

MARILENA BEZERRA JUCÁ

INIBIDORES DE TRANSCRIPTASE REVERSA DE VÍRUS DE MIELOBLASTOSE DE AVES

Este exemplar corresponde à redação final
da tese de doutorado (assinado candidato a)
Marilena Bezerra Jucá
e aprovada pela comissão julgadora.

05/06/98 - Hiroshi Aoyama

**Tese de Doutorado apresentada ao
Departamento de Bioquímica do
Instituto de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas.**

**ORIENTADOR
Prof. Dr. HIROSHI AOYAMA
Depto. de Bioquímica
UNICAMP.**

CAMPINAS - SP

1998



3816444

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
T/Unicamp	
J877i	
Vj	Ex.
TOMBO BC/	34787
PROD.	395/98
C ☐	D ☒
PREÇO	R\$ 14,00
DATA	12/08/98
N.º CPD	

CM-00115351-8

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

J877i Jucá, Marilena Bezerra
Inibidores de transcriptase reversa de vírus de
mieloblastose de aves / Marilena Bezerra Jucá.
Campinas, SP : [s.n.], 1998.

Orientador: Hiroshi Aoyama.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia.

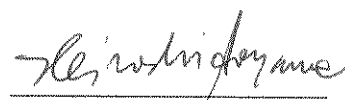
1. Enzimas - Inibidores. 2. Cinética de enzimas.
3. DNA polimerases. 4. Reação em cadeia de polimerase.
I. Aoyama, Hiroshi. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 05 de junho de 1998

BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

Prof. Dr. HIROSHI AOYAMA



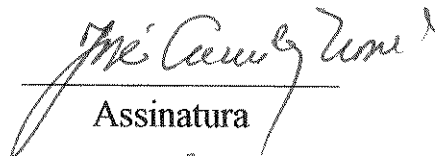
Assinatura

Profa. Dra. HÉLIA HARUMI SATO



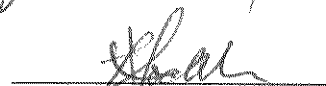
Assinatura

Prof. Dr. JOSÉ CAMILLO NOVELLO



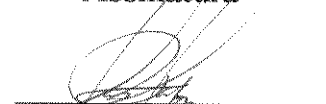
Assinatura

Prof Dr. LADASLAV SODEK



Assinatura

Profa. Dra. MARIA RISOLETA FREIRE MARQUES



Assinatura

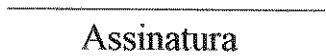
SUPLENTES:

Prof. Dr. JOSÉ MAURO GRANJEIRO



Assinatura

Profa. Dra. SATIE HATSUSHIKA OGO



Assinatura

Ao Luciano, meu esposo, pelo incentivo, paciência e carinho, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Caio, meu filho, pelo carinho e admiração.

Aos meus pais, Armando e Maria Helena e aos meus tios, Jorge (in memoriam) e Leilah, pela oportunidade e estímulo para chegar até aqui.

Aos meus irmãos, Eliana, Regina, Francisco Armando, Solange e Grace, pela amizade e admiração.

Ao Sr. Alípio e à Sra. Odila , pela ajuda, carinho e amizade.

Dedico este trabalho

Agradecimentos

Ao Prof. Hiroshi Aoyama, pela orientação e grande amizade. Agradeço também pela dedicação, discussões, observações e exemplo de profissionalismo, extremamente importantes para o aprimoramento da minha formação profissional e para a realização deste trabalho.

Ao Mauro e à Carmen, pela amizade, estímulo constante e agradável convivência.

Aos Profs. Satie H. Ogo, José Camillo Novello e Hélia Harumi Sato, pela revisão criteriosa e sugestões no Exame de Qualificação.

À Mariza, Sônia, Paulo Granjeiro, Paulo Castilho, Angélica, Marília, Isabelle, Thelma, Ana Cláudia, André, Márcio, Alexandre, Patrícia, Cínthia, Erika, Renata, Andrea, pela amizade.

A todos os amigos do curso de Pós-Graduação em Bioquímica, pelo convívio agradável.

À Marina, Mírian e Andréia, pela convivência agradável e auxílio na secretaria e demais funcionários.

Aos demais colegas e amigos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À FAEP/UNICAMP, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro para a compra de material permanente e de consumo em projetos de pesquisa aprovados.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Ciclo de Vida de Retrovírus	2
1.2 Enzimas Retrovirais	3
1.3 Transcriptase Reversa.....	4
1.4. Matrizes e Iniciadores	6
1.5. Inibidores	7
1.5.1 Novobiocina e Brometo de Etídeo	13
1.5.2 Inibidores Naturais.....	14
1.5.3 Compostos Platínicos	15
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
2.1 Material	17
2.2 Métodos	17
2.2.1 Preparação de DNA Ativado	17
2.2.2 Preparação de Matrizes-Iniciadores Sintéticos.....	18
2.2.3 Determinação das Atividades Enzimáticas	18
2.2.3.1 DNA Ativado.....	19
2.2.3.2 Polinucleotídeos Sintéticos	19
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
3.1 Efeito de Novobiocina.....	20
3.2 Efeito de Brometo de Etídeo e Tetrametil Brometo de Etídeo	24
3.3 Alcalóides Solúveis em Água	41
3.3.1 Metoximetilvoacalotina (trabalho publicado, Anexo II).....	43
3.3.2 Laurifolina.....	46
3.4 Solubilidade de Alcalóides em DMSO	56
3.4.1 Efeito de Solventes.....	56
3.4.2 Estudos com DMSO (trabalho publicado, Anexo III).....	59
3.4.3 Alcalóides Solúveis em DMSO	64
3.4.4 Estudo do Alcalóide Erisodina	66
3.5 Efeito de Compostos Platínicos	69
3.6 Dificuldades encontradas.....	85
4. CONCLUSÕES.....	86
5. PERSPECTIVAS.....	88
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
7. ANEXOS.....	107
7.1 Anexo I: ESTRUTURA DOS COMPOSTOS UTILIZADOS.....	107
7.2 ANEXO II	112
7.3 ANEXO III.....	117

ABREVIATURAS

AMV	Vírus de Mieloblastose de Aves
ASLV	Vírus da Leucemia de Sarcoma de Aves
AZT	3'-Azido- 3'-desoxitimidina
BCP	2,9-Dimetil-4,7-difenil-1,10 fenantrolina (bactocuproina)
BrEt	Brometo de Etídeo
BSA	Albumina de Soro Bovino
CBDCA	1,1'-Ciclobutano Dicarboxilato
ddC	2', 3'- Didesoxicitidina
d4C	2',3'-Didehidro-2',3'-didesoxicitidina
ddI	2', 3'- Didesoxinosina
DDDP	DNA Polimerase DNA-Dependente
dNTP	Desoxinucleosídeo 5'-trifosfato
DPP	2,3-Bis (2-piridil) Pirazina
d4T	2',3'-Didehidro-2',3'-didesoxitimidina ou stavudine
DTT	Ditiotreitol
EtMal	Etilmalonato
HEPT	[1- (2-Hidroxietoxi) metil]-6- (feniltio)-timina
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo-1
HIV-2	Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo-2
HPA-23	Heteropolianion 23 (amonio 21-tungsto-9-antimoniato)
K_i	Constante de inibição
K_m	Constante de Michaelis-Menten
K_p	Constante de Michaelis-Menten na presença de inibidor

MuLV	Vírus da Leucemia Murina
Oligo(dG) ou (dG)₁₂	Oligo desoxiguanilato
Oligo(dT) ou (dT)₁₂	Oligo desoxitimidilato
Poli(Am)	Ácido poli (2'-O-metil-2'-desoxiadenílico)
Poli(dAFI)	Ácido poli (2'-fluor-2'-desoxiadenílico)
Poli(rA)	Ácido polirriboadenílico
Poli(Cm)	Ácido poli (2'-O-metil-2'-desoxicitidílico)
Poli(rC)	Ácido polirribocitidílico
Pt(NH)₂ (CBDCA)	Carboplatina
RDDP	DNA Polimerase RNA-Dependente
RNase H	Ribonuclease H
STSPY	2-[5,6-Bis (4-sulfonil)-1,2,4-triazina- 3-il]- 4- (4-sulfonil) piridina
3TC	(-)-2'-Desoxi-3'-tiacitidina ou lamivudine
TIBO	[4,5,1- <i>jk</i>][1,4]Benzodiazepina-2-(1H)-one e tiona
TMBrEt	Tetrametil Brometo de Etídeo
TR	Transcriptase Reversa
TSAO	[2',5'-bis-O-(Tert-butilmetil-silil)-3-spiro-5'-(4'-amino-1',2'-oxatíole-2',2'-dióxido
V	Velocidade máxima
V_p	Velocidade máxima na presença de inibidor

RESUMO

O bloqueio da replicação retroviral é realizado principalmente através da inibição da transcriptase reversa. Novobiocina, brometo de etídeo, tetrametil brometo de etídeo, os alcalóides metoximetilvoacalotina, laurifolina e erisodina e o composto platínico Pt(BCP)(CBDCA) inibiram a atividade DNA polimerase da transcriptase reversa de vírus de mieloblastose de aves (TR de AMV). Independentemente da matriz utilizada: DNA ativado, poli(rA)(dT)₁₂ e poli(rC)(dG), 0,5 mM de novobiocina inibiu 50% da atividade enzimática (IC₅₀). O valor de IC₅₀ para DNA polimerase α era o mesmo obtido para transcriptase reversa, significando que a droga não era específica para a enzima viral. A inibição por brometo de etídeo dependia do grupo substituinte na posição 2' do açúcar, onde a substituição de OH por Fluor no derivado poliadenílico como matriz, tornava a reação catalisada por transcriptase reversa menos susceptível à ação deste inibidor. Este padrão de inibição também foi observado com o composto platínico Pt(BCP)(CBDCA). Tanto para brometo de etídeo quanto para o seu análogo tetrametil brometo de etídeo, inibições mais eficientes foram obtidas quando se utilizou análogos de poli(rA)(dT)₁₂ como matrizes. A eficiência da inibição pelos derivados etídeos era dependente da matriz poli(rA)(dT)₁₂, poli(dAFI)(dT)₁₂, poli(Am)(dT)₁₂, poli(dA)(dT)₁₂ e do cátion divalente (Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺) utilizado. O efeito inibitório do alcalóide metoximetilvoacalotina foi alterado pela natureza da matriz-iniciador tendo-se obtido os seguintes valores de IC₅₀, 5,0; 3,5 e 1,0 mM para poli(rA)(dT)₁₂, DNA ativado e poli(rC)(dG)₁₂, respectivamente. O alcalóide laurifolina inibiu consideravelmente a TR de AMV mas não houve alterações significativas quando a matriz-iniciador poli(rA)(dT)₁₂ foi substituída por poli(dAFI)(dT)₁₂ como também quando Mg²⁺ foi substituído por Mn²⁺. Laurifolina é um inibidor não competitivo e, provavelmente, liga-se à enzima com alta afinidade (K_i = 0,66 μ M). Laurifolina é, portanto, um efetivo inibidor da TR de AMV e um promissor agente antiretroviral. O alcalóide erisodina apresentou uma inibição mais apreciável na reação de TR dirigida por poli(rA)(dT)₁₂. DMSO ativou a TR de AMV até a concentração de 4%. A maiores concentrações, este solvente inibiu a enzima em presença de poli(rA)(dT)₁₂ e DNA ativado. Com poli(dAFI)(dT)₁₂ esta ativação alcançou um máximo à 20% de DMSO, inibindo a maiores concentrações. O efeito ativador do DMSO pode estar relacionado com o decréscimo do valor de K_m de 9,1 μ g/ml na ausência do solvente para 3,3 μ g/ml na presença do solvente. DMSO não protegeu a TR da inativação durante quatro horas à 0°C. Oito compostos platínicos foram analisados. Pt(BCP)(CBDCA) inibiu consideravelmente a enzima tendo discriminado a atividade DNA polimerase RNA-dependente (RDDP) da atividade DNA polimerase DNA-dependente (DDDP). Análises cinéticas revelaram que o tipo de inibição da TR de AMV para os compostos estudados era não competitiva, com exceção do alcalóide erisodina e do composto platínico Pt(BCP)(CBDCA) que apresentaram uma inibição competitiva em relação a poli(rA)(dT)₁₂ e dTTP, respectivamente.

SUMMARY

The blockage of retroviral replication is performed mainly through the reverse transcriptase inhibition. Novobiocin, ethidium bromide, tetramethyl ethidium bromide, the alkaloids methoxymethylvoachalotine, laurifoline, erisodine, and the platinum compound Pt(BCP)(CBDCA) inhibited the DNA polymerase activity of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (AMV RT). Independently of the template used: activated DNA, poly(rA)(dT)₁₂ and poly(rC)(dG)₁₂, 0.5 mM novobiocin inhibited 50% of the enzyme activity (IC₅₀). This drug was not specific for the viral enzyme since the IC₅₀ value for DNA polymerase α was similar to that obtained for reverse transcriptase. The inhibition of RT by ethidium bromide depended on the 2'-substituent in the sugar moiety, where the substitution of OH by fluorine on the template polyadenilic acid (poly A), became the reaction catalyzed by reverse transcriptase less sensitive to the action of this inhibitor. A similar pattern of the inhibition also was observed with the platinum compound Pt(BCP)(CBDCA). Ethidium bromide and its analog tetramethyl ethidium bromide more efficiently inhibited the reaction, when poly(A) analogs were used as templates. The efficiency of inhibition for the ethidium derivatives was dependent on the templates poly(rA)(dT)₁₂, poly(dAFl)(dT)₁₂, poly(Am)(dT)₁₂, poly(dA)(dT)₁₂ and on the divalent cations (Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺) utilized. The inhibitory effect by the alkaloid methoxymethylvoachalotine was also template-primer dependent and the following IC₅₀ values were obtained: 5.0; 3.5 and 1.0 mM for poly(rA)(dT)₁₂, activated DNA and poly(rC)(dG)₁₂, respectively. The alkaloid laurifoline considerably inhibited the AMV RT but there were no significative differences when the template-primer poly(rA)(dT)₁₂ was substituted for poly(dAFl)(dT)₁₂ and when Mg²⁺ was substituted for Mn²⁺. Laurifoline was a non-competitive inhibitor and, probably binds to the enzyme with high affinity (K_i = 0.66 μ M). Therefore, laurifoline, an effective inhibitor for the AMV RT, could be a promising antiretroviral agent. The alkaloid erisodine showed a more appreciable inhibition on the poly(rA)(dT)₁₂-directed RT reaction. DMSO activated the AMV RT at concentrations up to 4%. At higher concentrations, this solvent inhibited the enzyme in the presence of poly(rA)(dT)₁₂ or activated DNA. With poly(dAFl)(dT)₁₂ this activation reached a maximum at 20% DMSO, inhibiting at higher concentrations. The activator effect of DMSO could be related to a decrease in the K_m value from 9.1 μ g/ml in the absence to 3.3 in the presence of the solvent. DMSO did not protect the RT from inactivation, during four hours, at 0°C. From eight platinum compounds analyzed, Pt(BCP)(CBDCA) considerably inhibited the enzyme activity, discriminating the RNA- from the DNA-dependent DNA polymerase activities. Kinetic analysis revealed that, with the exception of the alkaloid erisodine and the platinum compound Pt(BCP)(CBDCA) that presented competitive inhibitions relation to poly(rA)(dT)₁₂ and dTTP, respectively, the inhibitions of the AMV RT by the other compounds studied in this work were of the non-competitive type.

1. INTRODUÇÃO

As DNAs polimerases catalisam o processo de síntese de DNA a partir de matriz-iniciador e dos quatro desoxinucleosídeos trifosfato (KORNBERG, 1980; FRY, 1981; WANG, 1991). A reação básica de polimerização catalizada por DNA polimerases é apresentada no seguinte esquema:



Neste esquema, um dNTP é adicionado a um DNA de n nucleotídeos para dar um produto de $n + 1$ nucleotídeos.

Pelo menos cinco DNA polimerases distintas, alfa, beta, gama, delta e epsolon foram isoladas de organismos eucarióticos (FRY, 1981; WONG et al., 1989). DNA polimerase alfa é responsável pela replicação do DNA cromossomal; a DNA polimerase beta está envolvida no processo de reparo de DNA; a DNA polimerase gama participa da iniciação da síntese de DNA *in vitro* ou na síntese de DNA mitocondrial; a DNA polimerase delta (WANG, 1991) participa da síntese de uma das fitas do DNA, e a DNA polimerase epsolon pode também ser necessária para a replicação cromossomal (BUDD & CAMPBELL, 1993).

Além destas DNA polimerases celulares, outras DNA polimerases aparecem nas células após infecção viral, sendo mais conhecidas como transcriptases reversas (SARNGADHARAN et al., 1978; VERMA, 1981; GERARD, 1983; VARMUS, 1988; AOYAMA, 1988). Transcriptase reversa pode também ser encontrada na literatura como DNA polimerase RNA-dependente, DNA polimerase RNA-dirigida e DNA polimerase de vírus de RNA tumoral. Estas enzimas são encontradas em retrovírus e têm sido caracterizadas em diferentes vertebrados. Pesquisas com o vírus de mieloblastose de aves tem proporcionado uma grande contribuição nesta área. Porém, um forte e produtivo interesse acadêmico pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), o agente etiológico da epidêmica síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), e outras doenças com etiologia retroviral, tem acelerado pesquisas nesta área.

A descoberta da transcriptase reversa por TEMIN e MIZUTANI (1970) e por BALTIMORE (1970) demonstrou que a informação genética pode fluir de RNA para o DNA. Esta descoberta contrariou, assim, o “Dogma Central da Biologia Molecular”, onde o fluxo da informação genética era unidirecional, indo de DNA para RNA (transcrição) e depois para proteína (tradução).

1.1 CICLO DE VIDA DE RETROVÍRUS

O vírus de mieloblastose de aves pertence à sub-família dos lentivírus de retrovírus. Neste grupo de vírus também se encontram o vírus da imunodeficiência humana tipo-1 e tipo-2 (HIV-1 e HIV-2, respectivamente), o vírus da imunodeficiência de macaco, bovina, felina, o vírus “visna-maedi” de carneiro e vírus da encefalite caprina. Todos os vírus desta sub-família possuem características estruturais, genéticas e biológicas comuns como uma alta frequência de mutação, replicação em células do sistema imune e, em muitos casos, um longo período de incubação que precede a manifestação da doença (MONTAGNIER et al., 1984; NARAYAN & CLEMENTS, 1990; MONTELARO et al., 1991).

Retrovírus são uma família de pequenos vírus animais de aproximadamente 110 nm de diâmetro, compostos de uma parte interna envolvida por um envelope externo formado de uma bicamada lipídica de origem celular onde estão ancoradas glicoproteínas virais. A parte interna é formada por moléculas de proteínas capsídicas (CA) envolvendo o genoma de RNA e moléculas de transcriptase reversa e integrase (DARLIX et al., 1995, para revisão). Estes codificam enzimas [protease (PR), transcriptase reversa (TR), ribonuclease H (RNase H) e integrase (IN)] que catalisam as etapas essenciais do ciclo infeccioso.

O genoma do retrovírus codifica todas as proteínas requeridas para a sua replicação. As proteínas do capsídio são derivadas do gene *gag*; as enzimas (protease, transcriptase reversa, integrase e endonuclease) são codificadas pelo gene *pol*, as glicoproteínas do envelope viral e proteínas transmembranas são derivadas do gene *env* e o gene *src* codifica a proteína quinase, responsável pela transformação tumoral. No genoma do HIV foi encontrado outros genes denominados: *sor*, que junto com as proteínas do envelope, determinam a infectividade da partícula viral; *tat*, que ativa a expressão do longo terminal repetido (LTR); *tr�* e *3'orf*, que servem como reguladores da expressão viral (BISHOP, 1985; GEORGIEV & MCGOWAN, 1990).

O primeiro evento no ciclo de vida do retrovírus é a adsorção do vírion na superfície da célula. Ainda no estágio inicial de infecção de células CD4⁺ por vírus de tumor de RNA, a transcriptase reversa replica o genoma de RNA simples-fita à DNA dupla-fita, através de um híbrido RNA-DNA como um intermediário. O DNA é circularizado (DNA proviral) e transportado para o núcleo, onde é integrado ao genoma do hospedeiro. Este DNA é, então, transcrito por uma RNA polimerase celular DNA-dependente. Transcriptase reversa não se encontra nas células hospedeiras sendo, portanto, um excelente alvo para o bloqueio da replicação viral através de

inibidores específicos. Uma vez no citoplasma, o mRNA viral, contendo ácido poliadenílico serve como mensageiro para a síntese de proteínas virais e encapsidação por proteínas vírus-específicas. Desde que retrovírus possuem suas próprias proteases para maturação, estas enzimas são alvos atrativos para drogas anti-virais. Os vírions maduros movem-se para a superfície da célula adquirindo um envelope externo (GERARD, 1983; KATZ & SKALKA, 1994, para revisão).

É estimado que há 50-100 moléculas de TR por vírion mas não foi ainda esclarecido se uma ou mais moléculas de enzima contribui para a formação de uma cópia de DNA simples-fita (MAJUMDAR et al., 1988).

Embora o vírus de mieloblastose de aves difira do vírus da imunodeficiência humana na constituição genética, todos os retrovírus são idênticos com relação às etapas iniciais da replicação: adsorção, penetração, transcrição reversa e integração do DNA proviral (BILELLO et al., 1990)

1.2 ENZIMAS RETROVIRAIS

Retrovírus codificam, pelo menos, quatro atividades: (a) protease(PR), as atividades (b) polimerase e (c) ribonuclease H (RNase H) da transcriptase reversa e (d) integrase (IN). Estas atividades são requeridas para maturação proteolítica da partícula viral (PR), transcrição do RNA viral à DNA(polimerase e RNase H) e integração do DNA viral no cromossomo da célula hospedeira (IN) (KATZ & SKALKA, 1994). Existe também uma inter-relação entre estas enzimas: TR e IN dependem do processamento de precursores poliproteicos realizado pela PR; TR produz o DNA viral que serve como substrato para a IN.

