentración. Es importante destacar que el DA-6 y DG-9 comparten el grupo 4-(propilamino), por lo que se debería poner especial atención a este sustituyente en la optimización de los compuestos. Sin embargo, el 4-(propilamino) también se encuentra en el DA-3, compuesto que no inhibió a la TI. La diferencia entre las moléculas es que tenemos el grupo 3-carboxilato en el DA-3 y DG4 y DG-9, mientras que el DA-6 tiene 3-nitroquinolin. El grupo funcional 4-(propilamino) ejerce un efecto inhibitorio dependiendo de los grupos funcionales que lo acompañen en el núcleo de quinolona.

Las moléculas DA-3 y DA-6 no inhiben la replicación viral, pero la primera molécula genera una citotoxicidad elevada mientras que la segunda no. El DG-9 si inhibe la replicación viral y no genera una citotoxicidad elevada. El 4-(propilamino) puede ser considerado como un sustituyente que puede otorgar a la molécula de la capacidad de inhibir la replicación del VIH-1 al afectar la función de la transcriptasa inversa sin generar citotoxicidad elevada, esto dependiendo de los grupos funcionales que lo acompañen.

En los grupos DH y DA encontramos que los compuestos DH-1, DH-2, DH-3, DH-4, DH-6, DH-8, DH-10, DH-13, DH-14, DA-1, DA-3, DA-4, DA-6, DA-7, DA-11, DA-12 interaccionan a la transcriptasa inversa, pero no generan inhibición y tampoco inhiben la replicación del virus. Estos compuestos pueden ser modificados estructuralmente para intentar disminuir su citotoxicidad y mejorar la inhibición de la enzima y de la replicación viral.

En los compuestos DH, se observó una relación entre la presencia del sustituyente 4-(aliloxi) y un efecto citotóxico sobre las células Jurkat, ya que los que carecen de este grupo en su mayoría no presentan una citotoxicidad elevada. La ausencia de este grupo no evita que los compuestos interaccionen con la TI.

En los compuestos DA se observa que existe una relación entre el sustituyente empleado en el carbono 4 y un efecto citotóxico en las células. Debido a que todos los miembros de este grupo pueden interaccionar con la TI, pero no inhibirla. El núcleo de quinolona parece ser el responsable de esta interacción, porque no importa el cambio de sustituyente en alguno de sus carbonos, la interacción se mantiene. El hecho de que se mantenga la interacción independientemente de grupo en el carbono 4, permitiría modificar estos sustituyentes por otros que pudieran ser menos citotóxicos.

Algunos compuestos que pertenecen al grupo DG presentaron inhibición de la TI y de la replicación viral (DG-9 y DG-4). Además, demostraron no tener una citotoxicidad elevada (DG-2, DG-4, DG-6, DG-7, DG-8, DG-9). De los compuestos del grupo DG casi todos presentan un grupo 3-carboxilato excepto el DG-2 el cual presenta un grupo (E)-2-(benciloxi). Lo único que cambia es el sustituyente en el carbono 4, por lo que la diferencia de la capacidad inhibitoria sería por la combinación del con el núcleo de quinolona. Un ejemplo de esto son los compuestos DG-9 y DG-10 con un grupo 4-(propilamino) y 4-(hexilamino), respectivamente. Ambas

moléculas tienen 3-carboxilato y casi la misma estructura, solo cambia el grupo del carbono 4. Sin embargo, el DG-9 inhibe a la TI y a la replicación viral, sin la presencia de una alta citotoxicidad, mientras que el DG-10, no inhibe a la enzima ni la replicación del virus y presenta citotoxicidad elevada.

Los grupos de moléculas DA y DG poseen un núcleo de quinolona y en ambos casos parece ser que este permite que la interacción con la enzima TI. El efecto de los sustituyentes en estas moléculas parece determinar que exista inhibición y el nivel de citotoxicidad.

Por lo tanto, compuestos derivados de piridinona con un núcleo de quinolona que presenten los sustituyentes 3-carboxilato y un 2-oxo pueden proponerse como una estructura base para el desarrollo de nuevos compuestos activos con baja citotoxicidad. Notablemente, el compuesto DG-9 mostró estas características, y mostró una inhibición significativa de la TI y de la replicación viral a bajas concentraciones ($IC_{50}=69.81\ \mu M$ e $IC_{50}=28.78\ \mu M$, respectivamente), con una citotoxicidad considerablemente menor a la del fármaco Efavirenz. Los resultados nos dicen que estas estructuras y en especial la del DG-9 pueden servir para el desarrollo de nuevos INNTI. Es necesario que mediante modificaciones estructurales puedan ser optimizadas para tener una mejor inhibición y una menor citotoxicidad.

11. BIBLIOGRAFÍA

Almond, L., Edirisinghe, D., Dalton, M., Bonington, A., Back, D., & Khoo, S. (2005). Intracellular and plasma pharmacokinetics of nevirapine in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 78(2), 132–142..

Bahls, L.D., Canezin, P.H., Reiche, E.M.V. et al. Moderate prevalence of HIV-1 transmitted drug resistance mutations in southern Brazil. *AIDS Res Ther* 16, 4 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12981-019-0219-1>

Buonaguro, L., Tornesello, M. L., & Buonaguro, F. M. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *Journal of virology*, 81(19), 10209–10219. doi:10.1128/JVI.00872-07

Cabrera Velásquez, A. (2015). *“Diseño, Síntesis y Modelado Molecular de Híbridos de Quinolona-UC781”*. “Tesis Doctoral”. Instituto Tecnológico de Tijuana.

Cabrera, A., Hernández, L., Chávez, D. and Medina-Franco, J. (2018) Molecular Modeling of Quinoline-Based Compounds as Potential Dual Inhibitors of Reverse Transcriptase and Integrase of HIV. *Computational Molecular Bioscience*, 8, 122-148. doi: 10.4236/cmb.2018.83007.

Cetina Palma, Andrea. 2013. Propagación de las cepas MN y IIB del VIH-1 en líneas de células T y análisis de la formación de sincicios. Tesis de Licenciatura, México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Chang, C. C., Crane, M., Zhou, J., Mina, M., Post, J. J., Cameron, B. A., ... Lewin, S. R. (2013). HIV and co-infections. *Immunological Reviews*, 254(1), 114–142. doi:10.1111/imr.12063.

Corbett, J. W., Kresge, K. J., Pan, S., Cordova, B. C., Klabe, R. M., Rodgers, J. D., & Erickson-viitanen, S. K. (2001). Tri-*n*-uoromethyl-Containing 3-Alkoxyethyl- and 3-Aryloxyethyl-2-pyridinones Are Potent Inhibitors of HIV-1 Non-Nucleoside Reverse Transcriptase. 11, 309–312.

