

INIBIÇÃO SELETIVA DAS ATIVIDADES DAS ENZIMAS TRANSCRIPTASE REVERSA DO VÍRUS HIV-1 E DNA POLIMERASES HUMANAS POR DERIVADOS DAPIRAZOLO-PIRIDINA

H.S. PEREIRA³, A.M.R. BERNARDINO², C. NOGUEIRA², C.R. GOMES², G.A. ROMEIRO², A. CHAVES², V.F. FERREIRA², M.V. CAETANO¹, I.C.P.P. FRUGULHETTI¹, N. MOUSSATCHÉ³, M.C.B. SOUZA².

¹Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular.

²Universidade Federal Fluminense, Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica.

³Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Carlos Chagas Filho

RESUMO

Novos ribonucleosídeos derivados dos sistemas dipirazolo-piridina foram preparados e avaliados quanto à atividade polimerásica das enzimas transcriptase reversa (RT) do vírus HIV-1 e das DNA polimerases humanas alfa e epsilon. Os derivados 1b e 1d inibiram a atividade da transcriptase reversa em concentrações de micromolares. Entretanto, as mesmas substâncias não foram capazes de inibir a atividade polimerase das enzimas DNA-polimerase humana alfa e epsilon.

Palavras-chave: ribonucleosídeos, antivirais, transcriptase reversa.

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), descrita pela primeira vez em 1981, é uma doença fatal e de cura ainda não conhecida, que tem como agente etiológico o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), isolado pela primeira vez em 1983. O HIV pertence ao gênero *lentivirus* da família *retroviridae*, contém genoma ARN de fita simples, não-segmentado. Análises da partícula viral por microscopia eletrônica revelam uma estrutura envelopada com cerca de 110nm de diâmetro. Externamente, há uma bicamada lipídica derivada da célula hospedeira durante a maturação do vírus. Nestas camadas estão inseridas as glicoproteínas do envelope: a proteína de superfície, gp120, associada não covalentemente à proteína transmembrana, gp41. O nucleocápside é formado por duas cópias de RNA fita simples positiva em associação com a proteína (p9), a transcriptase reversa (p66/p51), a integrase (p32), e a protease (p11). O cápside apresenta-se numa

forma de projétil e é limitado pela proteína do cápside (p24). Imediatamente abaixo do envelope externo está uma proteína associada à membrana, a proteína da matriz (p17). O HIV apresenta estrutura genômica complexa e capacidade para expressão gênica diferencial. O RNA genômico tem 9,7Kb, contendo seqüências LTR (*Long Terminal Repeats*) nas extremidades, as quais regulam os eventos de transcrição. Além dos genes retrovirais essenciais, *gag*, *pol* e *env*, o HIV contém mais seis produtos gênicos de função regulatória, *tat*, *rev*, *nef*, e *vpu* (HIV-1) ou *vpx* (HIV-2). A partir do gene *gag* é produzido um precursor que é clivado durante o processo de maturação do vírus, dando origem à proteína fosforilada p24, à p17 meristilada, e à p9, rica em aminoácidos prolina. O produto do gene *pol* é clivado originando a protease, o heterodímero transcriptase reversa/RNAase H e a integrase. O gene *env* codifica a proteína precursora gp160 clivada por uma protease celular, originando as glicoproteínas, gp120 e gp41 (Arts & Wainberg, 1996).

O ciclo de replicação viral inicia-se com a ligação da proteína gp120 à proteína de superfície celular CD4. A ligação induz mudanças conformacionais nas proteínas do envelope viral, permitindo interações entre a gp41 e a membrana da célula-alvo, resultando na fusão do envelope viral com a membrana celular, e na entrada do vírus. Após a entrada na célula, o nucleocápside viral participa de um número de eventos críticos, incluindo a transcrição, síntese e integração do DNA no genoma da célula hospedeira (Hottiger & Hübscher, 1996).