As PRs retrovirais pertencem a classe das aspartil proteases onde também se encontram as bem caracterizadas enzimas celulares: pepsina, quimiotripsina e renina. Estas enzimas também são codificadas pelo gene pol do retrovírus e são promissores alvos para terapia da infecção do HIV. Pequenos peptídeos sintéticos podem ser usados como substrato. Para as proteases dos ASLV e HIV-1 é necessário um peptídeo de, no mínimo, sete aminoácidos para que ocorra o reconhecimento e clivagem. Alguns peptídeos de seis, ou menos aminoácidos podem agir como inibidores competitivos (ROBERTS et al., 1990).

Outra etapa importante no ciclo de vida de retrovírus, realizada pela enzima integrase, é a integração do DNA viral no cromossomo da célula hospedeira. O DNA viral integrado é então, transcrito pela RNA polimerase II do hospedeiro para produzir o genoma do RNA viral e mRNAs necessários para completar o ciclo de replicação. A

integração é sítio-específica com relação ao DNA viral (ocorre na extremidade do DNA linear), mas é aleatória com relação ao DNA do hospedeiro. Desde que TR e IN funcionam sequencialmente, é possível que estas enzimas possam agir como um complexo (HU & TEMIN, 1990).

Transcriptase reversa catalisa a síntese de DNA dupla-fita proviral, a partir do RNA genômico retroviral simples-fita (VERMA, 1981; GERARD, 1983; WEISS et al., 1985; AOYAMA, 1988; VARMUS, 1988). Esta é uma etapa essencial no ciclo de vida retroviral. A TR é uma enzima multifuncional, apresentando três atividades enzimáticas em uma única molécula [DNA polimerase RNA-dependente (RDDP), DNA polimerase DNA-dependente (DDDP) e ribonuclease H (RNase H)]. No processo de transcrição reversa, inicialmente, o RNA viral (fita +) é transcrito em DNA fita-simples (-) pela atividade DNA polimerase RNA-dependente da TR. Em seguida, a matriz RNA é hidrolisada pela atividade ribonuclease H da enzima. Esta função é responsável pela degradação de RNA somente quando este está na forma de heteroduplexes RNA-DNA (GOFF, 1990). Finalmente, o DNA (-) serve como matriz para a síntese da segunda fita de DNA, catalisada pela atividade DNA polimerase DNA-dependente (HIZI et al., 1991). Inibição de cada uma destas atividades impede a replicação viral em células infectadas. Todas as funções catalíticas de TRs retrovirais são consideradas essenciais para o complicado processo de transcrição reversa, sem nenhuma homologia em células normais. Portanto, esta enzima é um importante alvo para tratamentos quimioterápicos específicos de infecções retrovirais, especialmente aqueles do vírus da imunodeficiência humana (HIV), o agente etiológico da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (MITSUYA et al., 1990).

1.3 TRANSCRIPTASE REVERSA

A transcriptase reversa (E.C. 2.7.7.7) (TR), uma enzima chave no ciclo de vida de retrovirus e específica de vírus de RNA (retrovírus), é o melhor alvo molecular para a terapia de doenças retrovirais. Muito do que se conhece a respeito de transcriptase reversa é derivado de estudos com vírus de mieloblastose de aves, com vírus da leucose-de sarcoma de aves e, em um menor número, com vírus da leucemia murina e vírus da leucemia murina de Moloney (GERARD, 1983; ORLANDO et al., 1996). Atenção especial tem sido dada à transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana devido a epidemia mundial da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (KATZ & SKALKA, 1994). Portanto, considerações a respeito desta enzima também serão feitas neste estudo. TR de vírus de mieloblastose de aves é utilizada neste estudo como um modelo de DNA polimerase viral.

A transcriptase reversa de vírus de mieloblastose de aves é uma enzima heterodimérica composta por duas subunidades estruturalmente relacionadas de 65 kDA (α) e 95 kDA (β) e como a transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana apresenta as três atividades organizadas em dois domínios distintos. TR do vírus da leucemia murina e vírus da imunodeficiência de felinos são monoméricas (KORNBERG & BAKER, 1992).

A TR de HIV-1 é um heterodímero composto das subunidades de 66 e 51 kDA (p66 e p51). A sub-unidade p66 apresenta as duas atividades DNA polimerase no domínio N-terminal e a atividade RNase H no domínio C-terminal. A p51 é derivada da clivagem proteolítica do domínio C-terminal da subunidade p66 pela protease do HIV-1 e desempenha um papel alostérico, estabilizando e ativando a subunidade p66 (HIZI et al., 1991; JACOBO-MOLINA & ARNOLD, 1991). O polipeptídeo p51 corresponde ao domínio polimerase da p66, que consiste dos primeiros 440 aminoácidos da p66 (GOFF, 1990; JACOBO-MOLINA & ARNOLD, 1991). Os sub-domínios com o domínio polimerase de cada subunidade foram denominados dedos ("fingers"), palma ("palm"), polegar ("thumb") e conexão ("connection") (KOHLESTAEDT et al., 1992). Os outros 120 resíduos de aminoácidos do C-terminal da p66 corresponde ao domínio RNase H. A disposição dos sub-domínios nas duas subunidades é completamente diferente. Na p66, os sub-domínios formam uma fenda onde se liga a matriz-iniciador. O 3'-OH livre do iniciador fica próximo aos resíduos de ácido aspártico do sítio ativo da polimerase na p66. Na p51 os sub-domínios estão enovelados de tal forma que não há fenda de ligação da matriz-iniciador e os resíduos do sítio ativo estão encobertos (JACOBO-MOLINA et al., 1993). Há, portanto, somente um sítio ativo de polimerase funcional por heterodímero p66/p51. Devido ao fato de que a p51 é um produto proteolítico da p66 (ou de algum precursor polipeptídico maior), mutações dos aminoácidos na porção do genoma do HIV que codifica o domínio polimerase provoca substituições nas duas subunidades.

TR catalisa a incorporação de desoxinucleosídeos 5'-trifosfato nas matrizes RNA ou DNA. O AZT, que é convertido à forma trifosfato (AZTTP) por quinases celulares, é capaz de inibir a replicação viral *in vivo* e a TR *in vitro* (FURMAN et al., 1986; MITSUYA et al., 1990). Estudos da interação enzima-inibidor, com o objetivo de facilitar o projeto de drogas antivirais, têm contribuído muito para o esclarecimento do mecanismo catalisado pela transcriptase reversa. A TR apresenta um mecanismo sequencial ordenado na reação de síntese de DNA. A enzima liga-se, inicialmente, à matriz-iniciador ("template-primer") e em seguida o desoxinucleosídeo trifosfato liga-se ao complexo binário através do 3'-OH livre do iniciador, formando o complexo matriz-iniciador-enzima-dNTP (MAJUMDAR et al., 1988). Este mecanismo

relativamente simples foi especificado mais recentemente (RITTINGER et al., 1995; JAJU et al., 1995), sugerindo um processo em duas etapas nos dois casos.

1.4 MATRIZES E INICIADORES

Transcriptase reversa catalisa a incorporação de desoxinucleosídeos 5'-trifosfato nas matrizes RNA ou DNA. Como outras DNA polimerases, esta enzima necessita de uma matriz ou molde ("template") e de um iniciador ("primer") com uma extremidade 3'-OH livre para formar a ligação fosfodiester com o substrato (dNTP) dando início à síntese de DNA (GERARD, 1983; VERMA, 1981). Além dos sítios ativos para as atividades polimerase e RNase H, as TRs contêm regiões onde se ligam a matriz e o iniciador. A matriz natural é o RNA genômico viral (RNA 70 S), e o iniciador natural é um tRNA (FARAS & DIBBLE, 1975; ARAYA et al., 1980). Diferentes tRNAs são utilizados por diferentes retrovírus, e sua identidade pode ser deduzida da complementaridade da sequência de ligação do iniciador ("PBS-primer-binding site"). Para o AMV o iniciador é um tRNA específico para o triptofano (tRNA^{trp}) (TAYLOR, 1977). Para o MuLV e o HIV, o iniciador é um tRNA específico para a prolina (HARADA et al., 1979) e lisina (WAIN-HOBSON et al., 1985), respectivamente. O tRNA^{lis} liga-se às duas subunidades da TR de HIV-1 e a forma heterodimérica é a mais ativa na ligação deste tRNA (RICHTER-COOK et al., 1992). Os determinantes envolvidos na seleção do tRNA específico não estão completamente esclarecidos.

Durante a síntese de DNA, o RNA genômico do duplex RNA-DNA é degradado por uma atividade ribonuclease especial denominada RNase H, associada com as moléculas de transcriptase reversa. Quando ocorre a síntese da primeira fita de DNA, uma porção do RNA que é resistente à clivagem pela RNase H, chamada trato polipurínico, serve como iniciador para a síntese da segunda fita de DNA. Este processo requer a atividade DNA polimerase DNA-dependente da TR (GOFF, 1990).

O DNA dupla-fita não pode ser usado como matriz, desde que sejam introduzidos grupos 3'-OH livres, através da ação de DNase I. Este DNA que sofre a ação da DNase I, permanecendo em dupla-fita e contendo grupos 3'-OH livres é denominado DNA ativado (APOSHIAN & KORNBERG, 1962).

As transcriptases reversas podem também utilizar polinucleotídeos como matrizes sintéticas, sendo também necessária a presença de um iniciador (BALTIMORE & SMOLER, 1972). A eficiência e utilidade destas matrizes modelo foram provadas, embora difiram consideravelmente do complexo matriz-iniciador natural. Estudos cinéticos com HIV indicam que o reconhecimento da matriz-iniciador envolve uma interação de alta afinidade (MAJUMDAR et al., 1989). Homopolímeros

sintéticos como o ácido polirriboadenílico e ácido polirribocitidílico são mais eficientes que DNA ou RNA naturais como matrizes de transcriptase reversa. Embora ribo e desoxiribonucleotídeos possam servir como iniciadores, os últimos são consideravelmente mais eficientes. Para matrizes homopoliméricas, o iniciador usado é sempre um desoxirribonucleotídeo complementar. Por exemplo, se poli(A) é a matriz, somente um oligômero de T pode agir como iniciador. O iniciador proporciona, portanto, a extremidade 3'-OH livre para formar a ligação fosfodiéster com o substrato dando início à síntese de DNA (GERARD, 1983; VERMA, 1981; AOYAMA, 1988, para revisão). Muitos estudos *in vitro* com o intuito de distinguir as DNA polimerases virais das DNA polimerases celulares (GOODMAN & SPIEGELMAN, 1971) utilizam oligonucleotídeos curtos. O RNA 70 S de vírus de mieloblastose de aves, que possui sequências de poli A, necessitam oligo(dT) como iniciador, enquanto que o RNA do vírus do mosaico amarelo do nabo utiliza mais eficientemente oligo (dG) como iniciador (AOYAMA, 1985a).

Poli(rC)(dG)₁₂ é uma matriz para DNA polimerase de vírus, mas é pouco eficiente em reações catalisadas por DNA polimerases celulares. Derivados 2'-fluorados de poli A e poli C servem como matrizes para a transcriptase reversa. O íon divalente preferencial para uma maior eficiência do reverso da transcrição é o Mg^{2+} embora esta reação também possa ocorrer em presença de Mn^{2+} . Substituição de Mg^{2+} por Mn^{2+} , como cátion divalente, pode modificar a eficiência de polinucleotídeos 2'-substituídos como matrizes de transcriptase reversa (AOYAMA et al., 1985; AOYAMA, 1985b).

1.5 INIBIDORES

Os compostos que inibem DNA polimerases virais podem ser classificados em:

- a) compostos que se ligam à enzima, como derivados de rifamicina;
- b) compostos que se ligam à matriz, como adriamicina e daunomicina;
- c) análogos de substratos, como arabinosil-CTP, dialdeído-ATP, didesoxi-TTP;
- d) análogos de matrizes-iniciadores, como derivados de timidilato e polinucleotídeos modificados.
- e) quelantes de Zn^{2+} , desde que as DNA polimerases virais são zincometaloenzimas. Estes inibidores provocam uma rápida degradação do DNA.

Com relação a transcriptase reversa, somente cinco inibidores foram aprovados para o tratamento da infecção do HIV, sendo todos, análogos de nucleosídeos (HITCHCOCK, 1991). Estes são: a) 3'-azido-2',3'-didesoxitimidina ou zidovudine (AZT) e b) 2',3'-didehidro-2',3'-didesoxitimidina ou stavudine (d4T), que são análogos de desoxitimidina; c) 2',3'-didesoxinosina ou didanosine (ddI), análogo de desoxiadenosina; d) 2',3'-didesoxicitidina ou zalcitabine (ddC) e e) (-)-2'-desoxi-3'-tiacitidina ou lamivudine (3TC), que são análogos de desoxicitidina.

Apesar de consideráveis esforços para o desenvolvimento de drogas antivirais que efetivamente inibam etapas chave da replicação de retrovírus, os primeiros compostos que foram aprovados clinicamente são inibidores de transcriptase reversa (CONNOLLY & HAMMER, 1992). Os análogos de nucleosídeos AZT, ddI, ddC, d4T e 3TC foram aprovados para o tratamento da infecção do HIV (AHLUWALIA et al., 1987; YARCHOAN et al., 1988,1989; MANSURI et al., 1989; ONO et al., 1989a; HITCHCOCK, 1991; DE CLERCQ, 1994). A séria toxicidade associada com a administração e o uso prolongado destes inibidores (RICHMAN et al., 1987; YARCHOAN et al., 1988; YARCHOAN et al., 1989), e a emergência de cepas virais droga-resistentes (LARDER et al., 1989; ST. CLAIR et al., 1991; RICHMAN et al., 1991; RICHMAN, 1993) enfatizam a urgente necessidade de identificação e desenvolvimento de novas classes químicas e farmacológicas de agentes anti-retrovírus para avaliação clínica separadamente ou combinadas com outros agentes anti-retrovirais. Compostos naturais também representam uma valiosa fonte de novos compostos na investigação de inibidores específicos de transcriptase reversa com reduzida toxicidade.

Efetivos compostos anti-virais devem inibir o ciclo de replicação de um vírus patogênico mas não o das células hospedeiras. A seletividade de uma droga depende da diferença do metabolismo viral e das células hospedeiras. Muitos agentes retrovirais tem como alvo a enzima transcriptase reversa associada a retrovírus. Muitos inibidores de transcriptase reversa, por exemplo antimoniatungstato (DORMONT et al., 1985) e suramina (ONO et al, 1988a) também inibem DNA polimerases celulares. A natureza não discriminatória destes inibidores contribui para sua toxicidade *in vivo* (ONO et al, 1988b) Portanto, a descoberta e caracterização de agentes capazes de inibir especificamente a transcriptase reversa viral sem provocar uma resposta tóxica é de extrema importância.

Compostos que inibem as atividades DNA polimerase ou RNase H associadas à transcriptase reversa viral tem a capacidade de interferir no processo de replicação e propagação viral. Embora a cura e a erradicação de doenças causadas por retrovírus

não tenham sido ainda alcançadas com agentes que rompem a replicação do genoma viral, estes são considerados extremamente importantes para a melhoria da qualidade de vida e sobrevivência do hospedeiro.

Vários compostos foram relatados como inibidores de transcriptase reversa de HIV-1, podendo ser divididos em dois grupos, de acordo com a sua estrutura e função sobre a polimerase viral (DE CLERCQ, 1992 para revisão; DE CLERCQ, 1994). O primeiro grupo é representado pelos análogos nucleosídicos e o segundo pelos análogos não-nucleosídicos. Os análogos nucleosídicos agem sobre a enzima depois da trifosforilação em células infectadas. Entre estes, podem ser citados: 2',3'-dideoxynucleosídeos (ddNs), como AZT (MITSUYA et al., 1985), ddC, ddI (MITSUYA AND BRODER, 1986), D4C, D4T (BALZARINI et al., 1987; HAMAMOTO et al., 1987; LIN et al., 1987) e nucleosídeos fosfatados acíclicos (NFAs) como: 9-(2-fosfonilmetoxietil)adenina (PMEA), 9-(3-fluor-2-fosfonilmetoxipropil)adenina (FPMMA) e 9-(2-fosfonilmetoxipropil) adenina (PMPA) (PAUWELS et al., 1988; DE CLERCQ, 1991; BALZARINI et al., 1991). Estes compostos interagem especificamente com o sítio catalítico da polimerase viral, como inibidores competitivos com relação à substratos naturais.

Os ddNs e os NFAs, depois de sua conversão intracelular às formas 5'-trifosfatos e 5'-difosfatos ativa, são incorporados ao DNA viral que está sendo sintetizado, provocando interrupção da cadeia (FURMAN et al., 1986). Estes compostos também apresentam uma afinidade significativamente maior para TR de HIV-1, TR de HIV-2 e outras TRs retrovirais do que para DNA polimerases celulares (VRANG et al., 1988; ONO et al., 1989a; KONIG et al., 1989).

Outro grupo estruturalmente diverso de inibidores de TR tem sido reconhecido e é representado pelos análogos não-nucleosídicos (SPENCE et al., 1995). Seu mecanismo de ação não está bem esclarecido. Sua atividade é específica para HIV-1, sem efeito para HIV-2 e outros retrovírus. Entre vários outros podemos citar: TIBO (R82913) e derivados (PAUWELS et al., 1990; DEBYSER et al., 1991; DEBYSER et al., 1992b; PAUWELS et al., 1993; PAUWELS et al., 1994), nevirapine (BI-RG-587) (MERLUZZI et al., 1990; RICHMAN et al., 1991); piridinonas L-697.639 e L-697.661 (GOLDMAN et al., 1991); bis(heteroaril)piperazinas (BHAPs) (ROMERO et al., 1991); derivados de α -anilino-fenilacetamida (α -APA); derivados inofilum (TAYLOR et al., 1994); derivados arilpirido-diazepine e -tiodiazepine (BELLAROSA et al., 1996); MHC-442 (BRENNAN et al., 1995); ingenol triacetato (FUJIWARA et al., 1996); tiocarboxanilídeo e derivados (BARNARD et al., 1997) e hexaprenilhidroquinona (HPH) e derivados (LOYA et al., 1997). Ativação destes

inibidores, como a fosforilação celular (necessária para os inibidores análogos de nucleosídeos), não é necessária porque eles interagem diretamente com a transcriptase reversa (DE CLERCQ, 1992). Estes inibidores agem por inibição alostérica, indicando que seus sítios de ligação são diferentes dos sítios dos substratos nucleosídicos (FRANK et al., 1991; DEBYSER et al., 1992a; TRAMONTANO & CHENG, 1992; WU et al., 1991). A classe de compostos TIBO/nevirapine interage com um sítio alostérico específico de TR de HIV-1, um “pocket” (cavidade) que está próximo mas, distinto do sítio catalítico onde a matriz-iniciador, substratos (dNTPs) e ddN 5'-trifosfatos (ddNTPs) se ligam (WU et al., 1991; KOHLSTAEDT et al., 1992; TANTILLO et al., 1994).

Outra classe de inibidores de TR não-nucleosídico, HEPT (BABA et al., 1989; MIYASAKA et al., 1989) e seus derivados (BABA et al., 1991a; BABA et al., 1991b) e TSAO e seus derivados (BALZARINI et al., 1992a), estão quimicamente relacionados à classe de compostos TIBO/nevirapine, ligando-se ao mesmo “pocket” da enzima viral. Estes compostos também apresentam atividade somente contra HIV-1.

Ao contrário dos análogos nucleosídicos, os inibidores não-nucleosídicos não são bloqueadores de cadeia e não se ligam ao sítio de ligação do dNTP. Estes compostos são inibidores não competitivos de TR de HIV-1 com relação à dNTP e não necessitam de uma prévia conversão intracelular à um metabólito ativo (DEBYSER et al., 1992a; DEBYSER et al., 1992b). Embora estes inibidores apresentem marcantes diferenças estruturais e pertençam a vários grupos químicos, todos eles contêm grupos aromáticos e ligam-se ao mesmo “pocket” aromático da TR de HIV-1. É possível, portanto, que o mecanismo de ação destes compostos seja semelhante. Estes compostos também apresentam baixa toxicidade e poucos efeitos colaterais. Diferentemente dos análogos nucleosídicos, os inibidores não-nucleosídicos são específicos para TR de HIV-1, não inibindo TR de HIV-2 ou polimerases celulares do hospedeiro.

Devido ao mais alto índice de seletividade dos inibidores de TR não-nucleosídicos em relação aos análogos nucleosídicos, estes são compostos potenciais para a terapia da infecção de HIV-1. Porém, cepas resistentes (mutantes) a estas drogas desenvolvem-se rapidamente (2-3 semanas) limitando sua eficiência como único agentes terapêutico (MELLORS et al., 1992). O efeito destas drogas combinadas com outras drogas por curtos períodos de tempo está sendo considerado.

Além dos inibidores nucleosídicos e não nucleosídicos, os oligonucleotídeos modificados são outra classe de inibidores de transcriptase reversa. Estes oligo e polinucleotídeos modificados foram caracterizados como análogos de matrizes (ou

iniciadores) inibitórios para DNA polimerases e têm sido denominados anti-matrizes (TÖKÉS & ARADI, 1996). As anti-matrizes interagem melhor com proteínas (polimerases de ácido nucleico dependentes de matrizes) do que com ácidos nucleicos (efeito anti-sense). Os inibidores desta classe de compostos mais estudados são polinucleotídeos contendo 5-mercaptopiridina (HO et al., 1980). TÖKÉS & ARADI, 1996, estudando a potência inibitória de oligonucleotídeos modificados sobre a transcriptase reversa de HIV-1 observaram que esta é dependente do tamanho da cadeia e do grau de modificação. Neste estudo, o oligonucleotídeo mais potente foi o (s⁴dU)₃₅, com um maior tamanho da cadeia e um maior grau de modificação. O padrão de inibição foi competitivo quando poli(A)(dT)₁₆ ou poli(C)(dG)₁₆ foi usado como matriz-iniciador, sendo sugerido uma interação da enzima livre com o inibidor. Depois da ligação inicial da matriz à enzima, há uma mudança conformacional da enzima, e um complexo mais estável é formado. As anti-matrizes, sendo análogos estruturais de matrizes naturais, podem induzir mudanças conformacionais de uma forma semelhante.