Das, K., Martínez, S. E., Bauman, J. D., & Arnold, E. (2012). HIV-1 reverse transcriptase complex with DNA and nevirapine reveals non-nucleoside inhibition mechanism. *Nature structural & molecular biology*, 19(2), 253–259. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2223>

De Béthune, M.-P. (2010). Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), their discovery, development, and use in the treatment of HIV-1 infection: A review of the last 20 years (1989–2009). *Antiviral Research*, 85(1), 75–90. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.09.008

Delaney, M. (2006). History of HAART – the true story of how effective multi-drug therapy was developed for treatment of HIV disease. *Retrovirology*, 3(S1), 1. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-3-s1-s6>.

Deeks, S. G., Overbaugh, J., Phillips, A., & Buchbinder, S. (2015). HIV infection. (October). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.35>

Engelman, A., & Cherepanov, P. (2012). The structural biology of HIV - 1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature Publishing Group*, 10(4), 279–290.

Fields, B. N., In Knipe, D. M., & In Howley, P. M. (2013). *Fields virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.

García, M., Buzón, M. J., Benito, J. M., & Rallón, N. (2018). Peering into the HIV reservoir. *Reviews in medical virology*, 28(4), e1981. <https://doi.org/10.1002/rmv.1981>

Gazzard, B. (1987). *6 Aids*. Baillière's Clinical Gastroenterology, 1(3), 567–587.

Goldman, M. E., Nunberg, J. H., Brien, J. A. O., Quintero, J. C., Schleif, W. A., Freund, K. F., ... Stern, A. M. (1991). Pyridinone derivatives: Specific human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitors with antiviral activity. 88(August), 6863–6867.

Herbein G, Van Lint C, Lovett JL, Verdin E. (1998). Distinct Mechanisms Trigger Apoptosis in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected and in Uninfected Bystander T Lymphocytes. *Journal of virology*, p. 660–670.

Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M., & Markowitz, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*, 373(6510), 123–126.

Irini Sereti, Kara B. Anthony, Hector Martinez-Wilson, Richard Lempicki, Joseph Adelsberger, Julia A. Metcalf, Claire W. Hallahan, Dean Follmann, Richard T. Davey, Joseph A. Kovacs, and H. Clifford Lane. (2004). IL-2-induced CD4 T-cell expansion in HIV-infected patients is associated with long-term decreases in T-cell proliferation. *BLOOD*, volume 104, number 3.

Johanna Weiss, Dirk Theile, Nahal Ketabi-Kiyavash, Heike Lindenmaier and Walter Emil Haefeli. (2007). Inhibition of MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, and MRP3/ABCC3 by Nucleoside, Nucleotide, and Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors Drug Metabolism and Disposition, 35 (3) 340-344.

Jorgensen, W. L., & Jorgensen, W. L. (2012). The Many Roles of Computation in Drug Discovery. 1813(2004). <https://doi.org/10.1126/science.1096361>.

Kitayimbwa, J. M., Mugisha, J. Y. T., & Saenz, R. A. (2016). Estimation of the HIV-1 backward mutation rate from transmitted drug-resistant strains. *Theoretical Population Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.tpb.2016.08.001>.

Kohlstaedt, L., Wang, J., Friedman, J., Rice, P., & Steitz, T. (1992). Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science*, 256(5065), 1783–1790. doi:10.1126/science.1377403.

Kutsch, O., Levy, D. N., Bates, P. J., Decker, J., Kosloff, B. R., Shaw, G. M., ... Benveniste, E. N. (2004). Bis-Anthracycline Antibiotics Inhibit Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transcription. 48(5), 1652–1663. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.5.1652>.

Lewis G. K. (2014). Role of Fc-mediated antibody function in protective immunity against HIV-1. *Immunology*, 142(1), 46–57. <https://doi.org/10.1111/imm.12232>

Li, Amin; Ouyang, Yabo; Wang, Ziyun; Cao, Yuanyuan; Liu, Xiangyi; Ran, Li; Li, Chao; Li, Li; Zhang, Liang; Qiao, Kang; Xu, Weisi; Huang, Yang; Zhang, Zhili; Tian, Chao; Liu, Zhenming; Jiang, Shibo; Shao, Yiming; Du, Yansheng; Ma, Liying; Wang, Xiaowei; Liu, Junyi (2013). Novel Pyridinone Derivatives As Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs) with High Potency against NNRTI-Resistant HIV-1 Strains. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(9), 3593–3608. doi:10.1021/jm400102x.

Medina-Franco, J. L., Martínez-Mayorga, K., Juárez-, C., & Castillo, R. (2007). Pyridin-2 (1 H)-ones : A Promising Class of HIV-1 Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors. 2, 55–56. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200700054>.

Medina-Franco, L., Rodríguez-Morales, S., Juárez-Gordiano, C., & Hernández Campos, A. (2004). Flexible docking of pyridinone derivatives into the non-nucleoside inhibitor binding site of HIV-1 reverse transcriptase I. 12, 6085–6095. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.09.008>.

Medina-franco, J. L., Golbraikh, A., Oloff, S., Castillo, R., & Tropsha, A. (2005). Quantitative structure – activity relationship analysis of pyridinone HIV-1 reverse transcriptase inhibitors using the k nearest neighbor method and QSAR-based database mining. 229–242. <https://doi.org/10.1007/s10822-005-4789-8>.

Montagnier, L. (2002). HISTORICAL ESSAY: A History of HIV Discovery. *Science*, 298(5599), 1727–1728. doi:10.1126/science.107902.

Mark Andrew Phillips, Marisa A. Stewart, Darby L. Woodling and Zhong-Ru Xie (2018). Has Molecular Docking Ever Brought us a Medicine?, *Molecular Docking*, Dimitrios P. Vlachakis, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.72898.

Nunberg, J. H., Schleif, W. A., Boots, E. J., Brien, J. A. O., Quintero, J. C., Hoffman, J. M., ... Goldman, M. E. (1991). Viral Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1-Specific Pyridinone Reverse Transcriptase Inhibitors. 65(9), 4887–4892.

Murphy, (2016), Janeways Immunobiology, Garland Science.

Ochsenbauer-Jambor, C., Jones, J., Heil, M., Zammit, K. P., & Kutsch, O. (2006). T-cell line for HIV drug screening using EGFP as a quantitative marker of HIV-1 replication. Biotechniques, 40(1), 91-100.

Popovic, M.; Sarngadharan, M.G.; Read-Connole, E. y Gallo, R.C. 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. Science 224: 497-500.

Quesnel-Vallières, M., Kouzayha, I., Tran, E., Barry, I., Lasgi, C., Merindol, N., Monteil, V., Ransy, D. G., Boucher, M., Lapointe, N., & Soudeyns, H. (2011). Novel HIV-1 recombinant forms in antenatal cohort, Montreal, Quebec, Canada. Emerging infectious diseases, 17(2), 271–274. <https://doi.org/10.3201/eid1702.100629>

Ratner, L.; Haseltine, W.; Patarca, R.; Livak, K.J.; Starcich, B.; Josephs, S.F.; Doran, E.R.; Rafalski, J.A.; Whitehorn, E.A.; Baumeister, K.; Ivanoff, L.; Petteway, S.R. Jr.; Pearson, M.L.; Lautenberger, J.A.; Papas, T.S.; Ghayab, J.; Chang, N.T.; Gallo, R.C. y Wong-Staal, F. 1985. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. Nature 313: 277-283.