A transcrição do RNA viral se inicia pela ligação de um *primer* de tRNA lys complementar a um sítio próximo à ponta 5' do RNA viral. A partir deste *primer* a transcriptase reversa sintetiza um segmento de DNA

fita positiva, complementar ao RNA, que é translocado para o término 3' da molécula, para completar a síntese da fita de DNA. Uma atividade RNase H é necessária para degradar o RNA do híbrido DNA-RNA, que resulta da última etapa da transcrição. Uma atividade DNA polimerase DNA dependente é responsável pela síntese da fita de DNA complementar. A molécula de DNA dupla fita é transportada do citoplasma para o núcleo que, em associação com a integrase que se encontra ligada aos terminos do DNA viral, se integra ao genoma hospedeiro. O DNA integrado é chamado provírus (Hizi & Hughes, 1991).

Como não se conhece nenhuma enzima celular homóloga à transcriptase reversa (exceto aquelas associadas com vírus endógeno ou retrotransposons), esta enzima representa um alvo de importância relevante para a elaboração de drogas capazes de bloquear infecções por retrovírus. A transcriptase reversa isolada da partícula de HIV-1 apresenta-se na forma de heterodímeros, consistindo de quantidades equimoleculares de dois polipeptídeos de pesos moleculares de 66kDa e 51kDa. A subunidade de 51kDa é derivada de clivagens proteolíticas da subunidade de 66kDa, catalisada por uma protease codificada pelo vírus. Os sítios de atividades polimerásicas estão associados aos domínios de ambos os polipeptídeos, enquanto que o sítio para a atividade ribonucleásica H está associado ao domínio terminal carboxílico do polipeptídeo de 66kDa (Boyer *et al.*, 1992).

Muitas drogas anti-HIV testadas, inclusive aquelas já aprovadas para uso clínico, exibem atividade inibitória para TR. Estes inibidores podem ser classificados em dois grupos. O primeiro grupo inclui os análogos a nucleosídeos, tais como os (2', 3' dideoxinucleosídeos AZT, ddT, ddG, ddl, ddC), que se comportam como inibidores competitivos (Caroll *et al.*, 1992; Sobol *et al.*, 1995). Os análogos que precisam ser convertidos às formas 5'trifosfatos por cinases celulares são potentes bloqueadores da síntese de DNA pela TR. Tanto o HIV-1 quanto o HIV-2 são altamente sensíveis a estes nucleosídeos. O segundo grupo de substâncias são inibidores não-nucleosídeos. Estes não necessitam de enzimas celulares para a conversão intracelular e não competem pelo sítio de ligação do substrato à enzima RT. Muitos destes inibidores são ativos contra o HIV-1, mas não o são para o HIV-2 (Perach & Hizi, 1995). Derivados pirazolonas são potentes e específicos inibidores da TR do HIV-1. Entretanto, cepas virais resistentes a estes derivados contêm mutações na enzima TR, com substituições dos aminoácidos Tyr-181 e Lys-102, por Cys e Asp, respectivamente (Gu *et al.*, 1991; Althaus *et al.*, 1993; Sherasaka *et al.*, 1995).

Neste trabalho, analisamos os efeitos dos ribonucleosídeos contendo núcleo dipirazolo-piridina na atividade polimerásica das enzimas transcriptase

reversa do vírus HIV-1 recombinante e das DNA polimerases humanas (Zhang *et al.*, 1995).

METODOLOGIA

TRANSCRIPTASE REVERSA

Dr. Stephen H. Hughes, do NCI-Frederick Institute, enviou-nos a enzima recombinante transcriptase reversa do vírus HIV-1 inserida em plasmídeo pUC 12N. As bactérias DH5 α contendo os plasmídeos recombinantes foram cultivadas de acordo com a metodologia descrita abaixo.