Os compostos nucleosídicos (análogos de 2',3'-didesoxinucleosídeos) são de interesse porque demonstram que uma única modificação química do açúcar pode, em algumas circunstâncias, converter um substrato normal para a síntese de ácidos nucleicos em um potente inibidor da infectividade e replicação de retrovírus. Em células alvo apropriadas (células T, monócitos e macrófagos), os análogos didesoxinucleosídeos são fosforilados no citoplasma produzindo didesoxinucleosídeo-5'-trifosfato (ddNTP) (MITSUYA et al., 1990). Eles, então, tornam-se análogos dos 2'-deoxinucleosídeos 5'-trifosfatos, que são os substratos naturais para DNA polimerases celulares e transcriptase reversa viral. Estes didesoxinucleosídeos 5'-trifosfatos podem inibir a transcriptase reversa através de dois mecanismos: i) competir com os 2'-desoxinucleotídeos normais pela ligação à transcriptase reversa e ii) podem ser incorporados a cadeia de DNA em crescimento bloqueando, assim, a síntese de DNA viral porque uma ligação fosfodiéster 5'→3' normal não pode ser completada (MITSUYA et al., 1987; ARTS & WAINBERG, 1996, para revisão). Os dois mecanismos são necessários para a inibição da replicação viral em células hospedeiras.

Inibição competitiva da transcriptase reversa por 2',3'-dideoxinucleosídeo-5'-trifosfatos (ddNTP) foi inicialmente estabelecido usando-se 3'-azido-2'-deoxitimidina (AZT) (CHENG et al., 1987; ONO et al., 1986). A forma ativa do AZT [AZT 5'-trifosfato (AZT-TP)], fosforilada por quinases de nucleosídeos celulares, inibe a transcrição reversa como um inibidor competitivo da transcriptase reversa e como bloqueador da elongação da cadeia de DNA (ST. CLAIR et al., 1987). A força de um inibidor competitivo de TR está diretamente relacionada a razão de sua K_i (constante

de inibição ou constante de dissociação enzima-inibidor) para ddNTP e sua K_m (constante de Michaelis, uma medida de dissociação) para desoxinucleosídeo trifosfato (dNTP). Em reações com TR, empregando-se matriz-iniciador homopolimérica, a K_i para AZT-TP foi aproximadamente 10 vezes menor do que a K_m para TTP (CHENG et al., 1987; ST. CLAIR et al., 1987; REARDON & MILLER, 1990), sendo este análogo um potente inibidor competitivo da TR. Os ddNTP com atividade anti-TR são inibidores competitivos da TR de HIV-1. 2',3'-Didesoxicitidina (ddC ou zalcitabine), (-)2'-deoxi-3'-tiocitidina 5'-trifosfato (3TC-TP ou lamivudine) e ddATP ($K_i/K_m < 10$) foram relativamente fracos inibidores competitivos da TR de HIV-1, comparado com AZT-TP, carbovir e ddGTP ($K_i/K_m > 19$). AZT possui uma volumosa cadeia lateral azida no carbono 3' mas é um efetivo inibidor, enquanto que 3TC, com o carbono 3' substituído pelo pequeno átomo de enxofre é, relativamente, um fraco inibidor (HART et al., 1992).

Análogos nucleosídicos e dNTPs ligam-se a um sítio composto por proteína e ácido nucleico que está localizado no sub-domínio "palm" da sub-unidade p66, adjacente ao 3' terminal do iniciador (TANTILLO et al., 1994).

Várias classes de compostos não-nucleosídicos tem sido identificadas, sendo, quase todas, específicas para TR de HIV-1. Estes inibidores são, em geral, não competitivos em relação à matriz-iniciador e nucleosídeos trifosfatos (dNTPs) (ROMERO et al., 1991) e apresentam uma toxicidade celular mais baixa do que as drogas nucleosídicas (PAUWELS et al., 1990). Os dois compostos não-nucleosídicos mais estudados são TIBO e seus derivados e as peridodiazepinonas (p.e. BI-RG-587, Nevirapina (DE CLERCQ, 1992, para revisão). Nevirapina liga-se a um sítio da enzima, distinto do sítio de ligação de compostos nucleosídicos (MERLUZZI et al., 1990). Este composto liga-se a uma cavidade ("pocket") hidrofóbica próxima ao β -"hairpin" entre as fitas 9 e 10 do sub-domínio "palm" da sub-unidade p66 que contém uma sequência Tyr-Met-Asp-Asp, altamente conservada (KOHLSTAEDT et al., 1992). Este "pocket" não existe na sub-unidade p51, explicando, assim, prévias observações de que a sub-unidade p66 é o principal alvo desta classe de drogas (WU et al., 1991; SMERDON et al., 1994). Dois possíveis mecanismos de inibição da TR por Nevirapine tem sido proposto (KOHLSTAEDT et al., 1992) que são consistentes com o perfil cinético não competitivo, observado. Primeiro, a droga pode interferir com o movimento do domínio polegar ("thumb"), suprimindo a translocação da matriz-iniciador e incorporação de nucleotídeos. Dados cinéticos mostram que Nevirapine exerce um maior efeito sobre a V_{max} do que a K_m e a polimerização envolve uma mudança conformacional dependente da velocidade (KOPP et al., 1991). Por outro

lado, a droga pode alterar a conformação das fitas β , 6, 9 e 10 e a orientação das cadeias laterais carboxílicas conservadas, envolvidas na catálise.

A TR de HIV-2 apresenta 60 % de identidade na sequência de aminoácidos quando comparado a TR de HIV-1, mas, geralmente, não é inibida por nenhum dos inibidores não-nucleosídicos conhecidos (TANTILLO et al., 1994).

Resistência de TR de HIV-1 à diversas famílias de inibidores não-nucleosídicos é uma consequência de alterações na forma de ligação da cavidade ("pocket") da enzima. Mutações alterando a afinidade da enzima pelas drogas, provocam diretas perturbações nas interações de van der Waals entre a proteína e o inibidor e efeitos indiretos sobre a estrutura do "pocket". Mutações na Tyr-181 conferem o grau de resistência à todos os compostos não-nucleosídicos (BALZARINI et al., 1992b; BALZARINI et al., 1993; DEBYSER et al., 1993) e mutações na Tyr-188, também tem significantes efeitos sobre a ligação de uma variedade de drogas não-nucleosídicas (SARDANA et al., 1992). Ao contrário, os mecanismos onde mutações conferem resistência à análogos nucleosídicos terminadores de cadeia, como 3'-azido-3'-deoxitimidina e didesoxicitidina/didesoxinosina, são mais sutis e indiretos. SMERDON et al., 1994, sugerem que os análogos nucleosídicos interagem diretamente com a matriz interferindo na estrutura do sítio de ligação da matriz. Portanto, tanto o mecanismo de inibição, quanto o mecanismo onde mutações conferem resistência para estas duas classes de drogas são diferentes (KOHLSTAEDT et al., 1992).

1.5.1 *Novobiocina e Brometo de Etídeo*

O antibiótico novobiocina consiste do açúcar noviose e um resíduo coumarina (Anexo I). Este antibiótico inibe a subunidade B da enzima bacteriana DNA girase interferindo no mecanismo de superenrolamento de DNA, etapas indispensáveis para a replicação e transcrição do DNA, utilizando ATP como fonte de energia (SARIH et al., 1983). Novobiocina impede a ligação de ATP à DNA girase. Apesar do efeito seletivo e competitivo de novobiocina sobre a ligação do ATP com esta enzima, não há analogia entre o ATP e esta droga (SUGINO et al., 1978). Em procariotos, este composto inibe os sistemas de síntese de DNA ATP-dependente. Novobiocina também desestabiliza a estrutura de tRNA^{Trp} bovino (SARIH, 1981). Análogos de novobiocina (novenaminas) foram descritos como inibidores específicos da enzima RNase H de HIV-1, sem interferir na função polimerásica (ALTHAUS et al., 1996).

Brometo de etídeo (BrEt), uma droga anti-tripanicida, pode inibir a integração de retrovírus ao genoma nuclear como também a expressão do provírus já integrado

(ROA & BOSE, 1974; AVERY & LEVY, 1979). Inibe a síntese de ácidos nucleicos *in vivo* de diferentes organismos e possui a propriedade de intercalar-se à molécula de DNA (GUNTAKA et al., 1975). Esta droga também pode reduzir o acúmulo de DNA circular na célula, bloqueando a integração do genoma viral (GALE et al., 1972). Estudos da interação de BrEt com diferentes tRNAs, como tRNA^{Phe} de levedura, tRNA^{Val} de *E. coli*, tRNA^{Leu} de leveduras, tRNA^{Glu} de *E. coli*, tRNA^{Trp} de fígado bovino foram realizados por diferentes autores (JONES et al., 1978; SARIH, 1981). FRIDLENDER & WEISSBACH, 1971 mostraram que a inibição da DNA polimerase de vírus tumorais por BrEt é mais efetiva na presença de matrizes contendo os pares de base A-T do que com os pares de base C-G.

1.5.2 Inibidores Naturais

Como parte de um programa de descoberta e desenvolvimento de novas drogas, o Instituto Nacional do Câncer (USA) está ativamente adquirindo e selecionando extratos de diversas plantas terrestres, organismos marinhos e fontes microbianas para atividade anti-HIV e toxicidade seletiva (BOYD, 1988).

Entre os produtos naturais relatados que inibem a transcriptase reversa, podemos citar: alcalóides (PAPAS et al., 1973; SETHI, 1983, SETHI, 1985; KAKIUCHI et al., 1987; MANFREDI et al., 1991; TAN et al., 1991; KUSUMOTO et al., 1992; BEUTLER et al., 1992; MCMAHON et al., 1995), flavonóides (ONO et al., 1989b; ONO et al., 1990; UDDIN & CHOUDHRY, 1985), taninos (KAKIUCHI et al., 1985), terpenóides (LOYA & HIZI, 1990), derivados de catequina (NAKANE & ONO, 1990), e calanolídeos (KASHMAN et al., 1992). Estas classes de compostos inibem também a transcriptase reversa de HIV-1.

Alcalóides são produtos naturais agrupados por possuírem, em comum, um nitrogênio básico. Aspectos biológicos, farmacológicos, toxicológicos e clínicos tem sido revisado extensivamente (CALABRESI & PARKS, 1975; DECONTI & CREASEY, 1975). Estes compostos são extraídos de plantas tendo, muitos destes, atividade anti-câncer, como vinblastine e vincristine (RAO et al., 1990).

Apesar dos estudos de inibição de transcriptases reversas (TRs), nos últimos anos, estarem voltados, principalmente, para a inibição da transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana (HIV), ORLANDO et al., 1996 relataram recentemente os mecanismos de inibição das transcriptases reversas do vírus de mieloblastose de aves (AMV), do vírus da leucemia murina de Moloney (Mo-MuLV) e HIV-1 por Keletinina A [ribitol pentakis (p-hidroxibenzoato) de *Baccinulum corneum*. Os resultados deste estudo sugerem um mecanismo diferente de interação de

Keletininas com TR de HIV-1 quando comparado com outros inibidores não-nucleosídicos (KOPP et al., 1991; DEBYSER et al., 1991; TAN et al., 1991; OLSEN et al., 1994; GOPALAKRISHNAN & BENKOVIC, 1994; BAKHANASHVILI & HIZI, 1994). Keletinina A apresentou uma atividade inibitória não competitiva com relação à matriz-iniciador e dTTP na reação dirigida por poli(rA)(dT)₁₂₋₁₈ das TRs de AMV, Mo-MuLV e HIV-1. A atividade RNase H destas TRs não foi inibida pela Keletinina A.

1.5.3 Compostos Platínicos

Um modo de ação aceito para muitas drogas anti-câncer é a inibição da síntese de DNA por adutos droga-DNA que impedem a capacidade de polimerases de transcrever a lesão. Em células de mamíferos, tem sido muito difícil descobrir o mecanismo preciso pelo qual adutos, funcionalmente, interagem com o DNA. Isto se deve, em parte, à complexidade do maquinário da replicação celular.

Cis-diaminodicloroplatina (II) (cisplatina) é uma efetiva droga anti-tumor, aprovada para o tratamento quimioterápico de tumores da bexiga, ovário e testículo (DROBNÍK, 1983; LOEHRER & EINHORN, 1984; REEDIJK, 1992; LENG & BRABEC, 1994). Os mais frequentes adutos de DNA para cisplatina são ligações cruzadas intra-cadeia entre átomos N7 de guaninas adjacentes ou, com uma menor frequência, com bases adenina e guanina (SHERMAN & LIPPARD, 1987, para revisão). Estas ligações cruzadas inibem DNA polimerases celulares provocando os efeitos citotóxicos da droga (HARDER & RESENBERG, 1970; HOWLE & GALE, 1970).

Numerosos estudos do mecanismo molecular do efeito anti-tumor de drogas platínicas tem revelado que a atividade anti-tumor deve-se à interação destes compostos com o DNA (JOHNSON et al., 1989). Cisplatina e correspondentes análogos de platina (II) produzem lesões sobre o DNA que são capazes de inibir a replicação e transcrição (SHERMAN & LIPPARD, 1987).

Compostos platínicos são, portanto, drogas potencialmente inibidoras da síntese de DNA catalisada pela transcriptase reversa.

Existem também inibidores que atuam sobre outras enzimas retrovirais. Inibidores de protease de HIV (saquinavir, indinavir, SC-52151 e BMS-186.318 [BMS-PI]) representam uma nova classe de agentes anti-HIV (BECHTOLD et al., 1995; GETMAN et al., 1993; KEMPF et al., 1993; ROBERTS et al., 1990). Saquinavir (Hoffman- La Roche), indinavir (Merck) e ritonavir (Abbott) já foram

aprovados (1995, 1996) clinicamente e apresentam efetiva atividade anti-viral durante o tratamento inicial. Porém, mutantes protease-resistentes foram também isolados em pacientes com o uso prolongado destes inibidores (CONDRA et al., 1995). Devido à limitações de monoterapia, o potencial de combinações de drogas anti-HIV está sendo explorado para um aumento da atividade anti-HIV (DEMINIE et al., 1996). Exemplos de terapias de combinação de drogas bem sucedidos são: antibióticos contra tuberculose, terapia do câncer com diferentes drogas antineoplásicas e análogos de nucleosídeos para o tratamento da AIDS (FISCHL et al., 1995; MOULDING et al., 1995). DEMINIE et al., 1996, avaliando combinações de dois inibidores de TR e dois inibidores de protease, não observaram nenhum antagonismo com a combinação das drogas estudadas.

No presente trabalho foram estudados os compostos, novobiocina, brometo de etídeo, tetrametil brometo de etídeo, alcalóides, solventes e compostos platínicos como potenciais inibidores de transcriptase reversa de vírus de mieloblastose de aves e agentes antivirais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Transcriptase reversa de AMV foi adquirida da Boehringer Mannheim.

Os seguintes reagentes foram obtidos da Sigma: poli(rA), poli(dA), poli(rC), poli(dC), dATP, dCTP, dGTP, dTTP, novobiocina, brometo de etídio, DNase I, ditiotritol e albumina de soro bovino.

Poli(Am) e poli(Cm) foram obtidos da P.L. Biochemicals.

Poli (dAFluor) foi cedido pelo Dr. W. Guschlbauer (Service de Biochimie, CEN, Saclay, França); HPA-23 e DNA polimerase α de *Xenopus laevis*, DNA polimerase β e γ de camundongo, DNA polimerase C de germen de trigo e tetrametil brometo de etídio foram cedidos pelo Dr. S. Litvak (IBCN, Bordeaux, França). Os alcalóides foram cedidos pela Dra. A.J. Marsaioli (Instituto de Química, Unicamp) e pelo Dr. N. Sharabin (CPQBA, Unicamp) e os compostos platínicos pelo Dr. G.H.M. Dias (Instituto de Química, Unicamp).

(^3H)TTP e (^3H)dGTP foram obtidos da New England Nuclear (Du Pont).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Preparação de DNA Ativado

O DNA ativado é um DNA dupla-fita onde há falhas de nucleotídeos nas duas fitas, com terminais 3' OH livres do açúcar (desoxiribose), necessários para a síntese de DNA.

DNA ativado foi obtido pelo tratamento do DNA nativo com DNase I, de acordo com o método de APOSHIAN & KORNBERG, 1962. DNA ativado de timo de bezerro foi preparado pela reação enzimática do DNA nativo com DNase I. Em vários tubos contendo DNA (0,5 mg), para um volume final de 1,0 ml, foram adicionados tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,9), 0,5 mg/ml de BSA, MgCl_2 5 mM e 5×10^{-4} μg de DNase I (pâncreas bovino). Após 15 minutos à 37°C, a solução foi aquecida por 5 minutos à 77°C, e imediatamente resfriada em banho de gelo. Alíquotas destes tubos foram utilizadas como matrizes-iniciadores em reação de síntese de DNA catalisada por DNA polimerase α (v. item 3.1).

Os tubos, contendo DNA ativado, que apresentaram mais de 50% da atividade enzimática foram reunidos, tratados com igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), com lenta agitação por 10 minutos. Após centrifugação, a fase aquosa foi separada e misturada com 2 volumes de etanol absoluto gelado, com agitação lenta por 5 minutos. Após centrifugação à 10 000 g, por 10 min., o precipitado de DNA foi seco à temperatura ambiente e resuspenso com tampão Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), a uma concentração final de 1 mg/ml e estocado à -20°C.

O DNA ativado também pode ser expresso em mg/ml, utilizando-se a seguinte conversão: $20 A_{260} = 1,0 \text{ mg/ml}$.

2.2.2 *Preparação de Matrizes-Iniciadores Sintéticos*

O pareamento das duplas fitas de polinucleotídeos com oligodesoxinucleotídeos complementares (matrizes-iniciadores) foi realizado de acordo com o método descrito por FRIDLENDER & WEISSBACH (1971). Derivados de poli A com absorvância à 260 nm igual a 2 e oligo (dT) com absorvância à 260 nm igual a 0,4 ou um total de 2,4 de absorvância à 260 nm foram aquecidos à 75°C por 15 minutos e depois deixados esfriar à temperatura ambiente em Tris-HCl 10 mM (pH 7,9) por 30 min. Para poli C, o pareamento foi mais eficiente à 90°C por 15 min. A razão matriz-iniciador foi mantida na ordem de 5:1 para evitar a formação de multi-fita ou agregado (TAMBLY & WELLS, 1975).

As matrizes sintéticas também podem ser expressas em mg/ml, utilizando-se a seguinte conversão: $20 A_{260} = 1,0 \text{ mg/ml}$.

2.2.3 *Determinação das Atividades Enzimáticas*

A atividade enzimática tanto para DNA ativado quanto para polinucleotídeos sintéticos é expressa neste trabalho de duas formas:

a) Timidina monofosfato marcada com trítio e incorporada às matrizes

Esta atividade é expressa como timidina monofosfato marcada com trítio e incorporada ($[^3\text{H}]\text{TMP}$ incorp.) às matrizes utilizadas. A velocidade da reação enzimática é expressa como pmol de $[^3\text{H}]\text{TMP}$ incorporado por 30 minutos.

b) Atividade (%)

Esta atividade é expressa como uma atividade residual ou relativa. A leitura (em cpm-contagem por minuto) na ausência de compostos foi considerada 100% de

atividade enzimática. Na presença de compostos, esta atividade foi calculada como uma percentagem daquela obtida na ausência do composto.

2.2.3.1 DNA Ativado

Para um volume final de 0,05 ml, o meio de incubação continha: Tris-HCl (pH 7,9) 50 mM, KCl 40 mM, acetato de magnésio 10 mM, ditioneitol 2 mM, albumina de soro bovino 200 µg/ml, DNA ativado 15 µg/ml, 50 µM de cada dATP, dCTP e dGTP, 10 µM (^3H)TTP (1000 cpm/pmol). A reação foi iniciada pela adição de 1 unidade de transcriptase reversa (ou 10 µg de DNA polimerase α , β ou γ , ou 15 µg de DNA polimerase C), incubando-se à 37°C por 30 min. A reação foi paralizada pela adição de 1 ml de TCA 10 %, gelado. A mistura foi filtrada e o precipitado foi recolhido sobre filtros de nitrocelulose Milipore e lavado com TCA 5%, gelado, contendo 10 mM de pirofosfato de sódio. Os filtros foram secos e a radioatividade contada em uma mistura de cintilação tolueno/PPO/POPOP (contador de cintilação Beckman modelo LS 6000TA). KCl foi omitido nos ensaios de DNA polimerase α e DNA polimerase C.

2.2.3.2 Polinucleotídeos Sintéticos

Para um volume final de 0,05 ml, o meio de incubação consistia de Tris-HCl (pH 7,9) 50 mM, acetato de magnésio 40 mM, ditioneitol 2 mM, albumina de soro bovino 200 µg/ml, poli (xA)(dT)₁₂ 0,24 A₂₆₀ (onde x pode ser ribose ou desoxiribose; poli A com absorbância à 260 nm igual a 0,2 e oligo (dT) com absorbância à 260 nm igual a 0,04), 10 µM (^3H)TTP (1000 cpm/pmol). A reação foi iniciada pela adição de 1 unidade de transcriptase reversa, incubando-se à 37°C por 30 minutos. No caso de poli(rC) foram utilizados 0,24 A₂₆₀/ml de poli(rC)(dG)₁₂ e 10 µM (^3H)GTP (1000 cpm/pmol). A radioatividade foi determinada como descrito para DNA ativado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Transcriptases reversas (TR) de retrovirus são enzimas multifuncionais possuindo atividades DNA polimerase RNA-dependente (DPRP), DNA polimerase DNA-dependente (DPDD) e atividade RNase H (GOFF, 1990).