Reyes-Tapia, H. (2014) *“Síntesis de Híbridos de piridinona-UC781 y Análogos, para Estudios de Acoplamiento Molecular y Evaluación de la Inhibición de la Replicación del VIH-1”*. “Tesis Doctoral”, Instituto Tecnológico de Tijuana.

Rodríguez-Vega. L. (2014). *“Síntesis de Híbridos de Segunda generación de Ciclohexanpiridinona-alqueniloxi, con Actividad Potencial en la Inhibición del VIH-1”*. “Tesis de Maestría”. Instituto Tecnológico de Tijuana.

Rodríguez-Vega. L. (2018). *“Síntesis de Derivados de Ciclohexanpiridinona de Tercera generación, con Actividad Potencial en la Inhibición del VIH-1”*. “Tesis Doctoral”. Instituto Tecnológico de Tijuana.

Ruelas Galindo, Isabel. 2015. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL VIH-1 EN SINCICIOS DE CÉLULAS T CD4+. Tesis de Licenciatura, México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Sarafianos J. G. (2009). Structure and Function of HIV-1 Reverse Transcriptase: Molecular Mechanisms of Polymerization and Inhibition. *J. Mol. Biol.* 385, 693–713.

Scutchfield, F. D., & Benenson, A. S. (1989). AIDS update. *Postgraduate Medicine*, 85(4), 289–304. doi:10.1080/00325481.1989.11700636.

Snedecor, S. J., Sudharshan, L., Nedrow, K., Bhanegaonkar, A., Simpson, K. N., Haider, S., Chambers, R., Craig, C., & Stephens, J. (2014). Burden of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance in HIV-1-infected patients: a systematic review and meta-analysis. *AIDS research and human retroviruses*, 30(8), 753–768. <https://doi.org/10.1089/AID.2013.0262>

Sterrantino, G., Borghi, V., Callegaro, A. P., Bruzzone, B., Saladini, F., Maggiolo, F., Maffongelli, G., Andreoni, M., De Gennaro, M., Gianotti, N., Bagnarelli, P., Vergori, A., Antinori, A., Zazzi, M., Zaccarelli, M., & ARCA Study Group (2019). Prevalence of predicted resistance to doravirine in HIV-1-positive patients after exposure to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *International journal of antimicrobial agents*, 53(4), 515–519. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.02.007>

Structure, Expression, and Regulation of the HIV Genome. (2018). Retrieved from <http://hivinsite.ucsf.edu/InSite?page=kb-02-01-02#S3.1X>.

Teer, E., Joseph, D.E., Glashoff, R.H. et al. Monocyte/Macrophage-Mediated Innate Immunity in HIV-1 Infection: From Early Response to Late Dysregulation and Links to Cardiovascular Diseases Onset. *Virol. Sin.* 36, 565–576 (2021). <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00332-0>

Vasilis V., Konstandinos V. and Daniel W. Nebert. (2009) Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *HUMAN GENOMICS. VOL 3. NO 3.* 281 –290.

Walker, B. D., & Burton, D. R. (2008). Toward an AIDS Vaccine. *Science*, 320(5877), 760–764. doi:10.1126/science.1152622.

Watera, C., Ssemwanga, D., Namayanja, G., Asio, J., Lutalo, T., Namale, A., Sanyu, G., Ssewanyana, I., Gonzalez-Salazar, J. F., Nazziwa, J., Nanyonjo, M., Raizes, E., Kabuga, U., Mwangi, C., Kirungi, W., Musinguzi, J., Mugagga, K., Mbidde, E. K., & Kaleebu, P. (2021).

HIV drug resistance among adults initiating antiretroviral therapy in Uganda. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 76(9), 2407–2414. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab159>

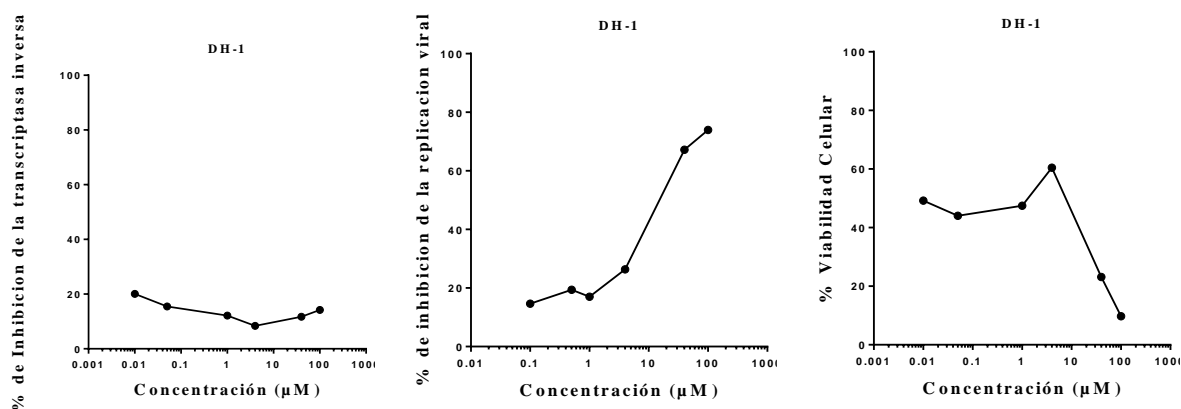
Y Hsiou, J Ding, K Das, AD Clark, Jr, SH Hughes, E Arnold,(1996) Structure of unliganded HIV-1 reverse transcriptase at 2.7 Å resolution: implications of conformational changes for polymerization and inhibition mechanisms, Structure, Volume 4, Issue 7, Pages 853-860,ISSN 0969-2126, [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00091-3](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00091-3).