Minipreparação do DNA plasmidial

O procedimento adotado foi baseado na técnica descrita por Holmes & Quigley (1981), com algumas modificações. As bactérias foram inoculadas em 20ml de meio de cultura NZYM contendo antibiótico ampicilina (100 μ g/ml) e mantidas a 37°C por 16 horas com agitação. A cultura foi centrifugada a 12.000 x g por 2 minutos a temperatura ambiente. As células foram ressuspensas em tampão STET, contendo: sacarose 8%, Triton X-100 0,5%(V/V), EDTA 50mM, pH8,0 e Tris-HCl 10mM, pH8,0 e foi adicionado 25 μ l de solução de lisozima, 10mg/ml em TE pH8,0. A suspensão foi agitada em vortex, incubada em banho de água a 100°C por 1 minuto e centrifugada a 12.000 x g por 15 minutos. Aos sobrenadantes foram adicionados 40ml de acetato de sódio 3M pH5,2 e 420 μ l de isopropanol. Em seguida, foram centrifugados a 12.000 x g por 15 minutos. Os precipitados foram lavados com etanol, secos em nitrogênio líquido e ressuspensos em 5 μ l de TE pH8,0. A suspensão foi adicionado 1 ml de Rnase A (10mg/ml), mantendo-se a 37°C por 30 minutos, e acrescentado igual volume de clorofórmio. Após agitação em vortex por 30 segundos, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 2 minutos e, posteriormente, precipitadas pela adição de 1/2 volume de acetato de amônia 7,5M e 2 volumes de etanol gelado. Após incubação a -70°C por 30 minutos, foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos. Os sedimentos foram lavados com etanol gelado, secos em nitrogênio líquido, e ressuspensos em tampão 100 μ l de tampão TE e mantidos a 4°C.

Filtração em gel

As proteínas solúveis do lisado bacteriano (conforme descrito acima) foram filtradas em colunas Sephadex G-25, com o objetivo de remover possíveis inibidores da atividade enzimática. A coluna foi preequilibrada com 0,2M de NaCl, 2mM de ditio-treitol, 0,2% de Triton X-100, 20% glicerol, 25mM de Tris-HCl, pH7,4. Após a filtração, as colunas foram lavadas com o mesmo tampão utilizado para o equilíbrio. As frações foram coletadas em coletor

tipo BioRad. A concentração de proteínas de cada fração foi determinada por metodologia de Bradford, 1976, e, posteriormente, avaliadas para a atividade polimerásica.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

As proteínas foram analisadas em gel de poliacrilamida de acordo com a metodologia descrita por Hughes *et al.*, 1988. O sedimento celular foi rompido utilizando-se tampão de lise, contendo 1% SDS, 1% β-mercaptoetanol, 10% glicerol e 50mM de Tris Hcl, pH 6,8; 10μg/ml de azul de bromofenol, aquecido por 2 minutos a 100°C. A amostra foi submetida a gel de poliacrilamida 10%, contendo 0,1% de SDS. O gel foi corado com azul de comassie 0,1%.

Avaliação da atividade polimerásica da transcriptase reversa

A mistura de reação para a atividade polimerásica continha, em 10μl de reação, 50mM de Tris-HCl, pH7,8, 50mM de KCl, 6mM de MgCl₂, 1mM de ditiotretol, 1mg/ml de BSA, 5μM de dTTP, 20μCi/ml de [³H]dTTP (47Ci/mmol) e 0,20 DO de poly(rA). (dT) e 1 pmol de enzima. As amostras foram incubadas por 30 minutos, a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de TCA 10%, contendo 20mM de pirofosfato de sódio. O precipitado foi coletado em filtro Whatman GF/C e a radioatividade determinada através de contagem em cintilador líquido modelo Beckman L50.

DNA polimerase alfa e epsilon de placenta humana

As DNA polimerases foram purificadas a partir de placenta humana através de metodologia desenvolvida por L. Toomey & Marietta Lee, 1990. A avaliação da atividade enzimática foi feita utilizando-se polinucleotídeo sintético poli(dA) oligo(dT) na relação 20:1. A mistura de reação continha: 40μg/ml de BSA, 2% glicerol, 100μM de ATP, 1mM de MgCl₂, 40mM de Tris-HCl pH7,8, 20μCi de [³H]dTTP (47Ci/mmol), 0,20 DO de p(dA). (dT) e 0,2-0,4 unidades de enzima (Zang *et al.*, 1995). A incubação foi a 37°C durante 1 hora. A reação foi interrompida pela adição de TCA 5% e o precipitado foi coletado em filtro Whatman GF/C e lavado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