Na procura de inibidores de transcriptase reversa, selecionamos os compostos novobiocina, brometo de etídeo, tetrametil brometo de etídeo, alcalóides, solventes e compostos platínicos. Foram realizados estudos com diferentes matrizes e diferentes metais com a finalidade de se determinar a especificidade do inibidor para as funções polimerásicas da transcriptase reversa (RNA-dependente ou DNA-dependente). Visando-se estudar o mecanismo de ação destes compostos foram determinados o tipo de inibição, valores de K_m e K_i , como também a reversibilidade da inibição enzimática.

Todos os resultados da presente tese são provenientes de 3 repetições, com SD $\pm 7\%$.

3.1 EFEITO DE NOVOBIOCINA

A novobiocina, em *Escherichia coli*, atua sobre a DNA girase, enzima que intervem no superenrolamento negativo do DNA (SARIH-COTTIN et al., 1983). Estudamos os efeitos de novobiocina nas atividades de transcriptase reversa em presença de diferentes matrizes (Figura 1). Independentemente da matriz utilizada, DNA ativado, poli(rA)(dT)₁₂ ou poli(rC)(dG)₁₂, 0,5 mM de novobiocina inibe 50% da atividade enzimática. Tais valores serão expressos como IC₅₀, ou seja, a concentração da droga necessária para inibir 50% da atividade enzimática.

A novobiocina inibe diferentemente as atividades das DNA polimerases celulares alfa, beta e gama, utilizando-se DNA ativado como matriz (Figura 2). O valor de IC₅₀ para DNA polimerase alfa é o mesmo obtido para transcriptase reversa, significando que a droga afeta igualmente as enzimas celular e viral. Nesta mesma concentração, a novobiocina inibe cerca de 30% a atividade de DNA polimerase beta, e atua como ativador de DNA polimerase gama.

Quanto ao mecanismo de ação de novobiocina na reação catalisada por transcriptase reversa em presença de DNA ativado como matriz, a inibição é do tipo não competitiva tanto em relação ao dTTP (Figura 3), quanto ao DNA ativado (Figura

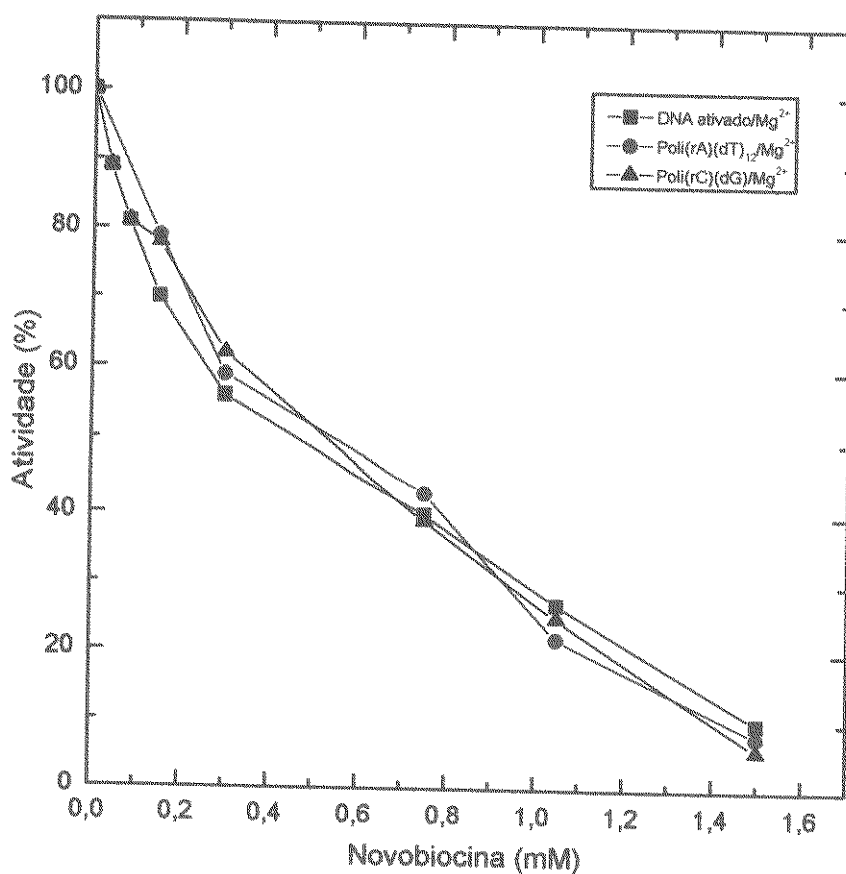


FIGURA 1. Curvas Dose-Resposta da Inibição da Função Catalítica de Transcriptase Reversa de AMV por Novobiocina.

As condições experimentais são as mesmas descritas em Material e Métodos, utilizando-se poli(rA)(dT)₁₂ 0,010 mg/ml, poli(rC)(dG)₁₂ 0,010 mg/ml, DNA ativado 0,020 mg/ml e Mg²⁺ 6,0 mM. A atividade residual foi calculada como uma percentagem daquela obtida na ausência do composto.

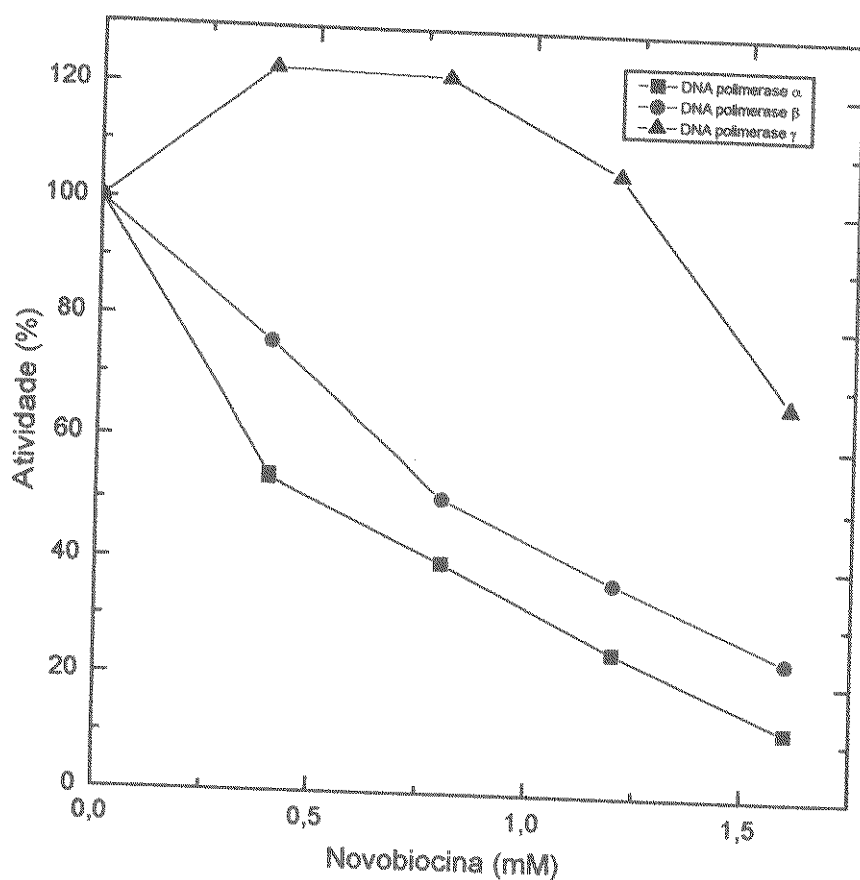


FIGURA 2. Efeito de Novobiocina nas Atividades de DNA Polimerases Celulares.

As condições experimentais são as mesmas descritas em Material e Métodos, utilizando-se DNA ativado 0,020 mg/ml e Mg^{2+} 6,0 mM. As atividades enzimáticas foram calculadas como uma percentagem daquela obtida na ausência de novobiocina (100 %).

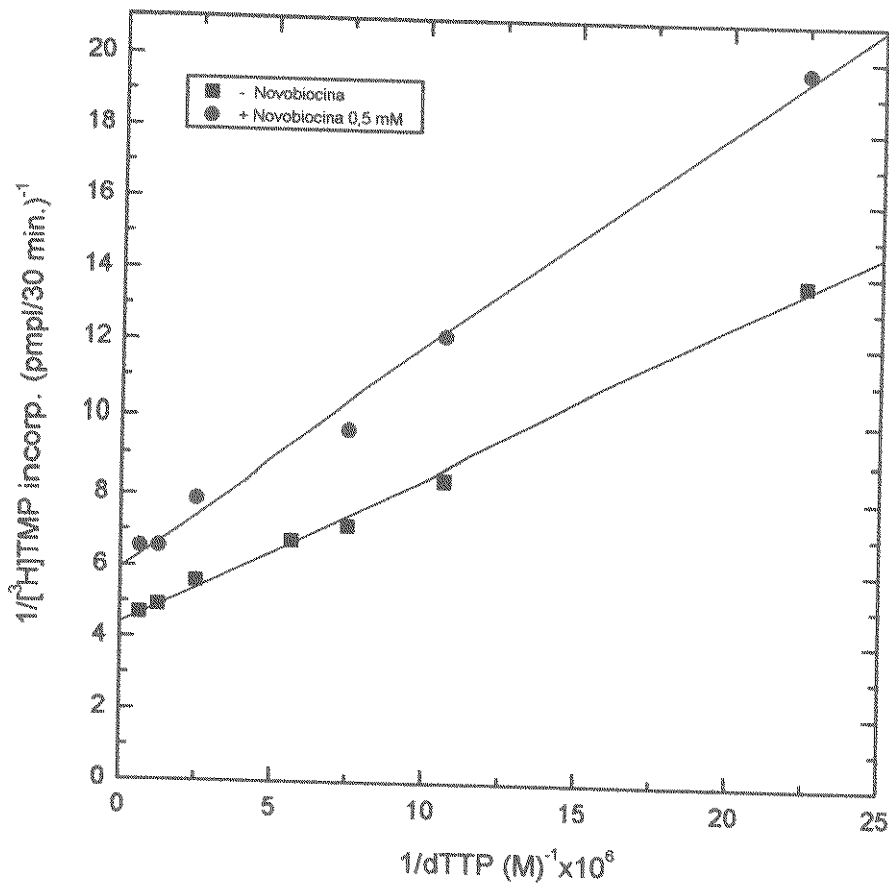


FIGURA 3. Gráfico dos Duplo-Recíprocos de Lineweaver-Burk de Inibição da Transcriptase Reversa de AMV Dependente de DNA Ativado por Novobiocina, em Relação a dTTP.

O ensaio foi realizado com DNA ativado 0,020 mg/ml e as condições experimentais são as mesmas descritas em Material e Métodos, variando-se a concentração de dTTP, na ausência e em presença de novobiocina 0,5 mM.

4). Foram obtidos os seguintes valores de K_m aparentes: 0,014 mM para dTTP e 3,7 $\mu\text{g/ml}$ para DNA ativado.

Os seguintes valores de K_i : 1,25 mM com relação a dTTP e 0,43 μM com relação ao DNA ativado, foram determinados a partir da fórmula $K_i = \frac{i}{\frac{V}{V_p} - 1}$, onde K_i ,

i , V_p e V são, respectivamente, a constante de inibição, concentração do inibidor, velocidade máxima em presença do inibidor e velocidade máxima na ausência do inibidor.

Os resultados sugerem que novobiocina deve se ligar à transcriptase reversa em um sítio diferente dos sítios de ligação de dTTP e de DNA ativado.

3.2 EFEITO DE BROMETO DE ETÍDEO E TETRAMETIL BROMETO DE ETÍDEO

O brometo de etídeo (BrEt) é um composto que tem a propriedade de se intercalar ao DNA utilizado como matriz. Na Figura 5 podemos observar o efeito de BrEt nas atividades de transcriptase reversa utilizando-se análogos de ácido poliadenílico como matriz. Este estudo é importante pois permite verificar o efeito de diferentes substituintes na posição 2' do açúcar, na atividade enzimática. Observou-se que a ordem de efetividade de BrEt como inibidor, com relação as matrizes é a seguinte:



Portanto, a inibição por BrEt depende do grupo substituinte na posição 2' do açúcar, onde, por exemplo, a substituição de OH por fluor no derivado poliadenílico como matriz, torna a reação catalisada por transcriptase reversa menos suscetível à ação de BrEt.

Testou-se também a ação de um análogo não intercalante, o tetrametil brometo de etídeo (TMBrEt), nas reações catalisadas por transcriptase reversa em presença de derivados do ácido poliadenílico como matrizes (Figura 6).

A ordem de eficiência de TMBrEt como inibidor, utilizando-se Mg^{2+} como cation divalente é a seguinte:



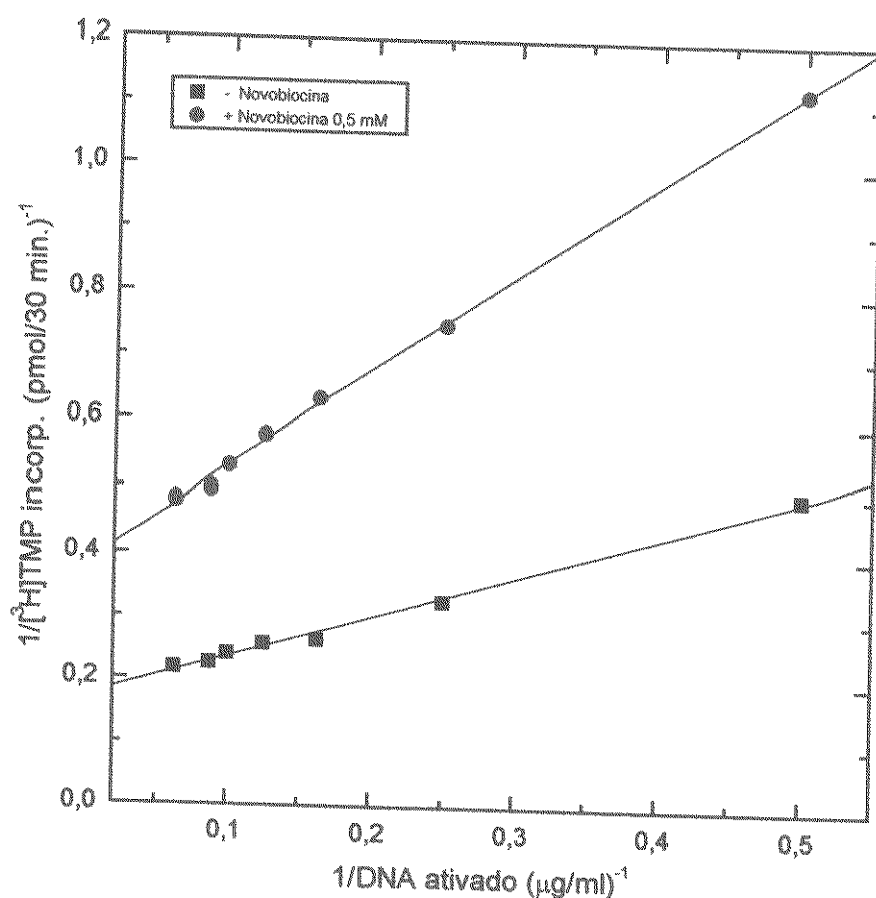


FIGURA 4. Gráfico dos Duplo-Recíprocos de Lineweaver-Burk de Inibição da Transcriptase Reversa de AMV por Novobiocina, em Relação a DNA Ativado.

A atividade foi determinada conforme descrito em Material e Métodos, variando-se a concentração de DNA ativado, na ausência e em presença de novobiocina 0,5 mM.

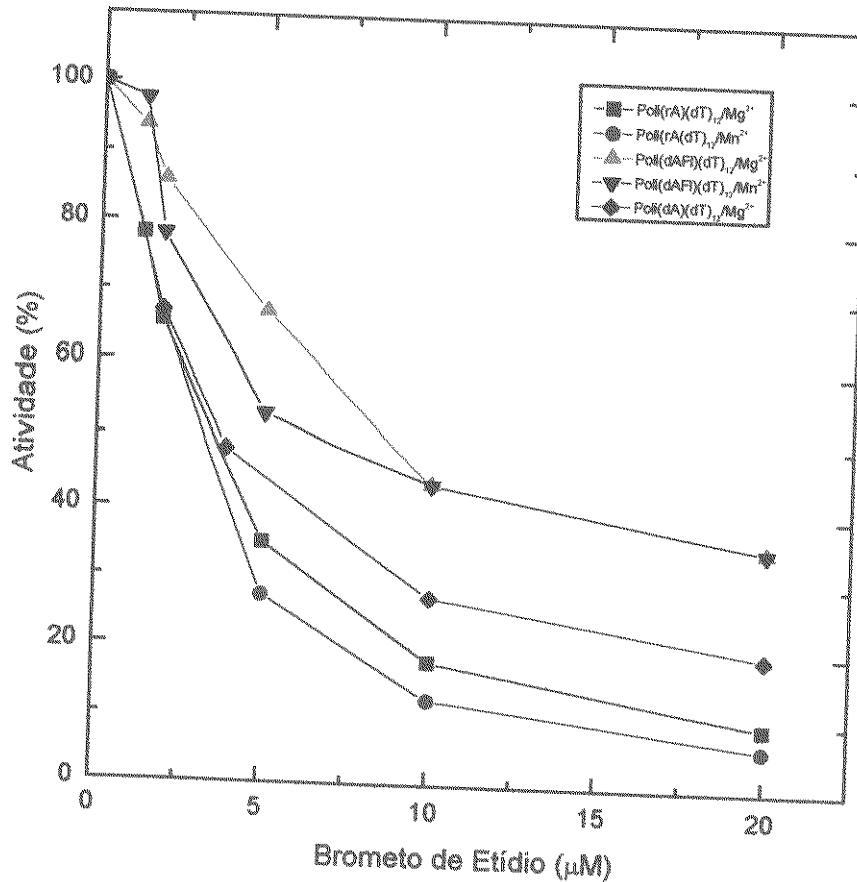


FIGURA 5. Efeito de Brometo de Etídeo nas Atividades de Transcriptase Reversa de AMV Utilizando-se Análogos de Ácido Poliadenílico como Matrizes.

As condições experimentais são as mesmas descritas em Material e Métodos, utilizando-se como matriz poli(rA)(dT)₁₂ 0,010 mg/ml, poli(dAF)(dT)₁₂ 0,010 mg/ml, poli(dA)(dT)₁₂ 0,010 mg/ml e os cátions divalentes Mg²⁺ 6,0 mM e Mn²⁺ 0,2 mM. A atividade residual foi calculada como uma percentagem daquela obtida na ausência de brometo de etídeo.

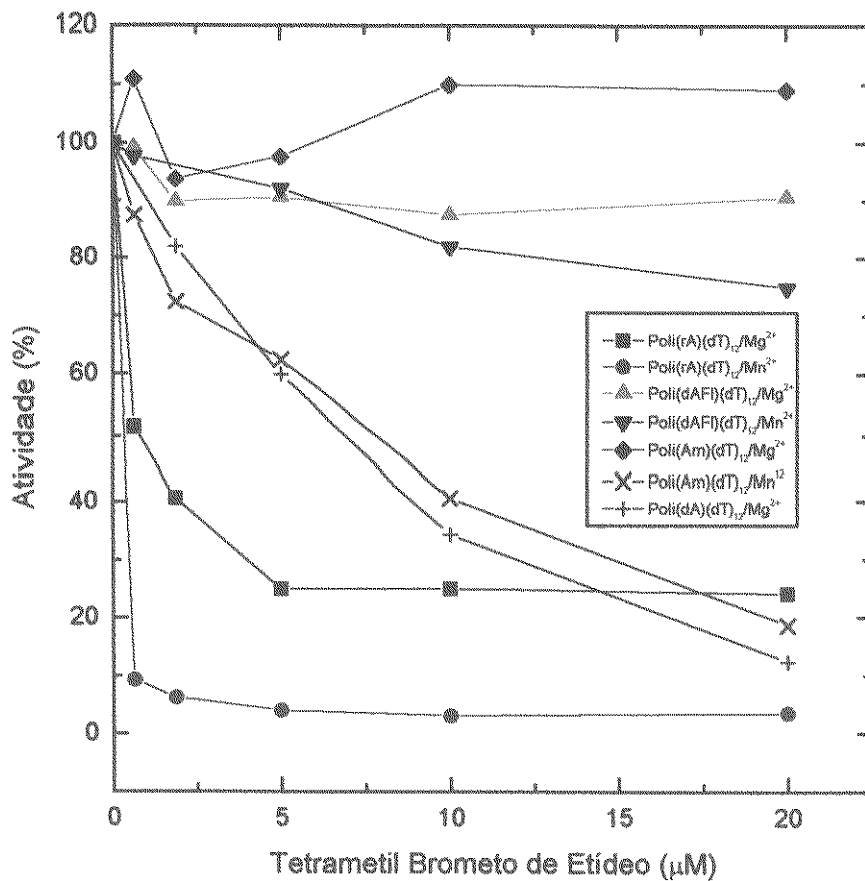


FIGURA 6. Efeito de Tetrametil Brometo de Etídeo nas Atividades de Transcriptase Reversa de AMV Utilizando-se Análogos de Ácido Poliadenílico como Matrizes.

As condições experimentais são as mesmas descritas em Material e Métodos. As concentrações das matrizes e cátions divalentes são as mesmas da Figura 5, utilizando-se a matriz poli(Am)(dT)₁₂ 0,010 mg/ml.

Esta ordem de inibição é análoga à observada para BrEt (Figura 5). A reação catalisada por transcriptase reversa dependente de poli(Am)(dT)₁₂ não é inibida por TMBrEt em presença de Mg²⁺. Por outro lado, em presença de Mn²⁺, a inibição com a matriz poli(Am)(dT)₁₂ é mais acentuada quando comparada com a de poli(dAFluor)(dT)₁₂.