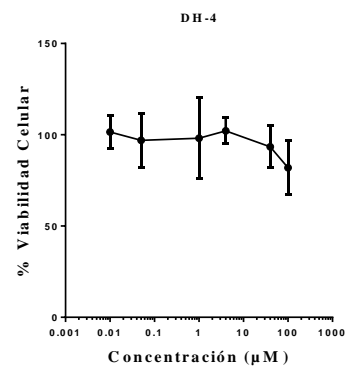
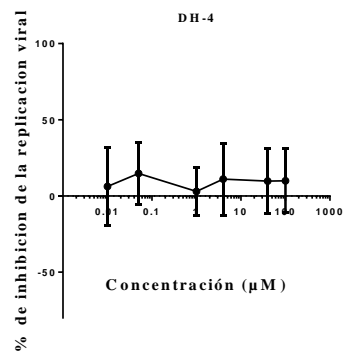
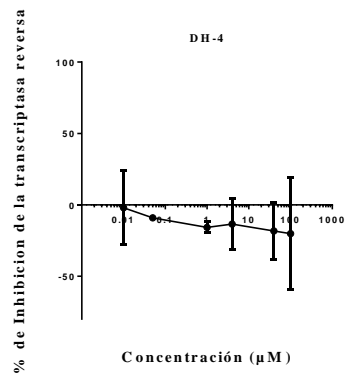
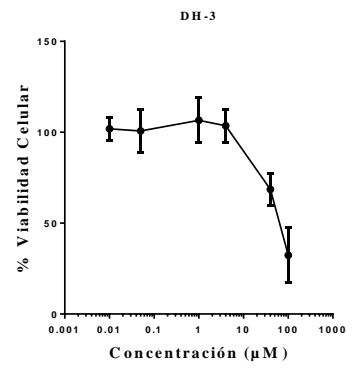
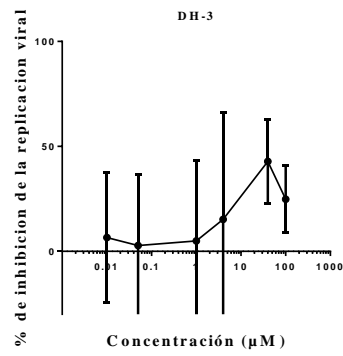
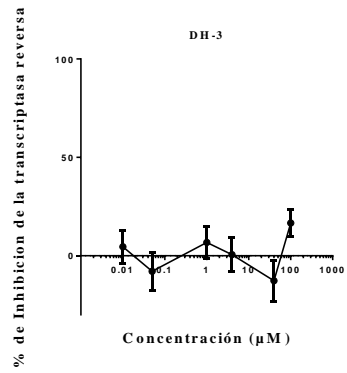
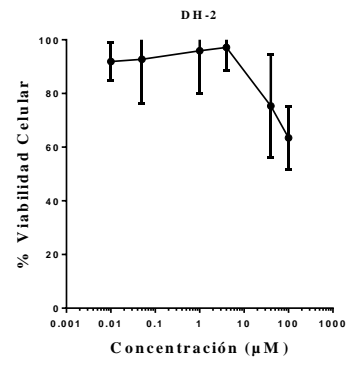
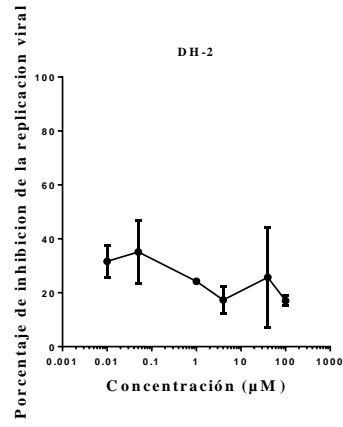
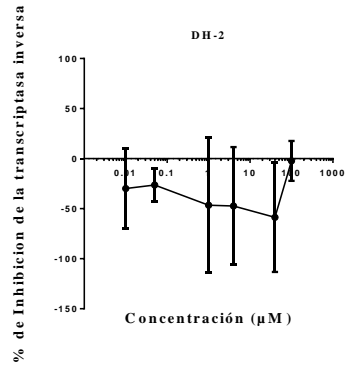
Zhan, P., Chen, X., Li, D., Fang, Z., De Clercq, E., & Liu, X. (2013). HIV-1 NNRTIs: structural diversity, pharmacophore similarity, and implications for drug design. Medicinal research reviews, 33 Suppl 1, E1–E72. <https://doi.org/10.1002/med.20241>

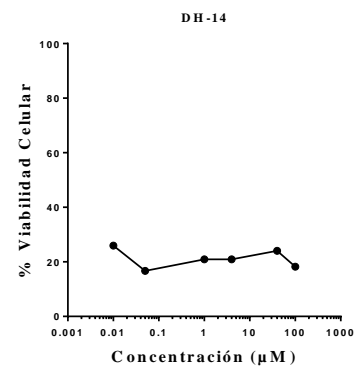
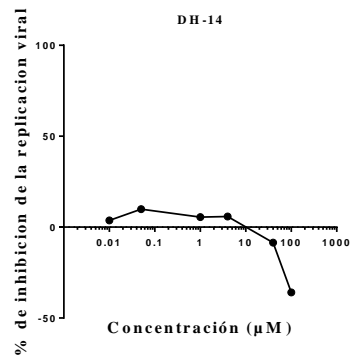
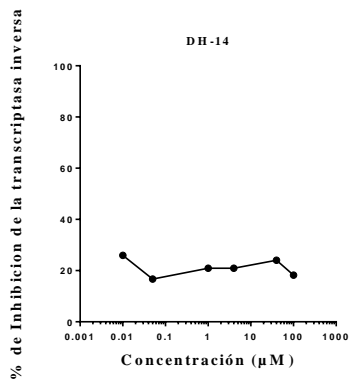
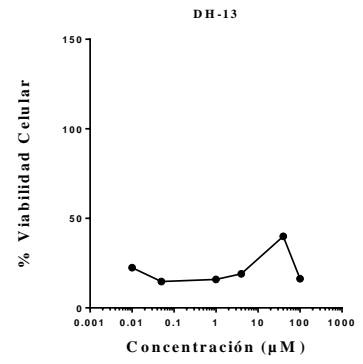
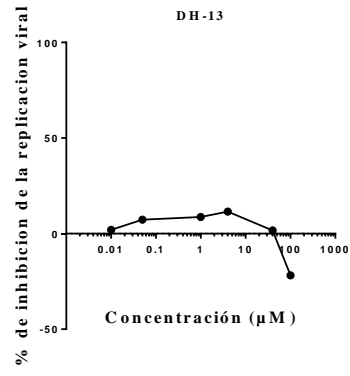
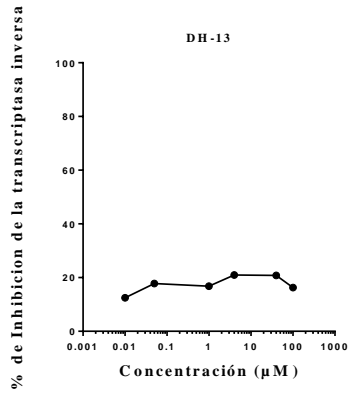
12. ANEXO

A continuación, se muestran las gráficas de la actividad inhibitoria y citotóxica de los compuestos evaluados durante la elaboración de este proyecto y que no salen en la sección de resultados. Además, también se incorporan los nombres y estructuras de las moléculas evaluadas.