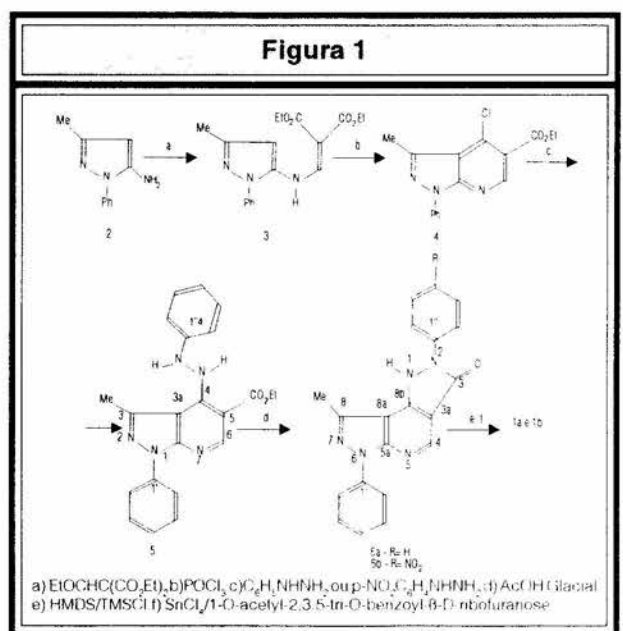
A Figura 1 apresenta a seqüência de reações para obtenção dos novos derivados β-ribonucleosídeos. A reação de condensação do 5-amino-pirazol (2) forneceu o acrilato (3) que foi ciclizado produzindo o 5-carboxy-4-cloro-3-metil-1-fenil-1H-pirazolo[3,4-b]piridina(4). Reações de 4 com fenilidrazinas adequadas com posterior refluxo em ácido acético

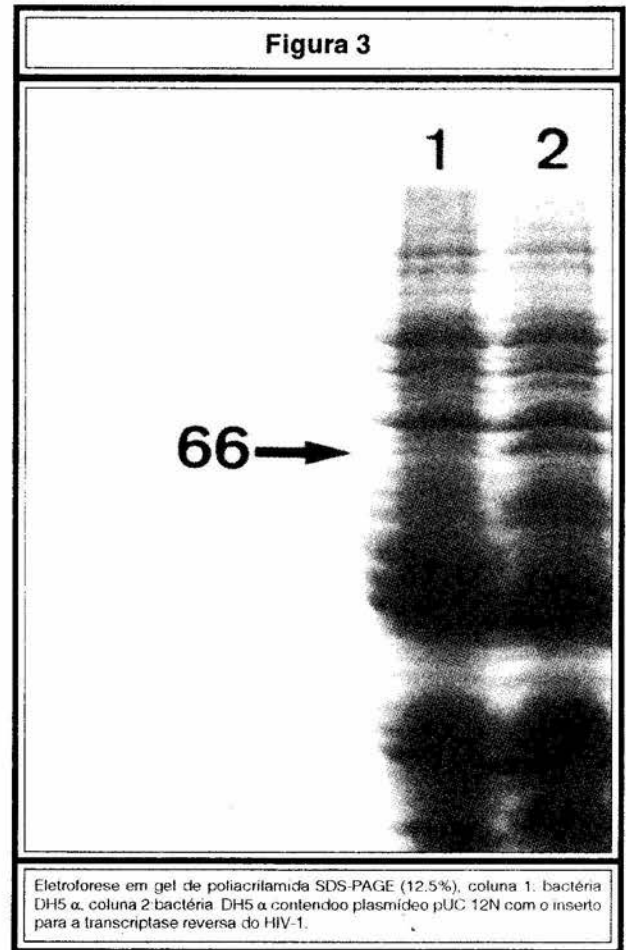
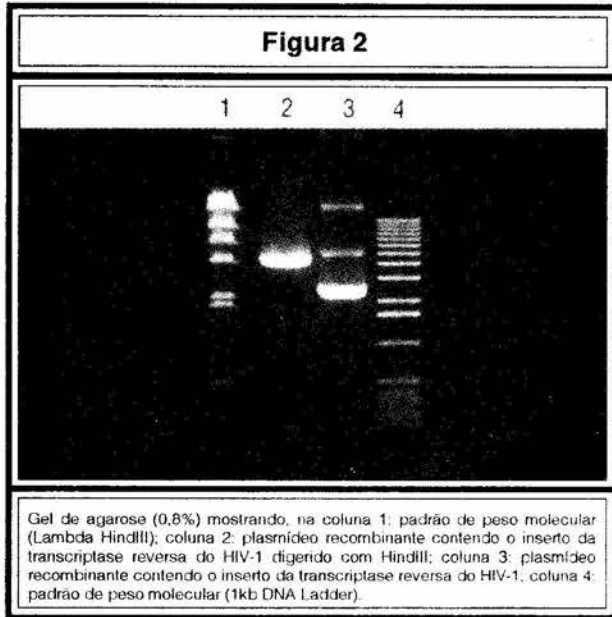
glacial forneceram os derivados 8-metil-2,6-difenil-5-A(2,3,5-tri-O-benzoil-β-4-b:3',4'-d]piridina-3(5H)-ona(1b). A glicosilação das bases nitrogenadas sililadas pelo tratamento com o 1-O-acetil-2,3,5-tri-O-benzoil-β-D ribofuranose em presença de cloreto estânico anidro produziu os derivados 1a e 1b.