Com relação a matriz-iniciador poli(dA)(dT)₁₂, não foi testado o efeito do Mn²⁺ uma vez que a atividade enzimática não é significativa em presença deste metal.

Como foi observado anteriormente, a atividade da transcriptase reversa com diferentes polinucleotídeos sintéticos como matriz, depende do cátion divalente utilizado (AOYAMA et al., 1985b).

Os efeitos de cátions divalentes sobre a inibição de BrEt e TMBrEt são mostrados para as matrizes poli(Am)(dT)₁₂ (Figura 7) e poli(dAFluor)(dT)₁₂ (Figura 8). Para a matriz poli(Am)(dT)₁₂, a inibição por BrEt prevalece em presença de Co²⁺, enquanto que na presença de TMBrEt, a inibição é observada somente em presença de Mn²⁺. Com relação a poli(dAFluor)(dT)₁₂ como matriz, independentemente do cátion divalente utilizado, a inibição por BrEt é maior do que a inibição por TMBrEt.

No que se refere ao mecanismo de inibição por BrEt e TMBrEt é importante mencionar que existe uma diferença fundamental entre elas, uma vez que BrEt é uma droga intercalante (nas bases da matriz) e o TMBrEt não.

Com a finalidade de verificar-se os tipos de bases das matrizes importantes na interação com BrEt e TMBrEt para suas inibições, estudamos os efeitos destas drogas nas atividades de transcriptase reversa com análogos do ácido policitídílico. A inibição por EtBr é pequena utilizando-se poli(rC)(dG)₁₂ ou poli(dC)(dG)₁₂ como matriz (Figura 9). Com exceção de poli(dC)(dG)₁₂, inibições similares foram obtidas para poli(rC)(dG)₁₂ e poli(Cm)(dG)₁₂ em presença de TMBrEt (Figura 10).

Comparando-se as Figuras 5 e 6 com as Figuras 9 e 10 observamos que as inibições por BrEt e TMBrEt nas reações catalisadas por transcriptase reversa são mais eficientes quando se utiliza análogos de poli(rA)(dT)₁₂ como matrizes. FRIDLENDER & WEISSBACH, 1971 observaram que as enzimas de tumor de mamíferos eram mais sensíveis à inibição por BrEt do que as enzimas de tumor de aves, e que a interação da droga com pares de bases A-T era mais forte que com pares de bases C-G. As DNA polimerases dependentes de RNA de vírus de mieloblastose de aves possuem comportamentos diferentes quando submetidas ao tratamento com BrEt.

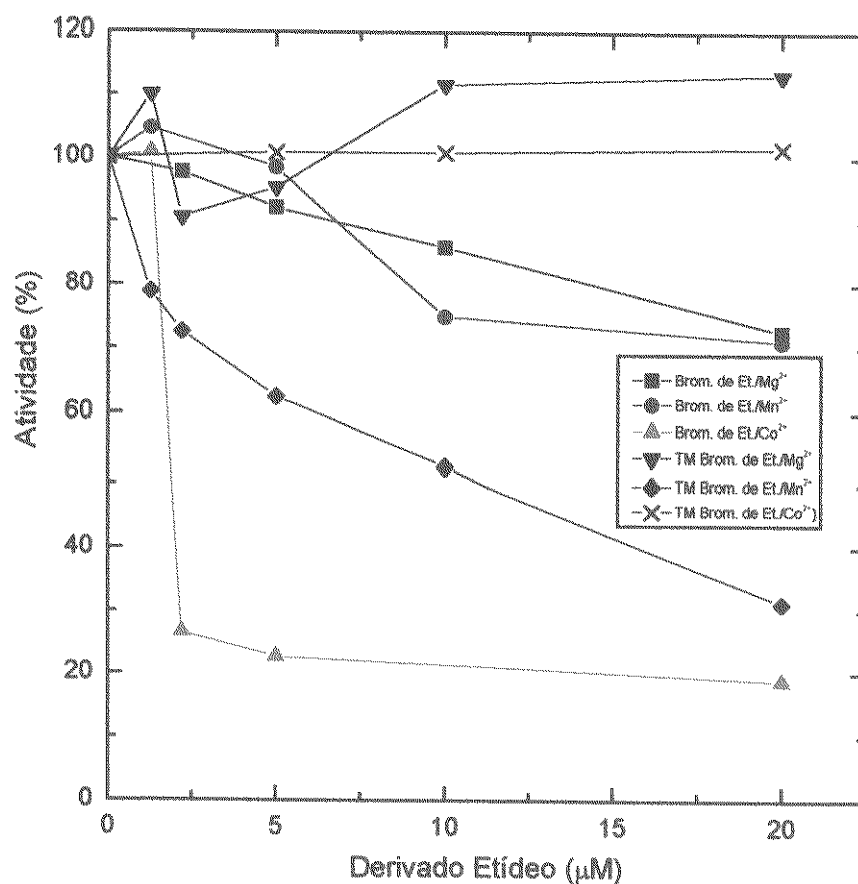


FIGURA 7. Efeito de Brometo de Etídeo e Tetrametilbrometo de Etídeo nas Atividades de Transcriptase Reversa de AMV Dependentes de Poli(Am)(dT)₁₂ em Presença de Diversos Cátions Divalentes.

As condições experimentais são as mesmas descritas em Material e Métodos, utilizando-se poli(Am)(dT)₁₂ 0,010 mg/ml, Mg²⁺ 6,0 mM, Mn²⁺ 0,2 mM e Co²⁺ 0,5 mM. A atividade residual foi calculada como uma porcentagem daquela obtida na ausência do composto.

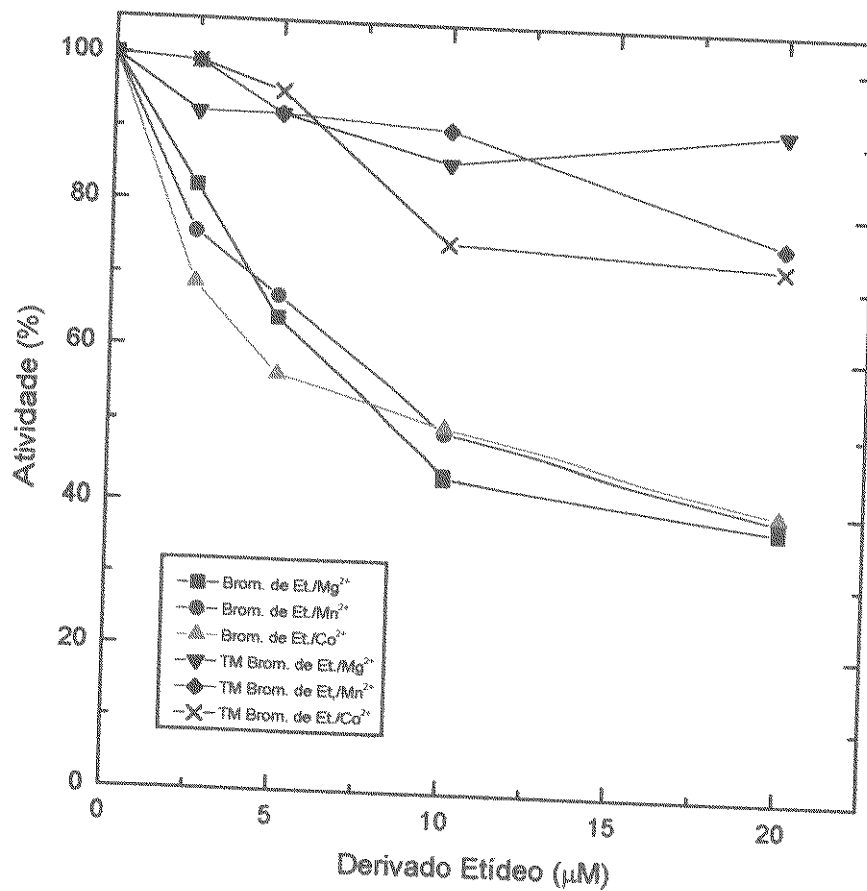


FIGURA 8. Efeito de Brometo de Etídeo e Tetrametil Brometo de Etídeo nas Atividades de Transcriptase Reversa de AMV Dependentes de Poli(dAFluor)(dT)₁₂, em Presença de Cátions Divalentes.

As condições experimentais são as mesmas da Figura 7 e poli(dAFluor)(dT)₁₂ 0,010 mg/ml foi usado como matriz.

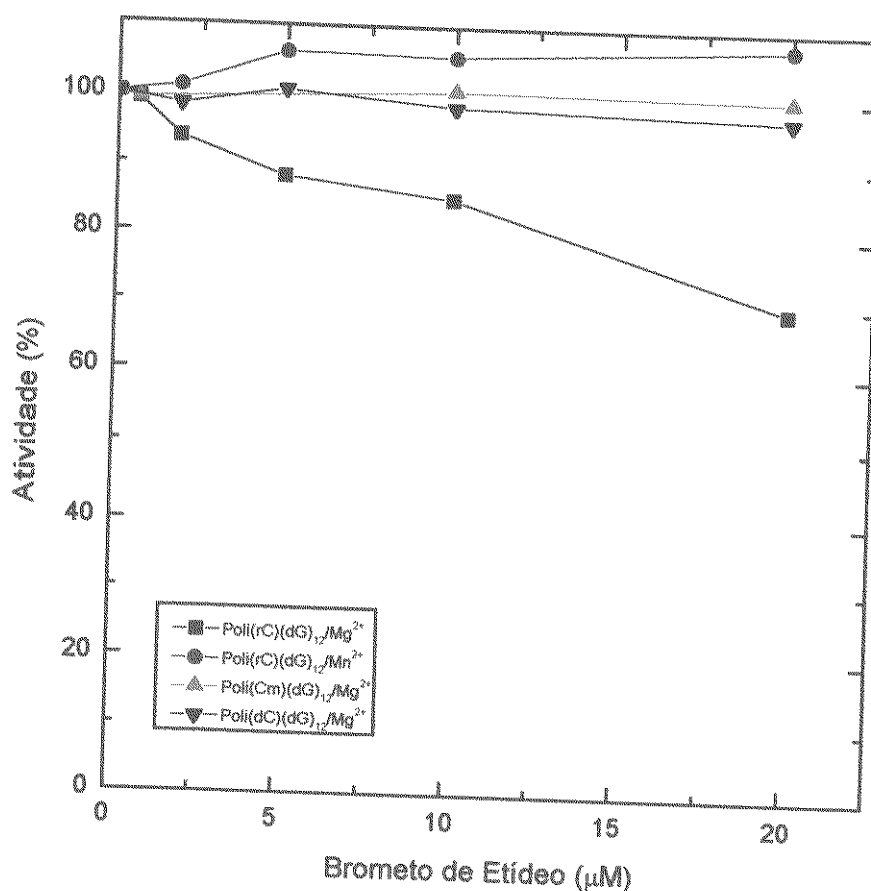


FIGURA 9. Curvas Dose-Resposta da Inibição da Função Catalítica de Transcriptase Reversa de AMV por Brometo de Etídeo Utilizando-se Análogos de Ácido Policitidílico como Matrizes.

As atividades da enzima foram ensaiadas como descrito em Material e Métodos, utilizando-se como matrizes, poli(rC)(dG)₁₂ 0,010 mg/ml, poli(Cm)(dG)₁₂ 0,010 mg/ml, Mg²⁺ 6,0 mM e Mn²⁺ 0,2 mM. As atividades obtidas foram calculadas como uma percentagem da amostra controle sem brometo de etídeo e são apresentadas como uma função das concentrações finais do composto. As condições do ensaio são as mesmas descritas em Material e Métodos.

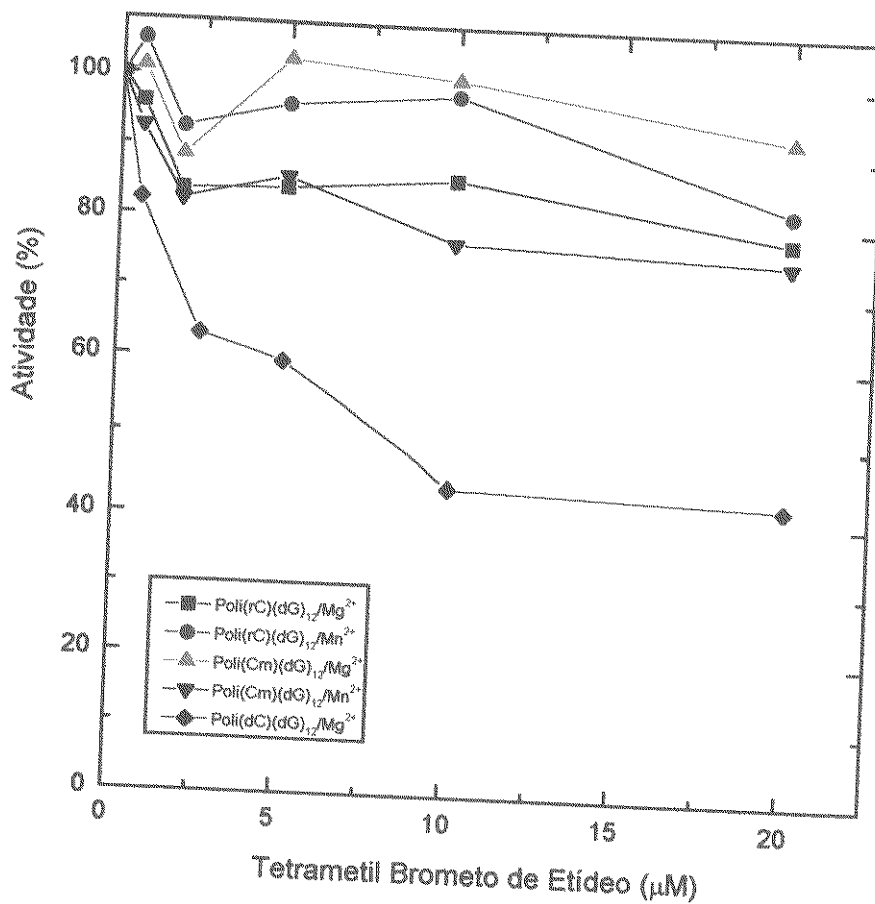


FIGURA 10. Curvas Dose-Resposta da Inibição da Função Catalítica de Transcriptase Reversa de AMV por Tetrametil Brometo de Etídeo Utilizando-se Análogos de Ácido Policitidílico como Matrizes.

As condições experimentais são as mesmas descritas para a Figura 9.

Do ponto de vista de mecanismo, na reação catalisada por transcriptase reversa dependente de poli(rA)(dT)₁₂, EtBr é um inibidor do tipo não competitivo tanto em relação a dTTP (Figura 11) quanto a matriz-iniciador poli(rA)(dT)₁₂ (Figura 12). A Tabela I ilustra os valores de Km e Ki obtidos em cada caso.

Utilizando-se a droga não intercalante TMBrEt, podemos observar que a mesma mostra uma inibição do tipo não competitivo com relação a dTTP na reação catalisada pela transcriptase reversa (Figura 13). Os valores de Km e Ki obtidos foram respectivamente $3 \times 10^{-6} \mu\text{M}$ e $8,3 \mu\text{M}$.

Os valores similares de Ki obtidos para BrEt e TMBrEt reforçam os padrões de inibição semelhantes daqueles compostos observados nas Figuras 5 e 6.

Pelos resultados obtidos, o BrEt, em sua inibição, deve ocupar um sítio na transcriptase reversa diferente dos sítios ativos para dTTP e para a matriz-iniciador poli(rA)(dT)₁₂. O mesmo parece ocorrer para TMBrEt com relação a dTTP. O BrEt e o seu análogo TMBrEt apesar de mostrar um padrão de inibição da transcriptase reversa do tipo não competitivo (Figuras 11 a 13), como o observado para novobiocina (Figuras 3 e 4), diferem deste último com relação ao comportamento frente às diferentes matrizes (Figuras 1,5,6,9 e 10).

Face às diferenças de comportamento observadas para BrEt e TMBrEt com relação às diversas matrizes (Figuras 5 e 6), estudamos seus mecanismos de ação nas reações catalisadas por transcriptase reversa dependentes de poli(Am)(dT)₁₂ e poli(dAFluor)(dT)₁₂ (Figuras 14 a 16). Uma vez que o BrEt intercala-se na matriz e é um inibidor do tipo não competitivo (ligando-se em um sítio diferente do sítio ativo), este pode estar formando um complexo do tipo ternário com a enzima e a matriz.

Utilizando-se poli(Am)(dT)₁₂ como matriz, em presença de Mn^{2+} , TMBrEt inibe a atividade de transcriptase reversa de uma maneira não competitiva, com relação a dTTP, obtendo-se os valores de Km, $0,33 \mu\text{M}$ e Ki, $10 \mu\text{M}$ (Figura 14). Este padrão de inibição de TMBrEt com relação ao sistema poli(Am)(dT)₁₂ / Mn^{2+} é similar ao observado para poli(rA)(dT)₁₂ / Mg^{2+} (Figura 13) mostrando que não existe uma diferença no mecanismo de ação da droga, embora o valor de IC_{50} no primeiro caso seja $2 \mu\text{M}$ e no segundo $10 \mu\text{M}$ (Figura 6).

Com o derivado de ácido poliadenílico com fluor na posição 2' da ribose, ou seja, o poli(dAFluor)(dT)₁₂, a inibição por BrEt é do tipo não competitiva com relação a dTTP, tanto em presença de Mg^{2+} (Figura 15) quanto de Mn^{2+} (Figura 16) como cátion divalente.

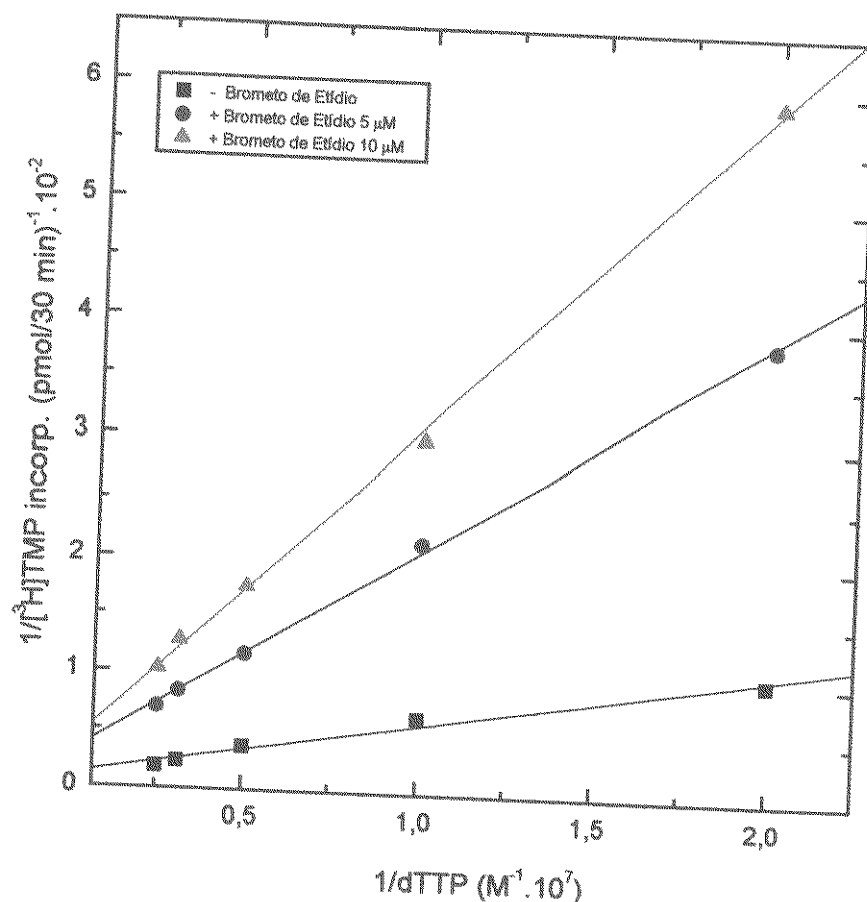


FIGURA 11. Gráfico dos Duplo-Recíprocos de Lineweaver-Burk de Inibição da Transcriptase Reversa de AMV, Dependente de Poli(rA)(dT)₁₂/Mg²⁺ por Brometo de Etídeo, em Relação a dTTP.

A atividade foi determinada conforme descrito em Material e Métodos, variando-se a concentração de dTTP como uma função da velocidade inicial de polimerização, na ausência e em presença de brometo de etídeo 5 μM e 10 μM.

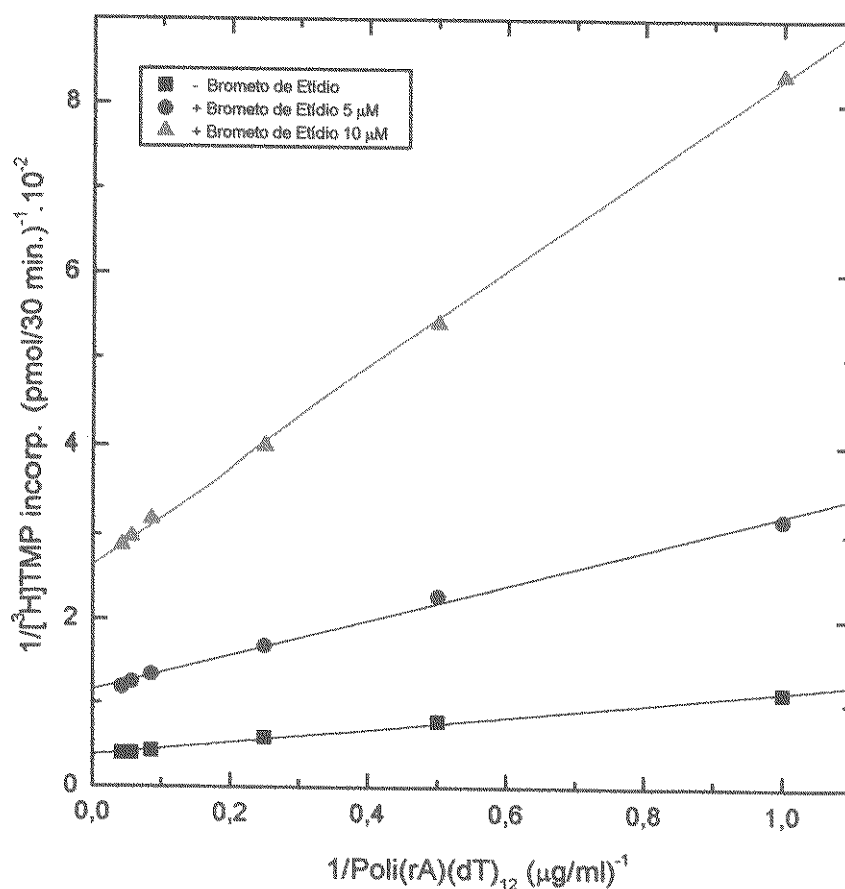


FIGURA 12. Gráfico dos Duplo-Recíprocos de Inibição da Transcriptase Reversa de AMV, Dependente de $\text{Poli(rA)(dT)}_{12} / \text{Mg}^{2+}$ por Brometo de Etídeo, em Relação a Poli(rA)(dT)_{12} .