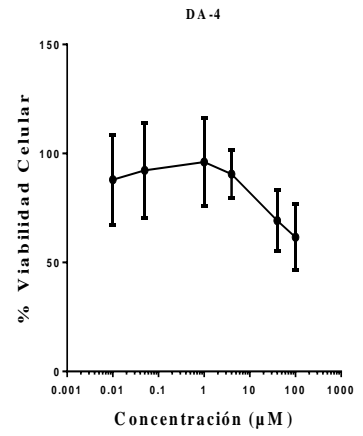
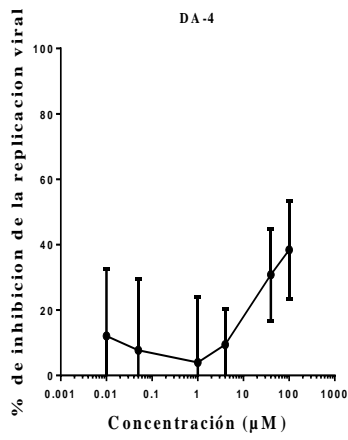
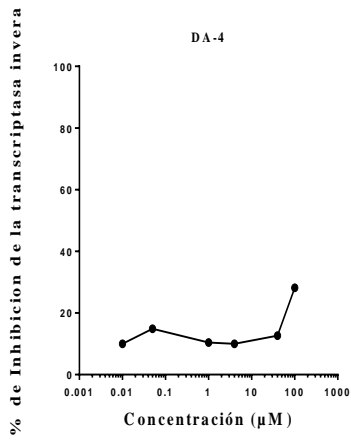
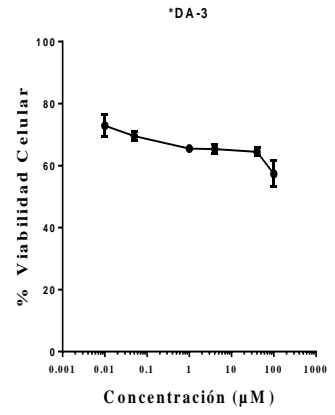
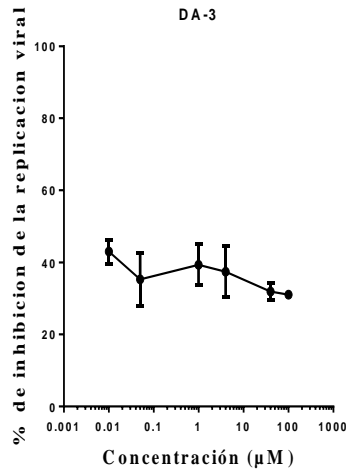
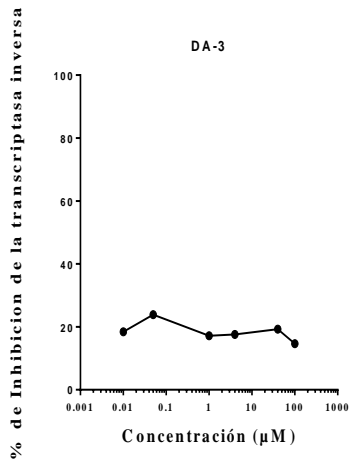
12.1 Grupo DH

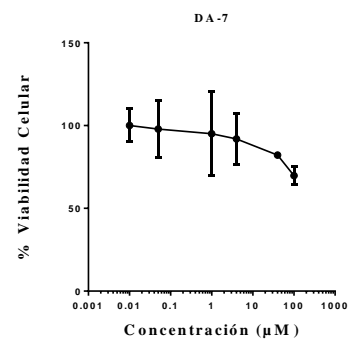
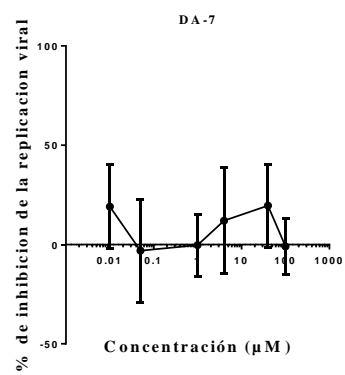
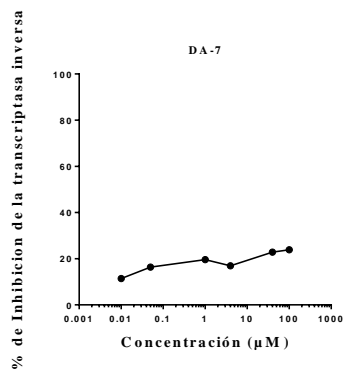
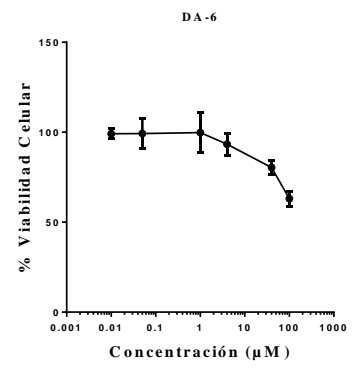
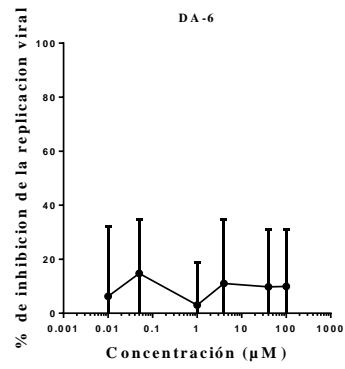
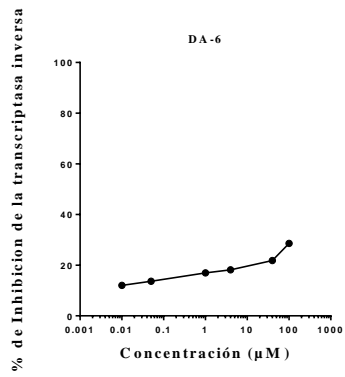
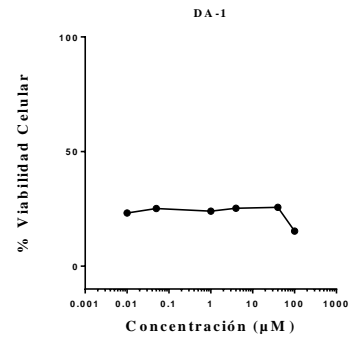
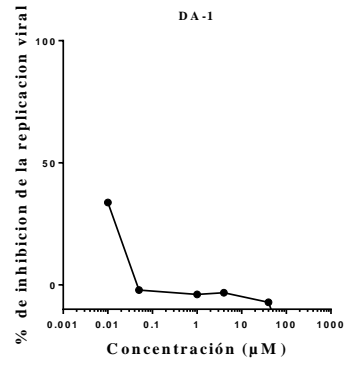
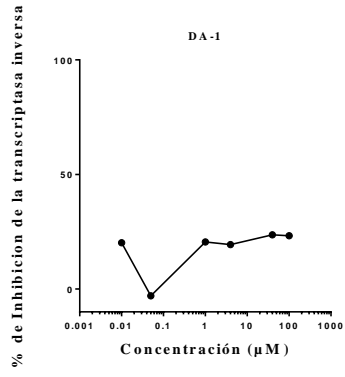