As bactérias DH5α transfectadas com os plasmídeos pUC12N recombinantes contendo a enzima transcriptase reversa foram crescidas e as células coletadas por centrifugação. O DNA plasmidial foi isolado e analisado em gel de agarose, conforme descrito em materiais e métodos (Figura 2). Observamos uma banda de 4,38Kb correspondente ao tamanho do plasmídeo pUC12N+ inserto relativo à enzima transcriptase reversa conforme descrito por Hughes *et al.*, 1988.

A Figura 3 mostra o perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas do lisado bacteriano submetido à coluna G-25 (conforme descrito). Observamos uma banda de 66KDa presente no gel, correspondendo ao peso molecular descrito para a transcriptase reversa recombinante. Estes dados estão de acordo com os resultados anteriormente descritos por Hughes *et al.*, 1988.

Com o objetivo de avaliarmos o potencial antiviral das substâncias 1a, 1b, 1c e 1d na atividade polimerase da enzima transcriptase reversa recombinante produzida e isolada conforme descrito acima, quantidades crescentes dos referidos derivados foram testados em sistemas acelulares utilizando-se poli(rA)o(dT) como *templete-primer* e ³H-dTTP como substrato. Para testarmos os possíveis efeitos citotóxicos destes derivados, analisamos a interação





Tabela

Efeitos das substâncias 1b e 6b nas atividade das enzimas transcriptase reversa do HIV

Derivados	% inibição da atividade polimerásica da enzima transcriptase reversa do HIV			
	25 μ M	50 μ M	70 μ M	100 μ M
1b	0	30	50	65
6b	20	52	70	75

dos mesmos com as DNA polimerases humanas alfa e epsilon, principais enzimas envolvidas na replicação do DNA celular. Os resultados mostrados na Tabela indicam que quantidades crescentes, em concentrações de micromolar das substâncias 1b e 1d inibiram gradualmente a atividade polimerásica da enzima transcriptase reversa do vírus HIV-1. Os dois derivados (1a e 1c) que não apresentavam o grupamento nitro foram incapazes de inibir a atividade desta enzima, sugerindo um possível envolvimento deste grupo no bloqueio da atividade enzimática. Por outro lado, as mesmas substâncias foram incapazes de inibir a atividade polimerásica das enzimas polimerases humanas alfa e epsilon (dados não mostrados).

A identificação de agentes capazes de inibir a replicação do vírus da Imunodeficiência Humana

(HIV-1) e, talvez, de prevenir sua reativação, representa um dos principais desafios na terapia da infecção por HIV. Apesar de estudos exaustivos, futuras caracterizações da enzima transcriptase reversa do vírus HIV são necessárias para o desenvolvimento de substâncias mais ativas.

Os sistemas pirazolo-pidridina, analisados neste trabalho, estão presentes em muitas substâncias que apresentam atividades biológicas importantes. Por exemplo, muitos β -ribonucleosídeos que possuem estes sistemas têm atividades antiparasitária ou antimalarial. Os dados apresentados neste trabalho mostram que estes derivados foram capazes de inibir a atividade da enzima TR do HIV-1, em concentrações de micromolar. Estes dados nos levam a acreditar que estes derivados sejam possíveis candidatos para a utilização como antivirais. Estudos de sinergismo com outros antivirais estão sendo desenvolvidos, bem como um estudo cinético destas drogas na atividades polimerásica e RNase H da TR do HIV-1.