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos, variando-se a concentração de poli(rA)(dT)_{12} , na ausência e em presença de brometo de etídeo 5 μM e 10 μM .

Tabela I. Inibição da Atividade de Transcriptase Reversa Dependente de Poli(rA)(dT)₁₂ por Brometo de Etídeo.

Variável	K _m	K _i
dTTP	1,0 µM	5,0 µM
Poli(rA)(dT) ₁₂	2,2 µg/ml	2,8 µM

As condições de ensaio são as mesmas descritas em Material e Métodos.

Os valores de K_m e K_i obtidos para BrEt utilizando-se poli(dAFluor)(dT)₁₂ como matriz podem ser observados na Tabela II.

Os resultados mostram que em presença de Mn²⁺, onde a afinidade de transcriptase reversa por dTTP é maior (K_m menor), a interação com BrEt é também maior (Tabela II), o que não é discriminado quando se estuda a atividade enzimática em função da concentração da droga (Figura 5).

Em sistemas onde a ação de BrEt é mais eficiente (valor de IC₅₀ menor), como por exemplo, poli(rA)(dT)₁₂/Mg²⁺ (Figura 5), as afinidades da enzima por dTTP e pelo inibidor são maiores (Tabela I). Tais resultados são consistentes quando comparados com o sistema poli(dAFluor)(dT)₁₂/Mg²⁺ (valor de IC₅₀ maior, Figura 5) onde as afinidades da enzima por dTTP e BrEt são menores (Tabela II).

Em determinadas condições, BrEt parece não exercer uma função inibidora em reações catalisadas por DNA polimerases. Nas concentrações em que inibe as atividades de transcriptase reversa (até 20 µM), BrEt apresenta um efeito ativador na reação catalisada por DNA polimerase C de germen de trigo, utilizando-se DNA ativado como matriz (Figura 17).

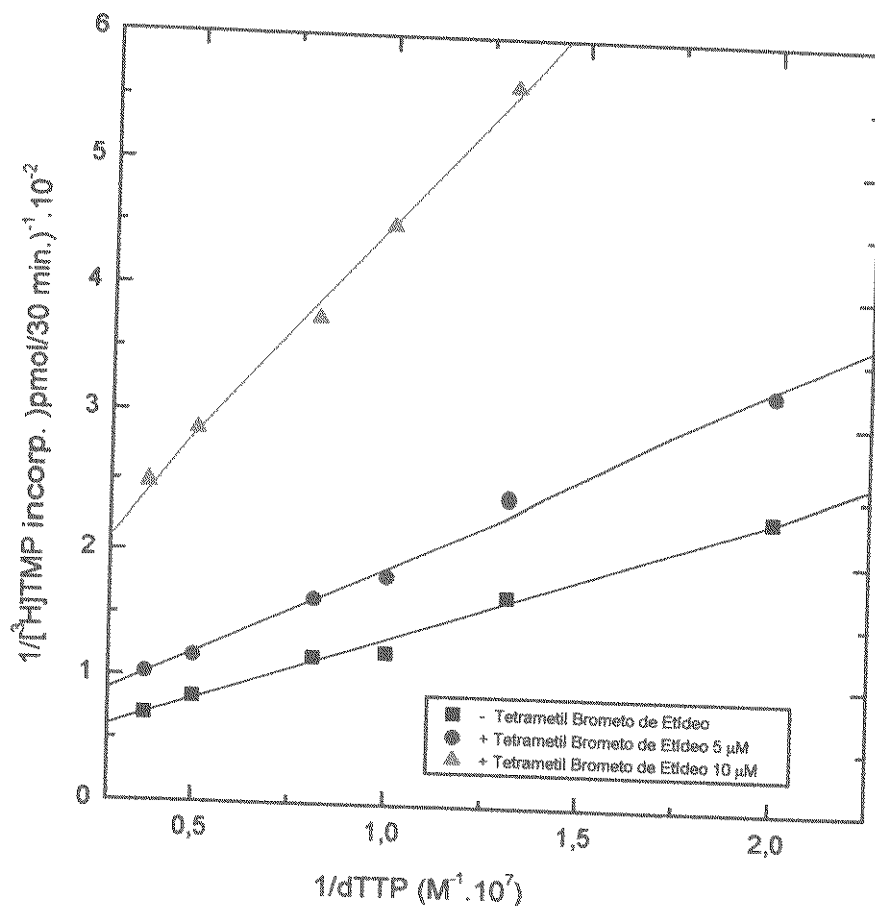


FIGURA 13. Gráfico dos Duplo-Recíprocos de Inibição da Transcriptase Reversa de AMV, Dependente de Poli(rA)(dT)₁₂ /Mg²⁺ por Tetrametil Brometo de Etídeo em Relação a dTTP.

A atividade foi determinada conforme descrito em Material e Métodos, variando-se a concentração de dTTP, na ausência e em presença de tetrametil brometo de etídeo 5 μM e 10 μM .

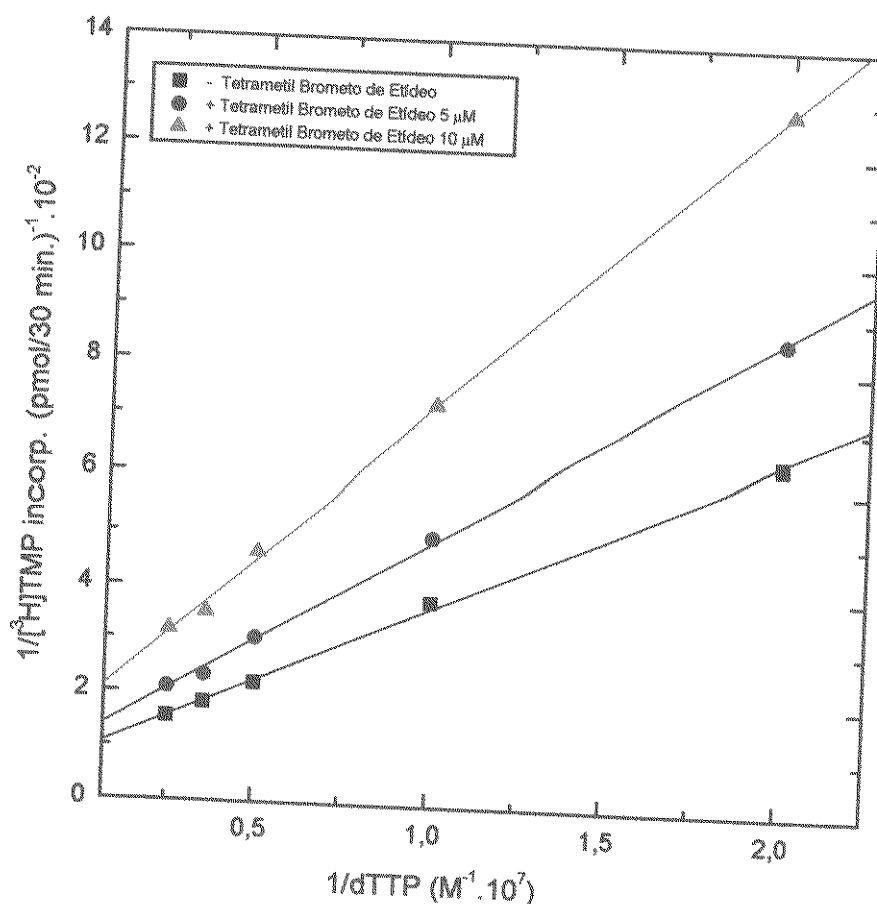


FIGURA 14. Gráfico dos Duplo-Recíprocos de Inibição da Transcriptase Reversa de AMV, Dependente de Poli(Am)(dT)₁₂ /Mn²⁺ por Tetrametil Brometo de Etídeo, em Relação a dTTP.

As condições experimentais são as mesmas descritas em Material e Métodos, variando-se a concentração de dTTP, na ausência e em presença de tetrametil brometo de etídeo 5 μM e 10 μM.

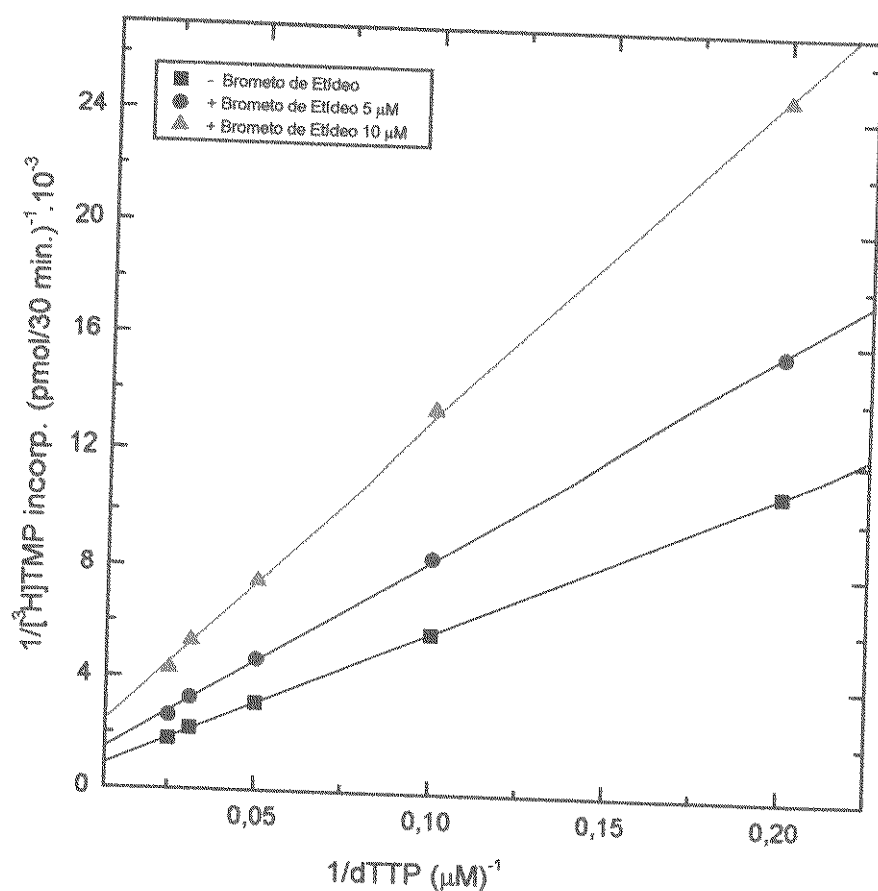


FIGURA 15. Gráfico dos Duplo-Recíprocos de Inibição da Transcriptase Reversa de AMV, Dependente de Poli(dAFluor)(dT)₁₂ /Mg²⁺ por Brometo de Etídeo, em Relação a dTTP.

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos, variando-se a concentração de dTTP, na ausência e em presença de brometo de etídeo 5 μM e 10 μM .

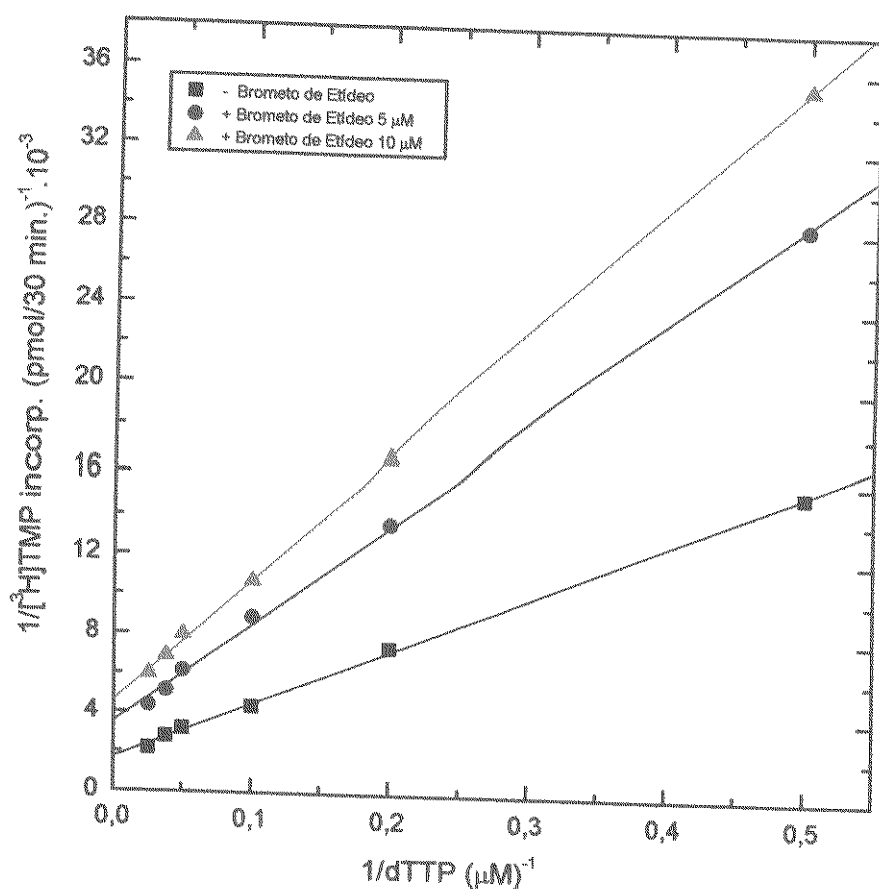


FIGURA 16. Gráfico dos Duplo-Recíprocos de Inibição da Transcriptase Reversa de AMV, Dependente de Poli(dAFluor)(dT)₁₂ /Mn²⁺ por Brometo de Etídeo, em Relação a dTTP.

A atividade foi determinada conforme descrito em Material e Métodos, variando-se a concentração de dTTP, na ausência e em presença de brometo de etídeo 5 μM e 10 μM .

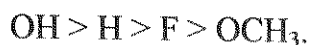
Tabela II. Inibição da Atividade de Transcriptase Reversa Dependente de Poli(dAFluor)(dT)₁₂ por Brometo de Etídeo com Relação a dTTP.

Cátion	K _m (μM)	K _i (μM)
Mg ²⁺	100,0	10,0
Mn ²⁺	16,0	5,7

As condições de ensaio são as mesmas descritas em Material e Métodos.

Através destes resultados, podemos afirmar que diferentes tipos de inibidores (novobiocina atua a nível da enzima e BrEt a nível da matriz e da enzima) podem apresentar os mesmos tipos de inibição (não competitivo, no caso). Estes dois inibidores, entretanto, diferem quanto as suas eficiências dependendo das matrizes utilizadas nas reações catalisadas por transcriptase reversa. Em seus efeitos inibitórios, os derivados BrEt e TMBrEt parecem preferir matrizes do tipo poli(rA)(dT)₁₂ quando comparados com poli(rC)(dG)₁₂ e poli(dC)(dG)₁₂.

Considerando-se os derivados de poli(rA)(dT)₁₂ com diferentes substituintes na posição 2' do açúcar, como matrizes de transcriptase reversa, a seguinte ordem parece prevalecer na inibição pelos derivados etídeos:



Os nossos dados indicam a importância da hidroxila livre na posição 2', uma vez que quando a mesma se encontra metilada (OCH₃) o efeito inibitório é menor.

3.3 ALCALÓIDES SOLÚVEIS EM ÁGUA

Alcalóides são produtos naturais agrupados por apresentarem, em comum, um nitrogênio básico. Estes possuem uma larga variedade de propriedades biológicas, como anti-microbiana (HAHN & CIAK, 1975), anti-câncer (BURRET et al., 1989), etc.

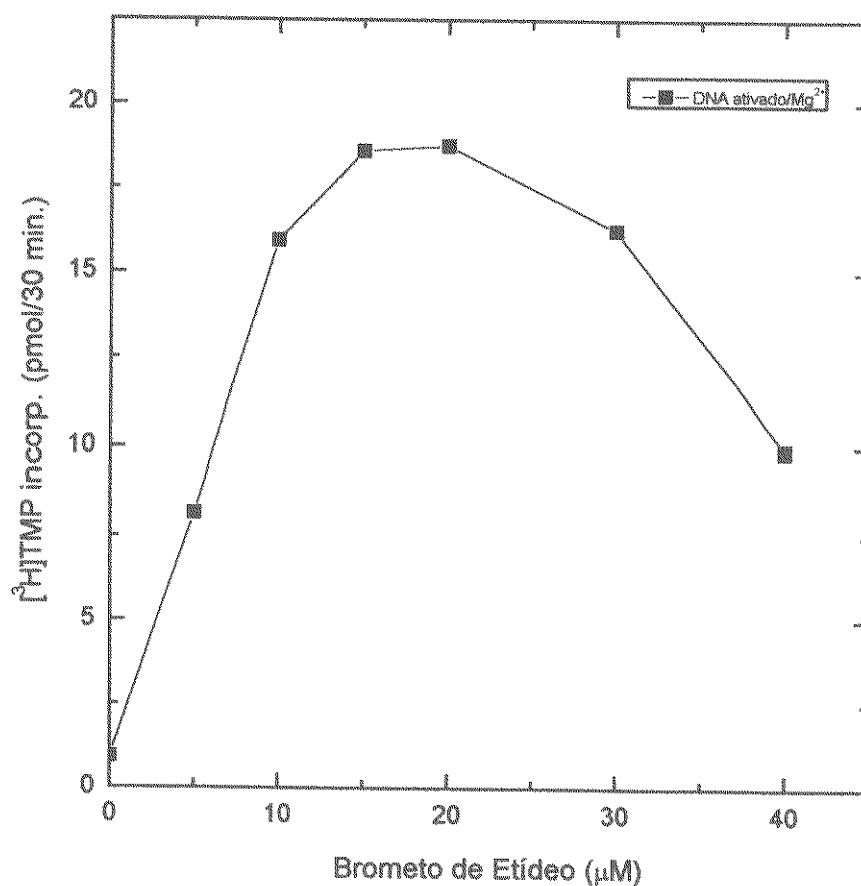


FIGURA 17. Efeito de Brometo de Etídeo na Atividade de DNA Polimerase C de Germen de Trigo.

Concentrações crescentes de brometo de etídeo foram adicionadas ao meio de reação, utilizando-se DNA ativado 0,020 mg/ml e Mg^{2+} 6,0 mM. As condições do ensaio são as mesmas descritas em Material e Métodos.

Estudos de alcalóides e outros produtos naturais como inibidores de transcriptase reversa viral (KAKIUCHI et al., 1987; ONO & NAKANE, 1990; SARRAGIOTO, 1981) são importantes principalmente no que se refere à possíveis aplicações médicas, uma vez que, quase sempre, possuem menor toxicidade.

Inicialmente serão descritas as atividades de alguns alcalóides solúveis em água (Tabela III).

De acordo com os resultados da Tabela III, pode-se observar que o alcalóide berberina (500 µg) apresentou uma maior inibição (97%) na reação catalisada pela transcriptase reversa em presença da matriz-iniciador poli(rA)(dT)₁₂. O estudo deste alcalóide e alguns análogos como inibidores da atividade de transcriptase reversa já foi descrito por SETHI, 1983; 1985. Utilizando-se DNA ativado como matriz, os alcalóides pilocarpidina, citisina, oxipertina, fisostigmina e pseudocodeína inibem a reação catalisada pela enzima viral.

O alcalóide metoximetilvoacalotina também apresentou uma inibição considerável na reação catalisada pela transcriptase reversa viral. Foi realizado um estudo mais detalhado deste alcalóide devido a maior disponibilidade, solubilidade em água e inibição da enzima viral. Apesar da similaridade de estrutura com os alcalóides solúveis em DMSO, metoximetilvoacalotina é solúvel em água (Tabela X e Anexo I).

Outros alcalóides solúveis em água foram estudados separadamente por serem estruturalmente relacionados e para facilitar a análise da estrutura-função destes alcalóides (Tabela V).

3.3.1 Metoximetilvoacalotina (trabalho publicado, Anexo II)

O alcalóide metoximetilvoacalotina (MMV) foi purificado de *Peschiera campestris* tendo inibido a atividade de TR de AMV com as três matrizes utilizadas: poli(rA)(dT)₁₂, poli(rC)(dG)₁₂ e DNA ativado. Esta inibição é apresentada através das curvas dose-resposta de inibição catalítica desta enzima (Figura 18). Foi observado uma inibição mais acentuada na presença da matriz-iniciador poli(rC)(dG)₁₂. O efeito inibitório foi, então, alterado pela natureza das matrizes-iniciadores, sugerindo que a inibição não é devido a interação do alcalóide com a enzima. Esta interação pode ser observada através dos diferentes valores de IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50% da atividade enzimática) obtidos: 5,0; 3,5 e 1,0 mM para poli(rA)(dT)₁₂, DNA ativado e poli(rC)(dG)₁₂, respectivamente. A maior inibição da atividade da TR poli(rC)(dG)₁₂-dependente contrasta com a inibição dos alcalóides

Tabela III. Efeito de Alcalóides Solúveis em Água na Atividade de Transcriptase Reversa de AMV.