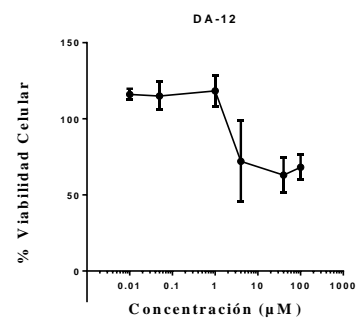
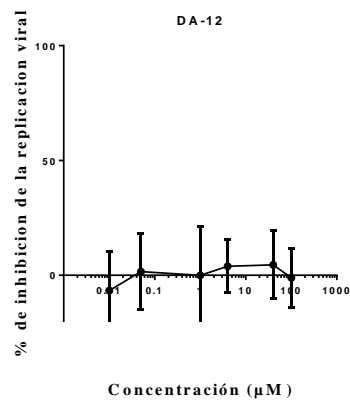
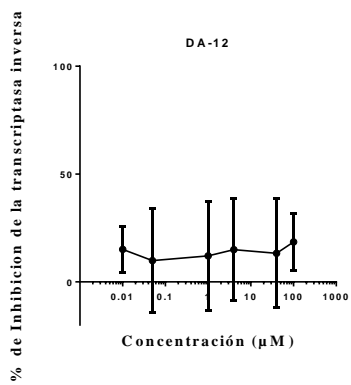
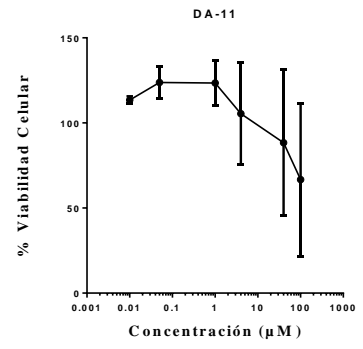
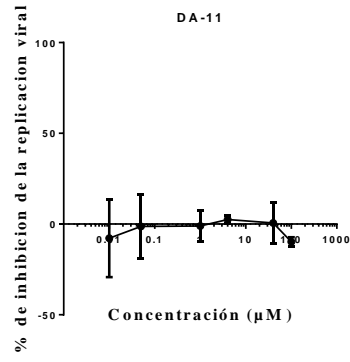
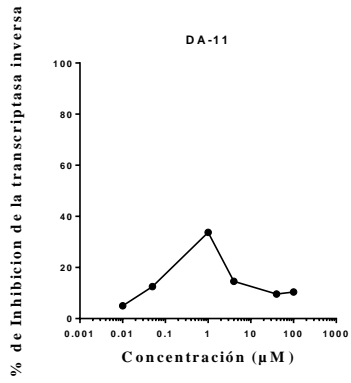




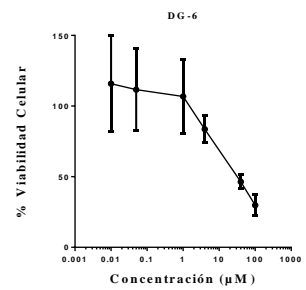
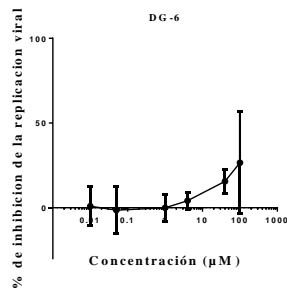
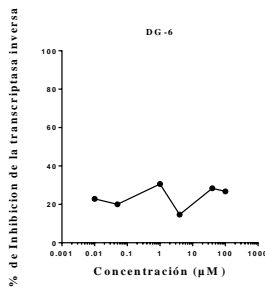
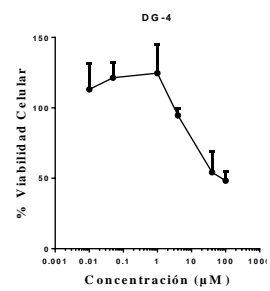
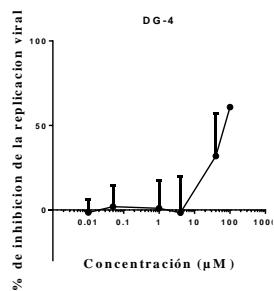
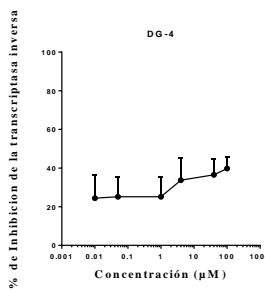
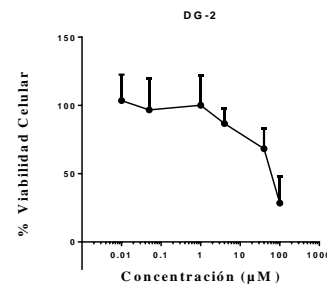
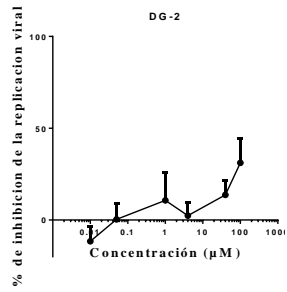
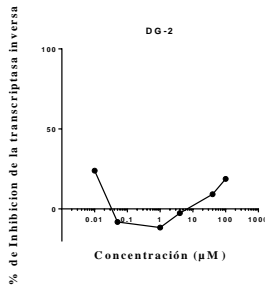
12.2 Grupo DA