ABSTRACT

The new ribonucleosides 8-methyl-dipyrzolo-pyridinone were prepared and evaluated on the catalytic activity of recombinant reverse transcriptase (RT) of HIV-1 and human DNA polymerases α and ϵ . Some of them inhibited the RT activity at micromolar concentrations, whereas

they were not able to inhibit the human placental DNA polymerase.

Key words: ribonucleosides, antiviral, reverse transcriptase.

Endereço para correspondência:
Universidade Federal Fluminense - Campus do Valonguinho
CEP 24020-140 - Niterói-RJ

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALTHAUS, I.W. *et al.* The quinoline U-78036 is a potent inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase. *The Journal of Biological Chemistry*, 268: 14.875-80, 1993.
2. ARTS, J.E. & WAINBERG, M.A. Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and early events in reverse transcription. *Advanced in Virus Research*, 45: 97-163, 1996.
3. BOYER, P.L., *et al.* Mutational analysis of the fingers domain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Journal of Virology*, 66:7.533-37, 1992.
4. BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, 72 :248-54, 1976.
5. CARROLL, S. *et al.* Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by pyridinone derivatives, 268:276-81, 1992.
6. GU, Z., *et al.* Possible involvement of cell fusion and viral recombination in generation of human immunodeficiency virus variants that display dual resistance to AZT and 3TC. *Journal of General Virology*, 76: 2.601-05, 1995.
7. HIZI, A. *et al.* Mutational analysis of the DNA polymerase and ribonuclease H activities of human immunodeficiency virus type 2 reverse transcriptase expressed in escherichia coli. *Virology*, 180:339-46, 1991.
8. HOTTIGER, M. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Biol. chem.*, Hoppe-Seyler, 377:97-120, 1996.
9. LEE, M.Y.W.T., *et al.* Characterization of human DNA polymerase δ and its immunochemical relationships with DNA polymerase α and ϵ . *J. Biol. Chem.*, 266: 2.423-29, 1991.
10. PERACH, M., *et al.* Resistance to nucleoside analogs of selective mutants of human immunodeficiency virus type 2 reverse transcriptase. *Journal of Virology*, 69:509-12, 1995.
11. SHIRASAKA, T., *et al.* Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleotides in patients receiving therapy with dideoxynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:2.398-402, 1995.
12. SOBOL, R.W., *et al.* Inhibition of HIV-1, replication and activation of Rnase I by phosphorothioate/phosphordiester 2',5'-oligoadenylate derivatives. *The Journal of Biological Chemistry*, 270:5963-5978, 1995.
13. TAN, C.K., *et al.* Inhibition of Rnase H activity reverse transcriptase by azidothymidylate. *Biochemistry*, 30:4831-4834, 1991.
14. ZANG, P. *et al.* Overexpression of DNA polymerases delta in vaccinia virus system. *Journal of Biological Chemistry*, 270:1-6, 1995.

SUA CHANCE DE TER OS SLIDES E LIVROS DE DST PROF. MAURO ROMERO LEAL PASSOS

Por apenas 3 x 75,00 você recebe:

- 1) Livro texto 4ª. edição DST - Doenças Sexualmente Transmissíveis
552 páginas, 194 figuras coloridas, 51 capítulos, 1995.
- 2) 18 slides coloridos sobre casos das principais DST
(gonorréia, sífilis, cancro mole, linfogranuloma venérico, donovanose,
herpes genital e condiloma acuminado).
- 3) Três livros infantis do autor, da série Ler e Colorir: Kid Injeção;
Mamãe Barriguda; Maria Coça-Coça.

Vendas: Editora Cultura Médica Ltda® - Rua São Francisco Xavier, 111 - CEP 20550-010
Tijuca - Rio de Janeiro-RJ - (Fax): (021) 264-3443 - Tel.:(021) 567-3888