Adição	(³ H)TMP incorporado (%)	
	Poli(rA)(dT) ₁₂	DNA ativado
Nenhuma	100	100
Metoximetilvoacalotina	62	57
Pilocarpina	72	95
Pilocarpidina	89	20
Citisina	94	78
Oxipertina	94	16
Fisostigmina	82	16
Pseudocodeina	91	18
Papaverinol	47	21
Berberina	3	50
Laudanosina	94	92

As condições de ensaio são as mesmas descritas em Material e Métodos, em presença de poli(rA)(dT)₁₂ 0,010 mg/ml ou DNA ativado 0,020 mg/ml como matriz-iniciador e Mg²⁺ 6,0 mM. Concentração dos alcalóides: 500 µg/ml.

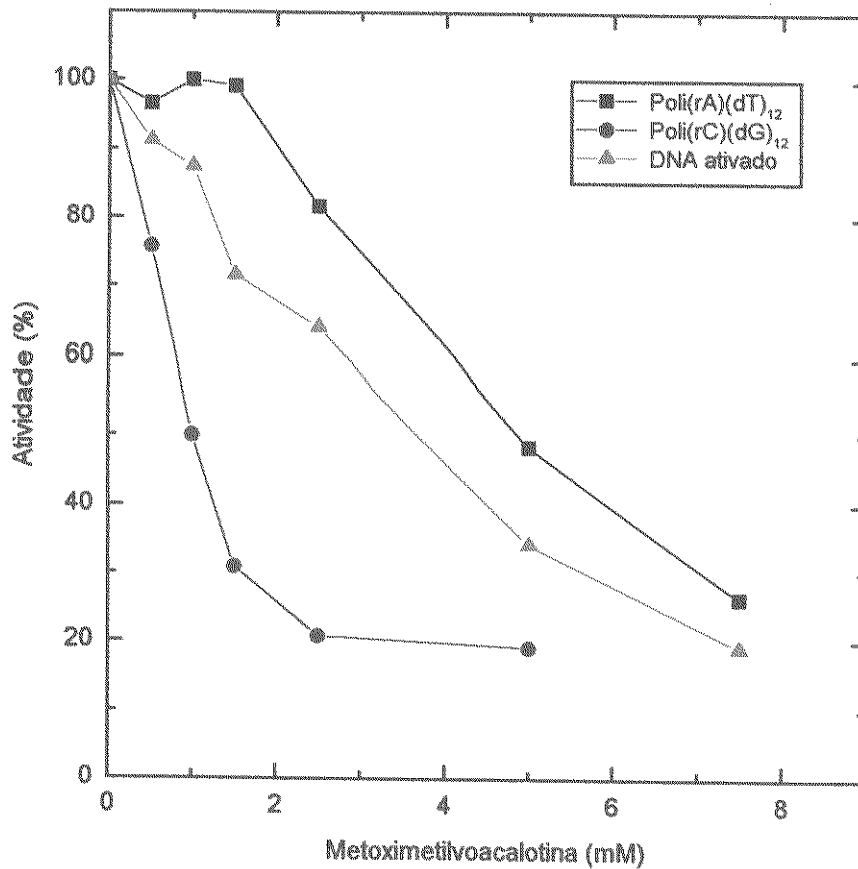


FIGURA 18. Curvas Dose-Resposta de Inibição Catalítica da Transcriptase Reversa de AMV por 12-Metoxi-Nb-metilvoacalotina (MMV).

As condições experimentais são as mesmas descritas em Material e Métodos, na presença de diferentes concentrações de MMV e Mg^{2+} 10,0 mM. Foram determinadas a incorporação de [3H]TMP em poli (rA)(dT)₁₂ 0,010 mg/ml e DNA ativado 0,020 mg/ml e a incorporação de [3H]dGMP em poli (rC)(dG)₁₂ 0,010 mg/ml. A atividade residual foi calculada como uma percentagem daquela obtida na ausência do composto.

benzofenantridínicos onde uma maior sensibilidade foi observada com poli(rA)(dT)₁₂ do que com poli(rC)(dG)₁₂ (SETHI, 1985). Observações semelhantes também foram mostradas por KAKIUCHI et al., 1985 utilizando taninos como inibidores. Estes pesquisadores atribuíram este efeito a forte afinidade de ligação destes compostos com os pares de base A-T da matriz-iniciador.

Para uma melhor elucidação do mecanismo de inibição desta enzima por MMV, foi utilizado as diferentes matrizes-sintéticas poli(rA)(dT)₁₂ e poli(dAFluor)(dT)₁₂ e os cátions divalentes, Mg²⁺ e Mn²⁺ (Tabela IV). A atividade enzimática da TR não foi significativamente alterada pela natureza das matrizes-iniciadores, sugerindo que esta inibição foi devido a interação deste alcalóide com a enzima e não com as matrizes-iniciadores. Estes resultados também demonstram que a inibição desta enzima não é dependente dos cátions divalentes (Mg²⁺ e Mn²⁺) usados (Tabela IV).

Estudos cinéticos foram realizados através do aumento da concentração da matriz-iniciador poli(rA)(dT)₁₂ ou DNA ativado, na ausência e em presença de 5,0 e 7,5 mM de metoximetilvoacalotina. Em ambos os casos, inibição não competitiva é mostrada nas Figuras 19 e 20. Estes resultados sugerem que MMV liga-se à transcriptase reversa de AMV em sítios diferentes aos sítios de ligação de poli(rA)(dT)₁₂ ou DNA ativado na síntese de DNA RNA-dependente ou DNA-dependente. Os valores de K_i = 6,0 mM para DNA ativado e K_i = 3,7 mM para poli(rA)(dT)₁₂ foram determinados através do gráfico de Dixon (Figura 19 e 20, internos).

3.3.2 Laurifolina

Estudamos o efeito de outros alcalóides estruturalmente análogos, solúveis em água, na atividade de transcriptase reversa, utilizando-se diferentes matrizes-iniciadores.

Dos alcalóides testados, a laurifolina foi o único que inibiu a atividade de transcriptase reversa dependente de poli(rA)(dT)₁₂ e mostrou um menor efeito quando o DNA ativado foi utilizado como matriz (Tabela V). Através das estruturas destes alcalóides pode-se notar que a laurifolina, diferentemente dos outros análogos, possui dois grupamentos OH livres. Quando estes grupos estão metilados (N-metil glaucina) não observamos mais inibição da reação poli(rA)(dT)₁₂-dependente.

Diante das observações de que alguns alcalóides são potenciais inibidores da atividade de transcriptase reversa (SETHI, 1983) nós investigamos o efeito do

Tabela IV. Efeito de Metoximetilvoacalotina (MMV) na Atividade de Transcriptase Reversa de AMV com Análogos Poliadenílicos como Matrizes.

Adição	⁽³⁾ H)TMP incorporado (%)		
	Poli(rA)(dT) ₁₂	Poli(dAFl)(dT) ₁₂	
	Mn ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺
Nenhuma	100	100	100
MMV 2,5 mM	72	76	77
MMV 5,0 mM	42	30	33

As condições de ensaio são as mesmas descritas em Material e Métodos, em presença de Mg²⁺ 10,0 mM ou Mn²⁺ 0,2 mM nas concentrações indicadas.

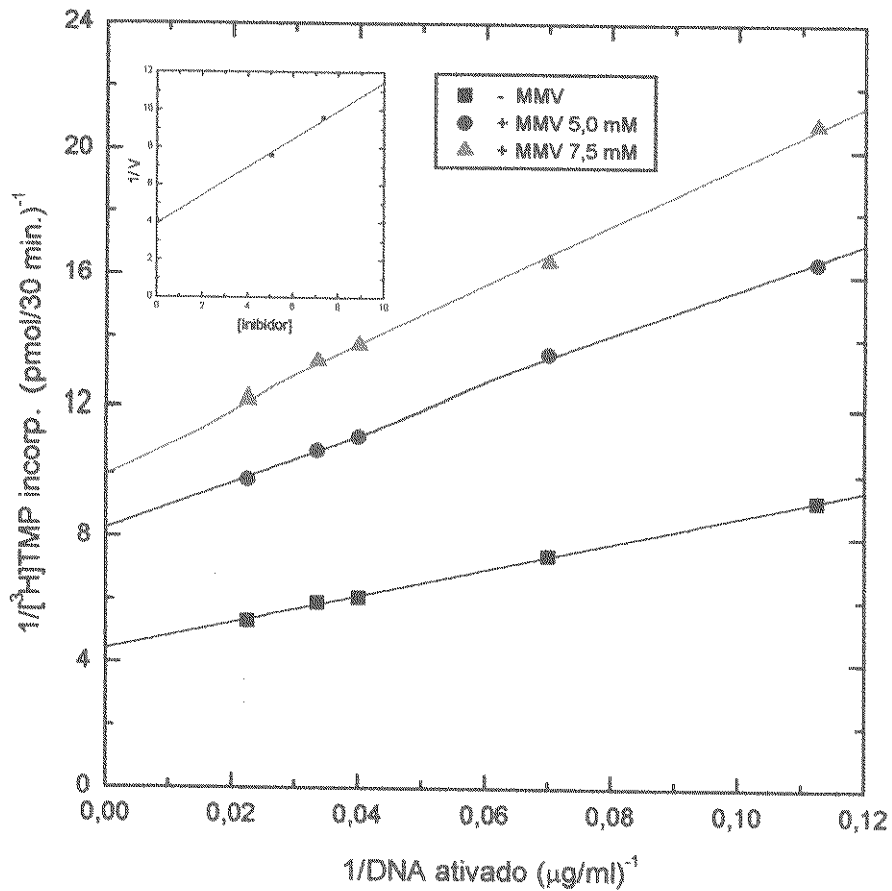


FIGURA 19. Gráfico dos Duplo-Recíprocos de Lineweaver-Burk de Inibição da Transcriptase Reversa de AMV por 12-Metoxi-Nb-metilvoacalotina (MMV) com Relação a DNA Ativado.

As condições experimentais são as mesmas descritas em Material e Métodos, variando-se a concentração de DNA ativado, na ausência e em presença de MMV 5,0 e 7,5 mM. Gráfico de Dixon (interno).

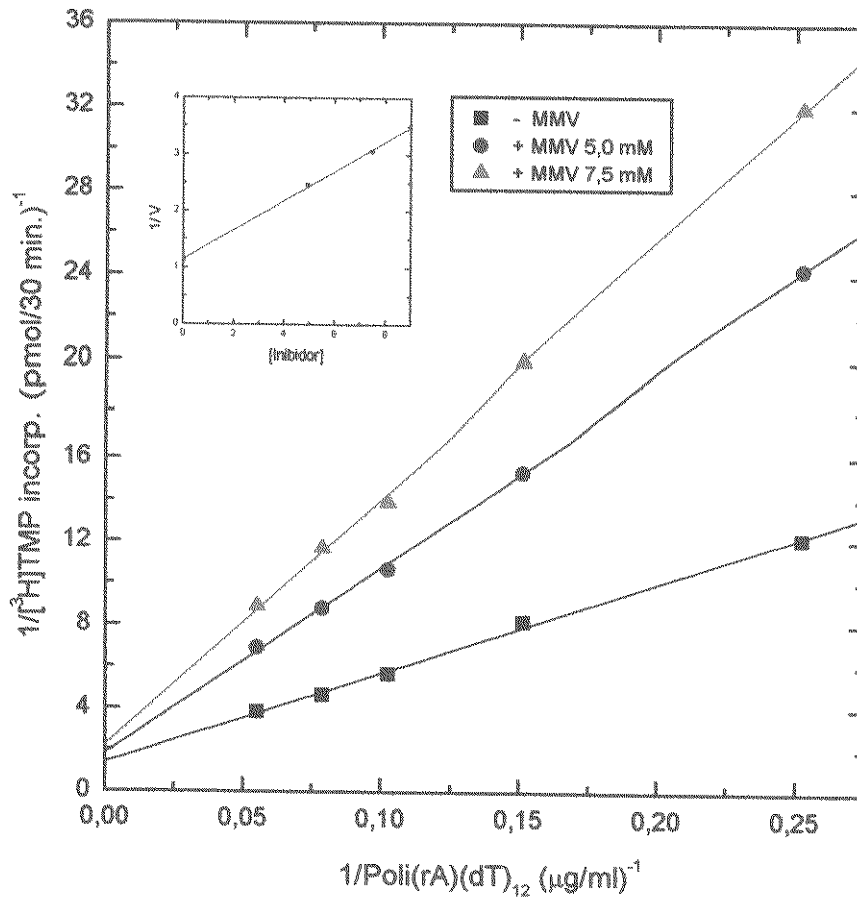


FIGURA 20. Gráfico dos Duplo-Recíprocos de Lineweaver-Burk de Inibição da Transcriptase Reversa de AMV por 12-Metoxi-Nb-metilvoacalotina (MMV) em Relação a Poli(rA)(dT)₁₂.

As condições experimentais são as mesmas descritas em Material e Métodos, variando-se a concentração de poli(rA)(dT)₁₂, na ausência e em presença de MMV 5,0 e 7,5 mM. Gráfico de Dixon (interno).

Tabela V. Efeito de Alcalóides Estruturalmente Relacionados e Solúveis em Água na Atividade de Transcriptase Reversa de AMV.

Adição	(^3H)TMP incorporado (%)	
	Poli(rA)(dT) ₁₂	DNA ativado
Nenhuma	100	100
Laurifolina	52	75
N-metil isocoridina	100	65
O-metil-N-metil isocoridina	100	54
N-metil glaucina	92	53

As condições de ensaio são as mesmas descritas em Material e Métodos, em presença de poli(rA)(dT)₁₂ 0,010 mg/ml ou DNA ativado 0,020 mg/ml como matrizes-iniciadores e de Mg^{2+} 6,0 mM. Os alcalóides estão na concentração de 500 $\mu\text{g/ml}$.

alcalóide laurifolina sobre a atividade de transcriptase reversa de vírus de mieloblastose de aves (AMV). Este alcalóide isoquinolínico pertence a classe dos aporfinicos. Os aporfinicos constituem, depois dos *bis*benzilisquinolínicos, o maior grupo de alcalóides da natureza. Possuem, geralmente, um grupo metílico ligado ao átomo de nitrogênio terciário. Sais quaternários de aporfinicos, com dois grupos metílicos ligados ao nitrogênio, são comumente encontrados na natureza (MARSAIOLI et al., 1978).

A inibição *in vitro* da atividade de transcriptase reversa na presença do alcalóide laurifolina é apresentada através das curvas dose-resposta de inibição da função catalítica desta enzima (Figura 21). Para um melhor esclarecimento do mecanismo de ação desta enzima, foram utilizados as diferentes matrizes-iniciadores sintéticas poli(rA)(dT)₁₂ e poli(dAFl)(dT)₁₂ e os cátions divalentes, Mg^{2+} e Mn^{2+} . Foi previamente mostrado que o análogo de ácido poliadenílico com o fluor na posição 2'

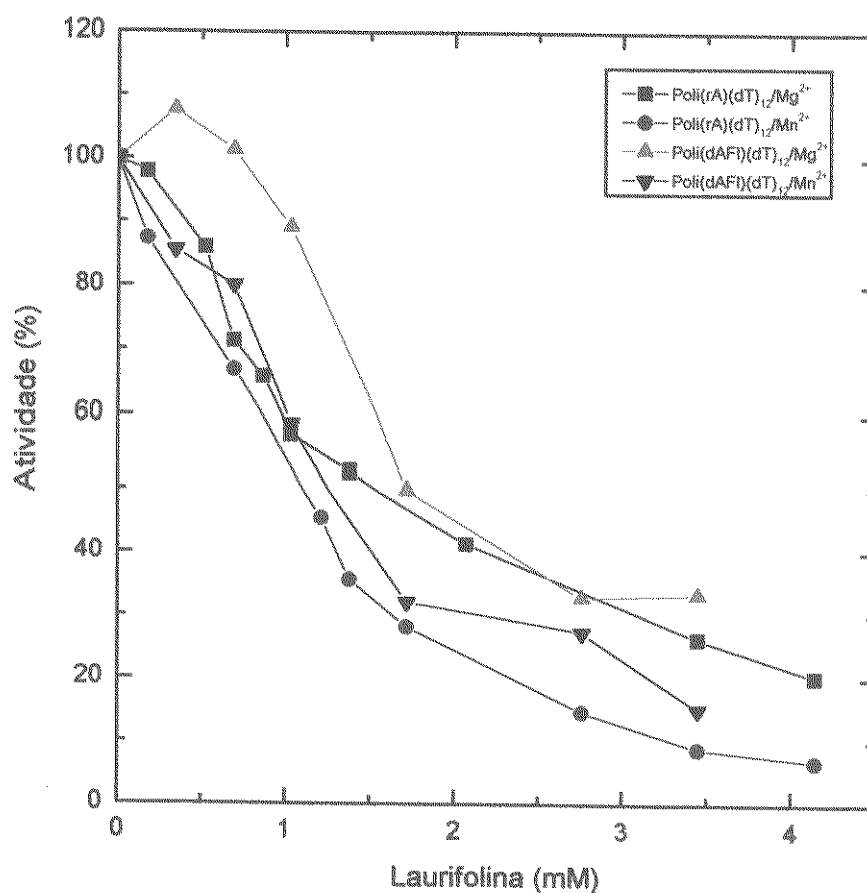


FIGURA 21. Curvas Dose-Resposta de Inibição da Função Catalítica de Transcriptase Reversa de AMV por Laurifolina Utilizando-se Polinucleotídeos Sintéticos como Matrizes.

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos, utilizando-se poli(rA)(dT)₁₂ 0,010 mg/ml, poli(dAFI)(dT)₁₂ 0,010 mg/ml, Mg²⁺ 6,0 mM e Mn²⁺ 0,2 mM. A atividade enzimática sem laurifolina foi considerada 100 %.

Tabela VI. Efeito de Laurifolina na Atividade de Transcriptase Reversa de AMV Utilizando-se Diferentes Matrizes e Cátions Divalentes.

Matrizes	IC ₅₀
Poli(dAFI)(dT) ₁₂ /Mg ²⁺	1,75
Poli(dAFI)(dT) ₁₂ /Mn ²⁺	1,28
Poli(rA)(dT) ₁₂ /Mg ²⁺	1,49
Poli(rA)(dT) ₁₂ /Mn ²⁺	1,10

A atividade enzimática foi determinada conforme descrito em Material e Métodos. Os valores de IC₅₀, expressos em mM, foram determinados através das curvas dose-resposta (Figura 21) de inibição das diferentes atividades obtidas com o aumento da concentração de laurifolina.

do açúcar, o poli(dAFI)(dT)₁₂, é uma eficiente matriz para a atividade polimerásica da transcriptase reversa de AMV (AOYAMA et al., 1985).

De acordo com os valores de IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50% da atividade enzimática), a atividade enzimática não foi significativamente alterada pela natureza das matrizes-iniciadores, sugerindo que esta inibição foi devido à interação deste alcalóide com a enzima e não com as matrizes-iniciadores. Estes resultados também demonstram que a inibição de TR não é dependente dos cátions divalentes (Mg²⁺ e Mn²⁺) usados (Tabela VI).

A inibição de TR por laurifolina foi analisada cineticamente com relação a poli(rA)(dT)₁₂ e dTTP. Este estudo foi realizado através do aumento da concentração das matrizes-iniciadores usadas, na ausência e em presença de laurifolina. Em ambos os casos, inibição não competitiva típica é mostrada nas Figuras 22 e 23. A interação de laurifolina com outro sítio enzimático pode modificar a afinidade para os sítios das matrizes-iniciadores sem uma interação direta do inibidor com estas matrizes-iniciadores. A inibição pode também ser devido a ligação do inibidor com o complexo enzima-matriz mas não com a matriz ou a enzima livre. As velocidades iniciais

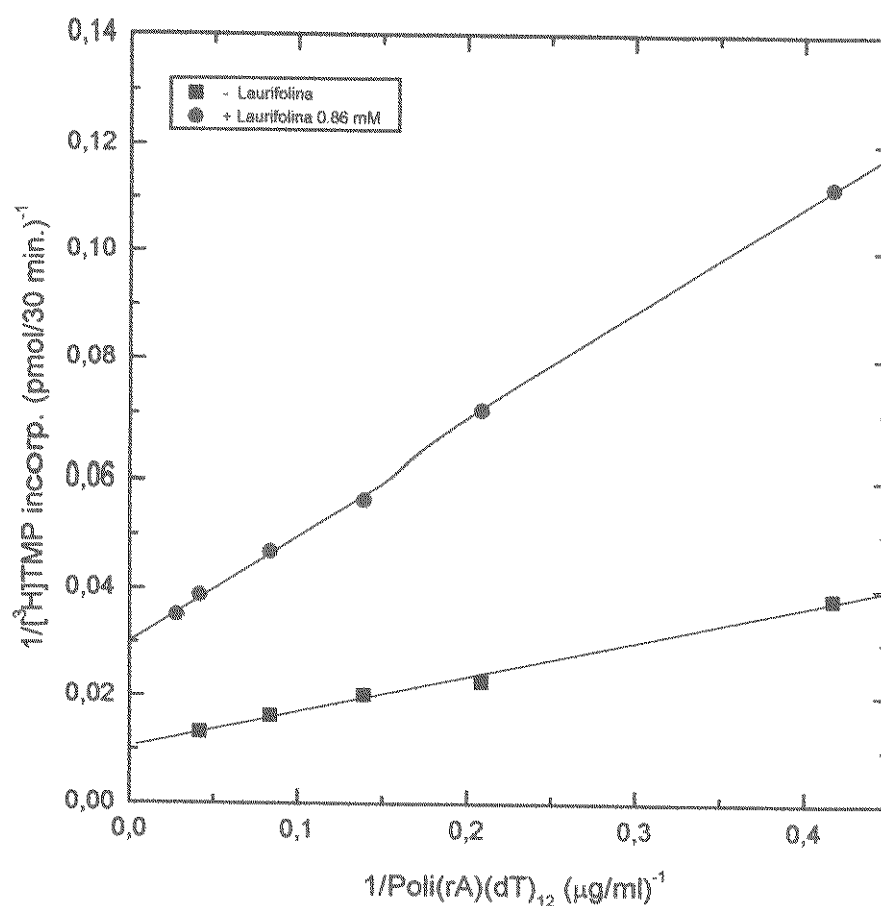


FIGURA 22. Gráfico dos Duplo-Recíprocos de Lineweaver-Burk de Inibição da Transcriptase Reversa de AMV por Laurifolina em Relação a Poli(rA)(dT)_{12} .