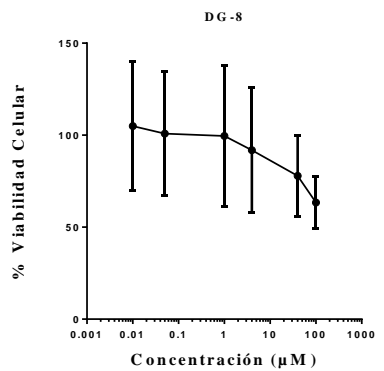
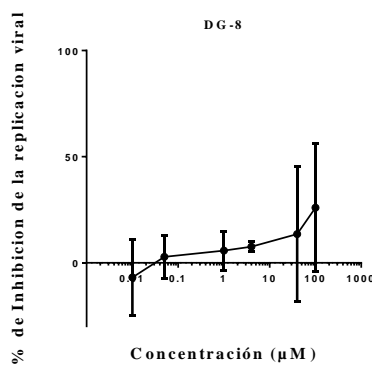
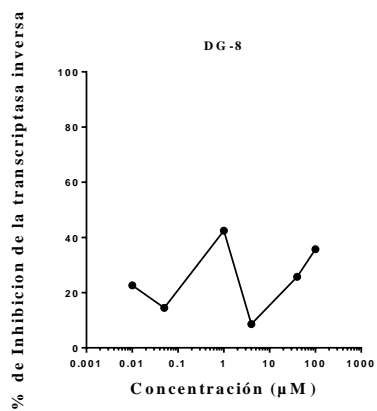
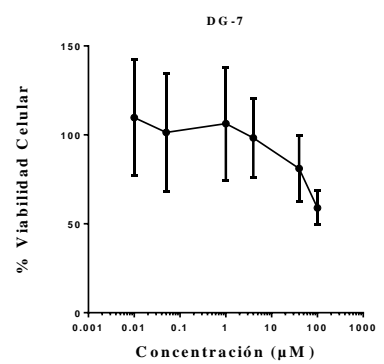
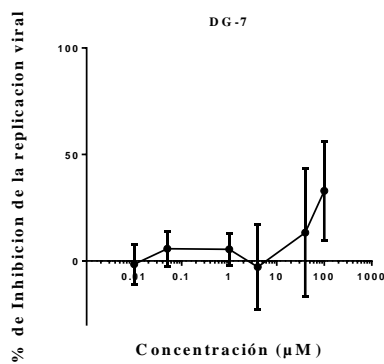
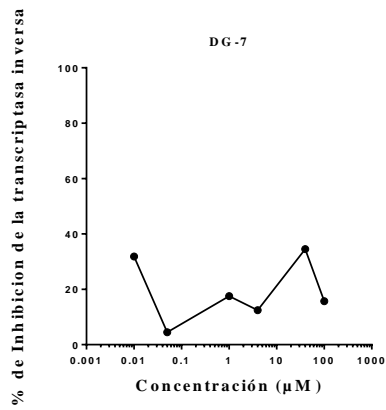
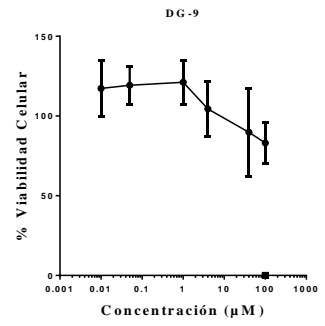
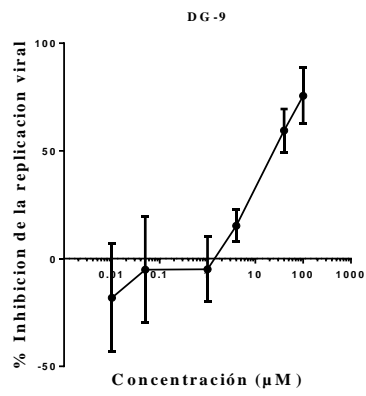
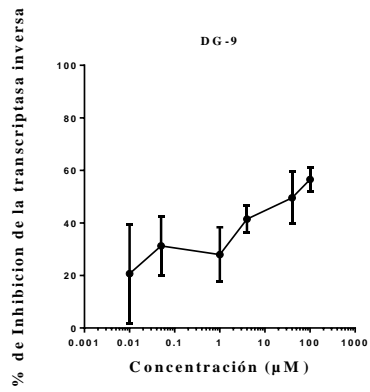


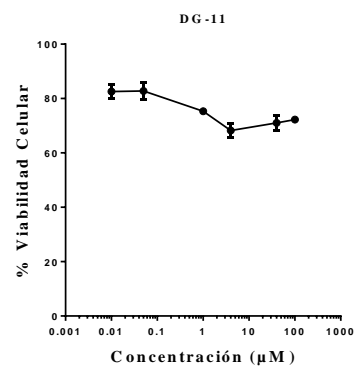
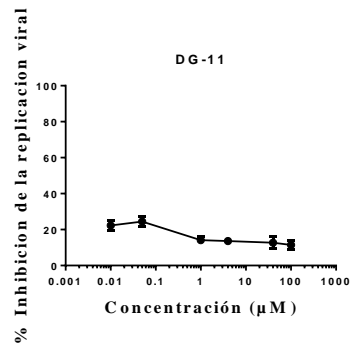
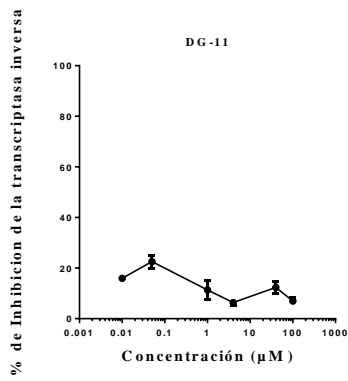
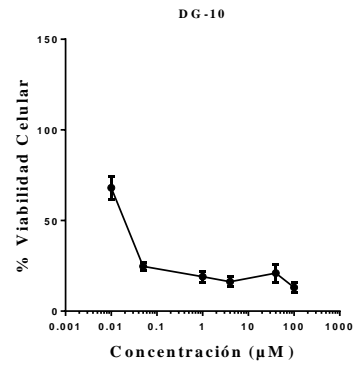
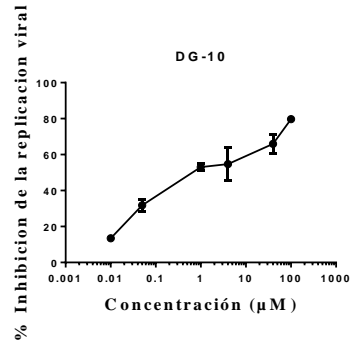
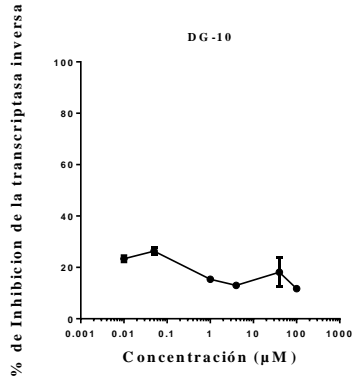




12.3 Grupo DG

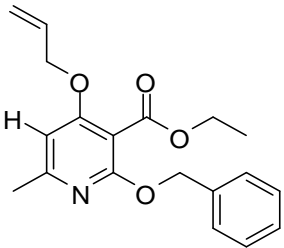
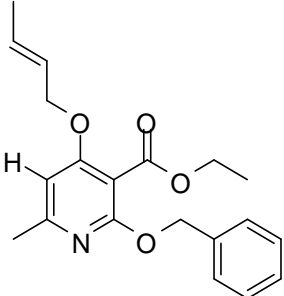
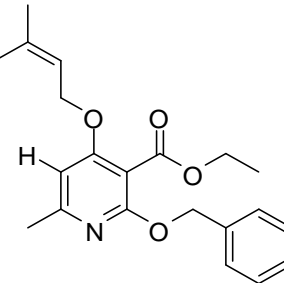
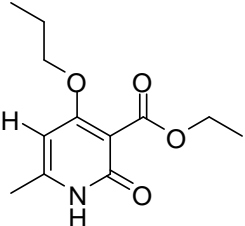






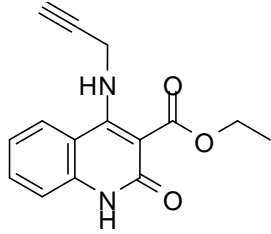
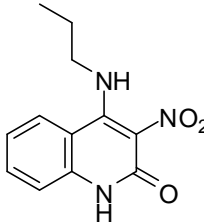
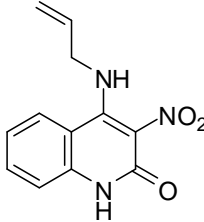
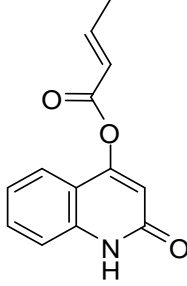
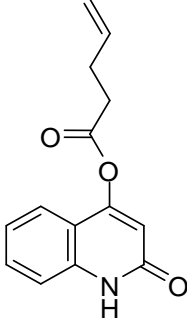
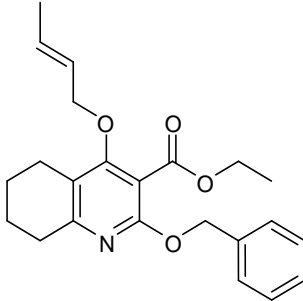
Anexo 12.4

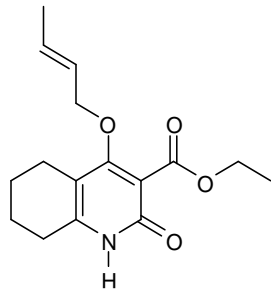
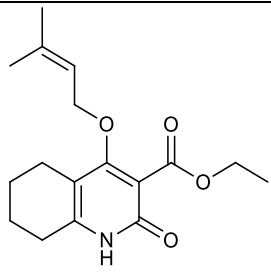
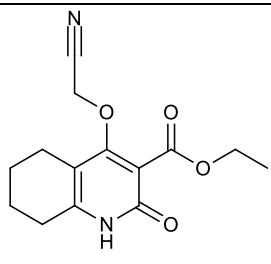
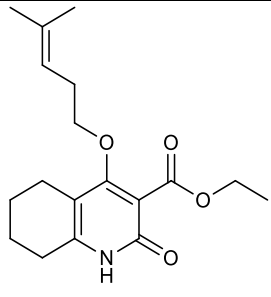
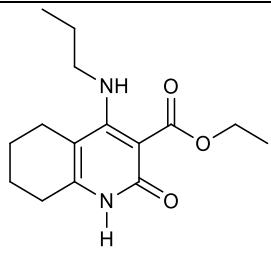
Lista de Compuestos

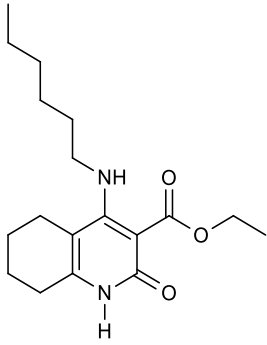
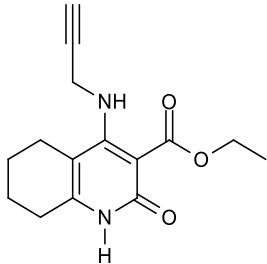
CLAVE	ESTRUCTURA	Nombre/número de compuesto en tesis de Héctor
DH-1		4-(aliloxi)-2-(benciloxi)-6n-metil nicotinato de etilo
DH-2		(E)-2-(benciloxi)-4-(but-2-en-1-iloxi)-6-metilnicotinato de etilo
DH-3		2-(benciloxi)-6-metil-4-(3-metilbut-2-en-1-iloxi) nicotinato de etilo
DH-4		6-metil-2-oxo-4-propiloxi-1,2-dihidropiridin-3-carboxilato de etilo

DH-5		4-butoxi-6-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-carboxilato de etilo
DH-6		4-(aliloxi)-6-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-carboxilato de etilo
DH-7		(<i>E</i>)-4-(but-2-en-1-iloxi)-6-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-carboxilato de etilo
DH-8		Ácido 4-(aliloxi)-6-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-carboxílico
DH-9		4-(aliloxi)-6-metilpiridin-2(1 <i>H</i>)-ona
DH-10		4-(aliloxi)- <i>N</i> ,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-carboxamida

DH-11		4-(aliloxi)- <i>N,N</i> -dietil-6-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-carboxamida
DH-12		4-(aliloxi)- <i>N-ter</i> -butil-6-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-carboxamida
DH-13		4-(aliloxi)-6-metil-2-oxo- <i>N</i> -(prop-2-in-1-il)-1,2-dihidropiridin-3-carboxamida
DH-14		3-(4-(aliloxi)-6-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)-1,1-dietilurea
DA-1		2-oxo-4-(<i>ter</i> -butilamina)-1,2-dihidroquinolin-3-carboxilato de etilo
DA-3		4-(alilamino)-1,2-dihidro-2-oxoquinolin-3-carboxilato de etilo

DA-4		4-(propargilamino)-1,2-dihidro-2-oxoquinolin-3-carboxilato de etilo
DA-6		4-(propilamino)-3-nitroquinolin-2(1H)-ona
DA-7		4-(alilamina)-3-nitroquinolin-2(1H)-ona
DA-11		but-2-enoato de 2-oxo-1,2-dihidro-2-oxoquinolin-4-ilo
DA-12		but-4-enoato de 2-oxo-1,2-dihidro-2-oxoquinolin-4-ilo
DG-2		(E)-2-(benciloxi)-4-(but-2-en-1-iloxi)-5,6,7,8-tetrahidroquinolin-3-carboxilato de etilo

DG-4		<p>(E)-2-(benciloxi)-4-(but-2-en-1-iloxi)- 5,6,7,8-tetrahydroquinolin-3-carboxilato de etilo</p>
DG-6		<p>4-((3-metil- but2-en-1-il)oxi)- 2-oxo- 1,2,5,6,7,8-hexahidroquinolon-3-carboxilato de etilo</p>
DG-7		<p>4-(cianometoxi)-2-oxo-1,2,5,6,7,8- hexahidroquinolon-3-carboxilato de etilo</p>
DG-8		<p>4-((4-metilpent-3-en-1-il)oxi)-2-oxo- 1,2,5,6,7,8-hexahidroquinolon-3-carboxilato de etilo</p>
DG-9		<p>2-oxo-4-(propilamino)-1,2,5,6,7,8- hexahidroquinolin-3-carboxilato de etilo</p>

<p>DG-10</p>		<p>4-(hexilamino)- 2- oxo-1,2,5,6,7,8- hexahidroquinolin-3-carboxilato de etilo</p>
<p>DG-11</p>		<p>2-oxo-4-(prop-2-in-1-ilamino)-1,2,5,6,7,8- hexahidroquinolin-3-carboxilato de etilo</p>