As condições experimentais são as mesmas descritas em Material e Métodos, variando-se a concentração de poli(rA)(dT)_{12} na ausência e em presença de laurifolina 0,86 mM.

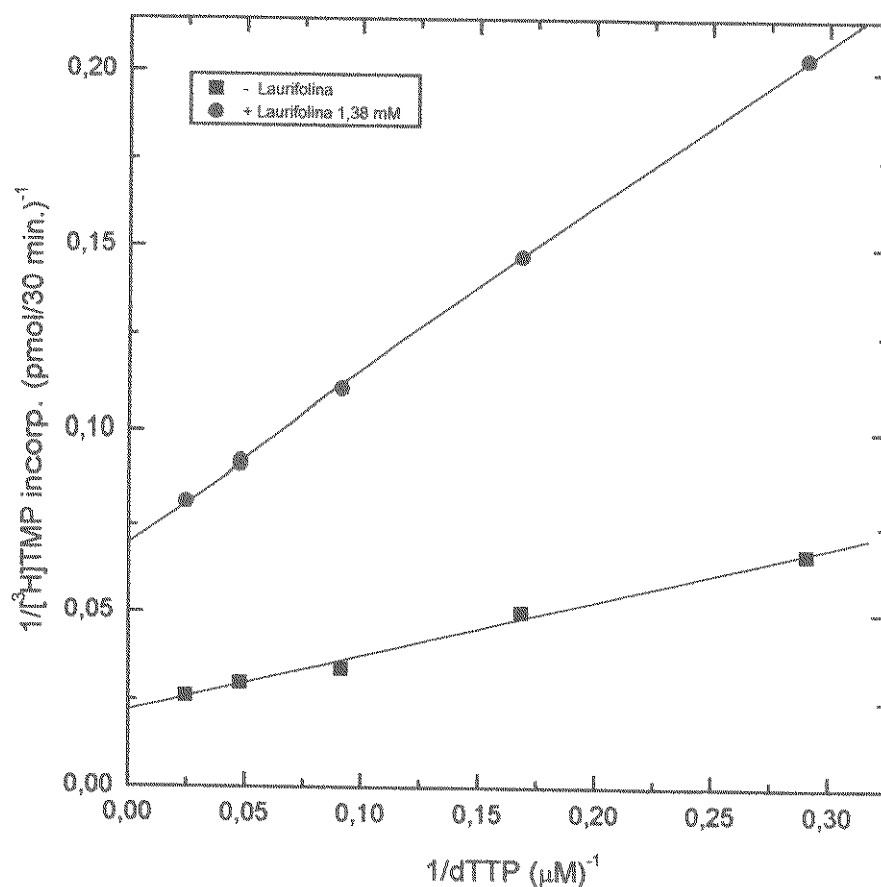


FIGURA 23. Gráfico dos Duplo-Recíprocos de Lineweaver-Burk de Inibição da Transcriptase Reversa de AMV por Laurifolina com Relação a dTTP.

As condições experimentais são as mesmas descritas em Material e Métodos, variando-se a concentração de desoxitimidina trifosfato (dTTP), na ausência e em presença de laurifolina 1,38 mM.

TABELA VII. Parâmetros Cinéticos da Reação Catalisada por Transcriptase Reversa de AMV na Ausência e em Presença de Laurifolina

Substrato	K_m^a	K_i^a	K_i/K_m
dTTP	6,28	0,66	0,10
Poli(rA)(dT) ₁₂	6,25	0,45	0,07

^a Expresso em μM para dTTP e em $\mu\text{g/ml}$ para poli(rA)(dT)₁₂.

Os valores de K_m foram determinados através dos gráficos de duplos-recíprocos (Lineweaver-Burk) utilizando-se o programa Origin a partir dos dados das Figuras 2 e 3. Os valores de K_i foram determinados a partir da fórmula $K_i = \frac{i}{\frac{V}{V_p} - 1}$, onde K_i , i , V_p e V são, respectivamente,

a constante de inibição, concentração do inibidor, velocidade máxima em presença do inibidor e velocidade máxima na ausência do inibidor.

lineares de incorporação de [^3H]TMP foram calculadas e os valores das constantes cinéticas foram determinados através dos gráficos de duplo-recíprocos da velocidade *versus* a concentração do substrato (Lineweaver-Burk). Os valores de K_m e K_i para as duas matrizes utilizadas são apresentados na Tabela VII. Os valores de K_i para laurifolina, obtido com concentrações variáveis de poli(rA)(dT) $_{12}$ e dTTP são menores do que os valores de K_m , como indicado pelas baixas razões de K_i/K_m (Tabela VII). Estes resultados sugerem uma maior afinidade enzima-inibidor, quando comparado com a afinidade enzima-substrato. Cinéticas de inibição semelhantes foram relatadas para alcalóides protoberberínicos sobre a atividade de transcriptase reversa de AMV (SETHI, 1983).

A velocidade da síntese de DNA foi medida à várias diluições da enzima, em presença de concentração saturante da matriz-iniciador, poli(rA)(dT) $_{12}$ (120 $\mu\text{g/ml}$) e do substrato marcado [^3H]dTTP (10 μM) (Figura 24).

Para verificar se a ligação da laurifolina à TR é reversível ou não, estudou-se o efeito desse alcalóide para várias concentrações da enzima.

Quando a concentração da enzima foi decrescida, as velocidades máximas do controle e da reação em presença de laurifolina 1,38 mM foram reduzidas proporcionalmente. A velocidade da reação foi diminuída cerca de 60 % em todas as concentrações testadas e, nenhum aumento na atividade inibitória da laurifolina foi notado como uma função do decréscimo das concentrações proteicas. Estes resultados são consistentes com uma inibição reversível da transcriptase reversa pelo alcalóide laurifolina.

3.4 SOLUBILIDADE DE ALCALÓIDES EM DMSO

Em relação aos alcalóides, um dos problemas encontrados foi a pouca solubilidade destes compostos em água. Portanto foi investigado o efeito de alguns solventes sobre a atividade da TR de AMV.

3.4.1 Efeito de Solventes

A Tabela VIII mostra o efeito de alguns solventes na atividade de transcriptase reversa (Anexo I). Com exceção de tetrahidrofurano, que ativa a reação catalisada pela transcriptase reversa, dimetilsulfóxido, dioxano e 2-metoxietanol são inibidores na concentração de 10%. Na concentração de 5%, observa-se um efeito ativador mais acentuado em presença de dimetilsulfóxido.

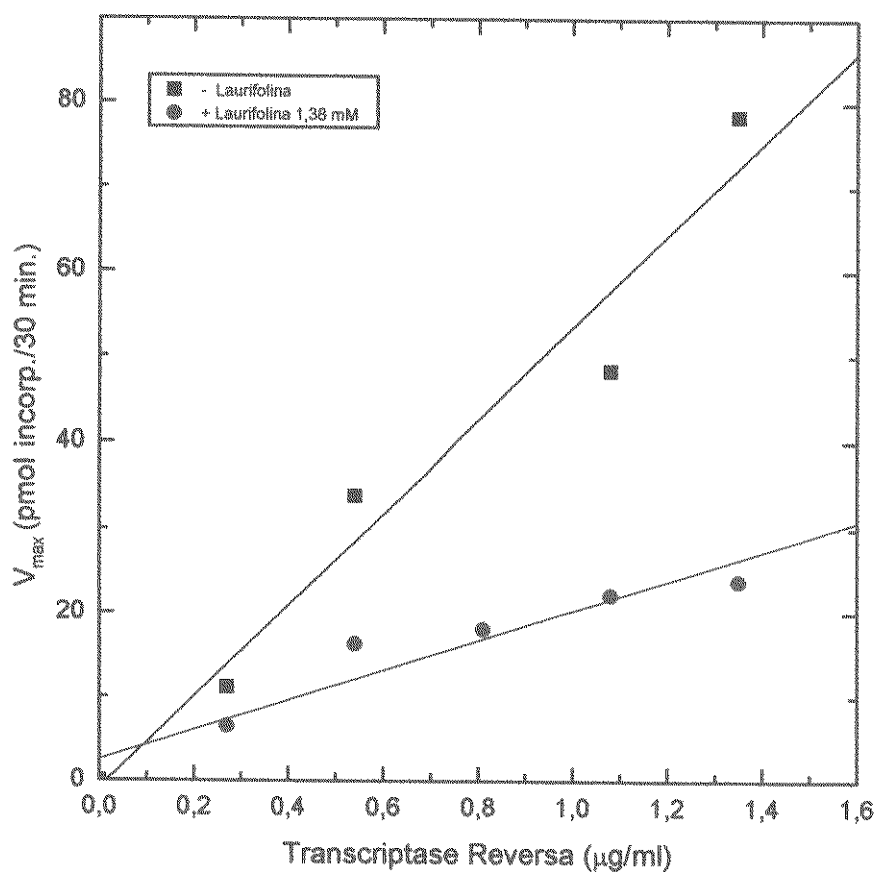


FIGURA 24. Efeito de Laurifolina na Velocidade da Reação Poli(rA)(dT)₁₂-dirigida da Transcriptase Reversa de AMV como uma Função da Concentração Enzimática.

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos e a velocidade de incorporação de dTTP radioativo, na ausência e em presença de laurifolina 1,38 mM foi medida como uma função de crescentes concentrações da enzima. As reações foram feitas em concentrações de saturação da matriz-iniciador poli(rA)(dT)₁₂ (12,0 µg/ml) e do substrato radioativo dTTP (10,0 µM) por 30 min. a 37°C.

Tabela VIII. Efeito de Solventes na Atividade de Transcriptase Reversa de AMV.

Adição	Concentração (%)	(³H)TMP incorporado (%)
Nenhuma	0	100
Dimetilsulfóxido	5	140
Dimetilsulfóxido	10	72
Dioxano	5	113
Dioxano	10	26
Tetrahidrofurano	5	115
Tetrahidrofurano	10	119
2-Metoxietanol	5	105
2-Metoxietanol	10	71

As condições são as mesmas descritas em Material e Métodos em presença de poli(rA)(dT)₁₂ como matriz-iniciador.

3.4.2 Estudos com DMSO (trabalho publicado, Anexo III)

Uma vez que DMSO foi utilizado na solubilização de vários alcalóides, no presente trabalho (Tabela X), foi feito um estudo mais detalhado na reação catalisada pela transcriptase reversa.

Pode-se observar pela Figura 25 que DMSO, na concentração de cerca de 5% ativa a reação catalisada pela transcriptase reversa utilizando-se DNA ativado ou poli(rA)(dT)₁₂ como matriz-iniciador. O efeito também persiste quando Mn²⁺ é utilizado no lugar de Mg²⁺ na reação dependente de poli(rA)(dT)₁₂. Por outro lado, concentrações de DMSO maiores que 10% inibem a reação catalisada pela enzima viral.

Estudou-se também o efeito de DMSO na atividade de transcriptase reversa em presença do análogo 2'-fluorado de poli(rA)(dT)₁₂ como matriz (Figura 26). Observou-se um efeito ativador de DMSO, entretanto, para uma concentração bem maior, cerca de 20%, concentração esta inibitória quando se utilizava poli(rA)(dT)₁₂ ou DNA ativado como matriz.

A Figura 27 mostra o efeito ativador de DMSO com o tempo de incubação na reação de polimerização catalisada pela transcriptase reversa, utilizando-se poli(rA)(dT)₁₂ como matriz-iniciador. Estudos de pré-incubação da transcriptase reversa na ausência e em presença de DMSO mostram que o efeito ativador deste solvente não deve estar relacionado com uma estabilização da enzima, muito pelo contrário, a presença de DMSO não aumenta a estabilidade da enzima (Figura 28). A Tabela IX mostra os valores de Km com relação a poli(rA)(dT)₁₂, calculados na ausência e em presença de DMSO. Os resultados mostram que, pelo menos em parte, o efeito ativador de DMSO pode estar relacionado com o decréscimo do valor de Km em presença do solvente. Uma explicação semelhante foi descrita por ROBINSON, 1975 com relação ao efeito ativador de DMSO na atividade de ATPase, onde o valor de Km para o ATP era menor em presença do solvente.

O DMSO possui uma estrutura compacta e relativamente pequena, uma natureza relativamente polar e uma capacidade de formar pontes de H (WOOD & WOOD, 1975; SZMANT, 1975). A combinação destas propriedades resulta na habilidade de DMSO de se associar com a água, proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, substâncias iônicas, e outros constituintes de sistemas biológicos. Quando se utiliza os polinucleotídeos sintéticos como matrizes, o efeito ativador de DMSO pode estar envolvido com as pontes de H que aquelas moléculas formam com a água

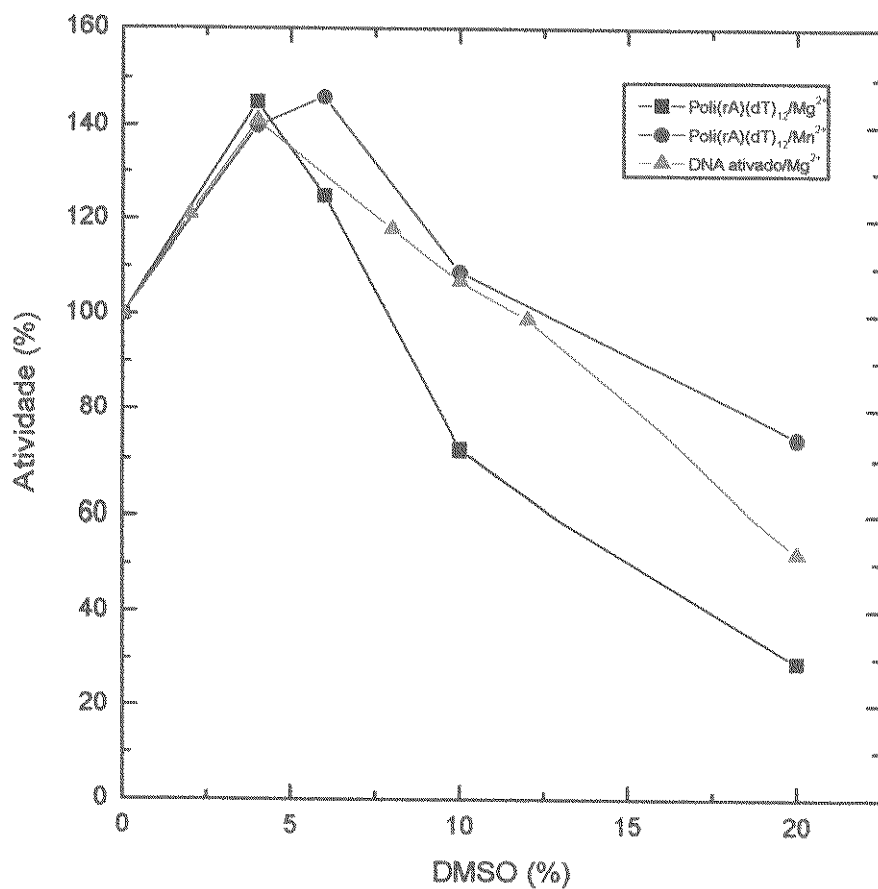


FIGURA 25. Efeito de DMSO na Atividade de Transcriptase Reversa de AMV.

As condições experimentais são as mesmas descritas em Material e Métodos, utilizando-se poli(rA)(dT)₁₂ 0,010 mg/ml, DNA ativado 0,020 mg/ml, Mg²⁺ 6,0 mM e Mn²⁺ 0,2 mM. A atividade enzimática de 100 % corresponde à da reação controle, na ausência do composto.

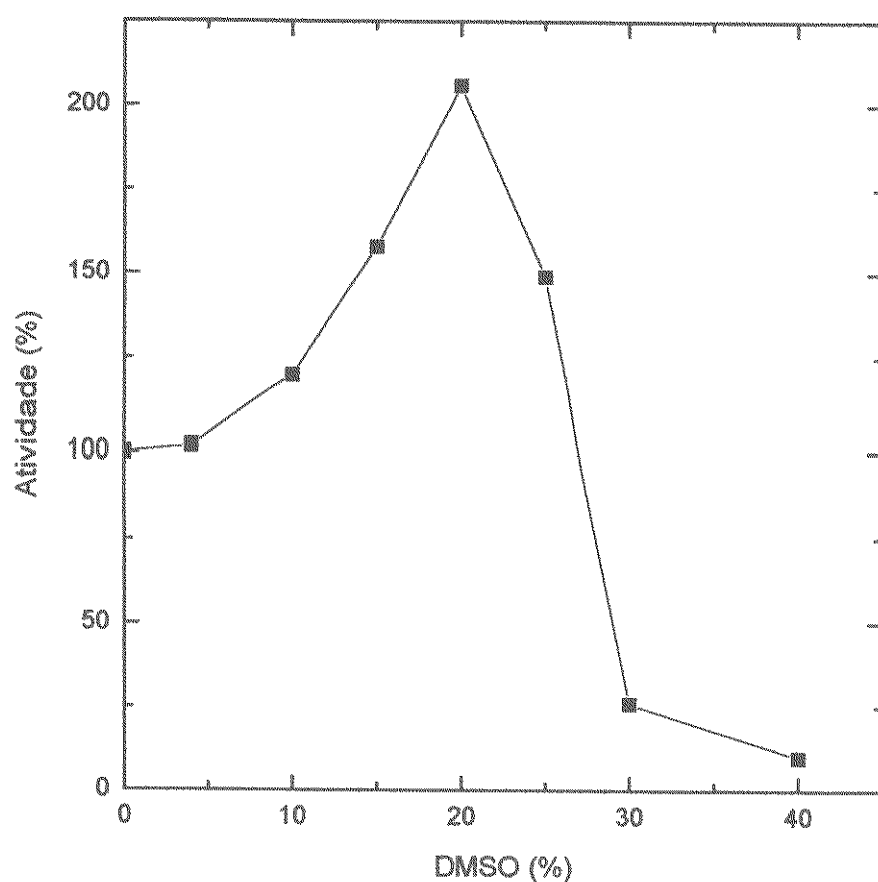


FIGURA 26. Efeito de DMSO na Atividade de Transcriptase Reversa de AMV Utilizando-se Poli(dAFluor)(dT)₁₂ como Matriz-iniciador.

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos, utilizando-se poli(dAFluor)(dT)₁₂ 0,010 mg/ml e Mg²⁺ 6,0 mM. As atividades obtidas foram calculadas como uma porcentagem das amostras controle sem DMSO e são apresentadas como uma função da concentração final de DMSO.

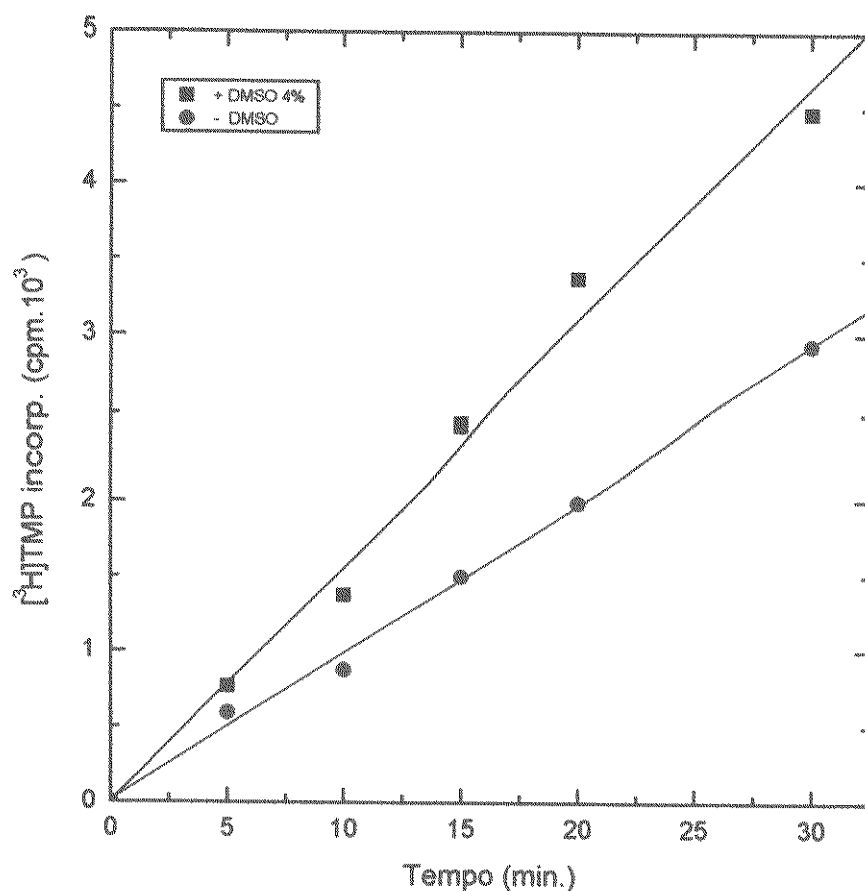


FIGURA 27. Efeito de DMSO na Atividade de Transcriptase Reversa de AMV Variando-se o Tempo de Incubação.

As atividades da enzima foram ensaiadas como descrito em Material e Métodos, utilizando-se como matriz-iniciador poli(rA)(dT)₁₂ e Mg²⁺ como cation divalente, na ausência e em presença de DMSO 4 %.

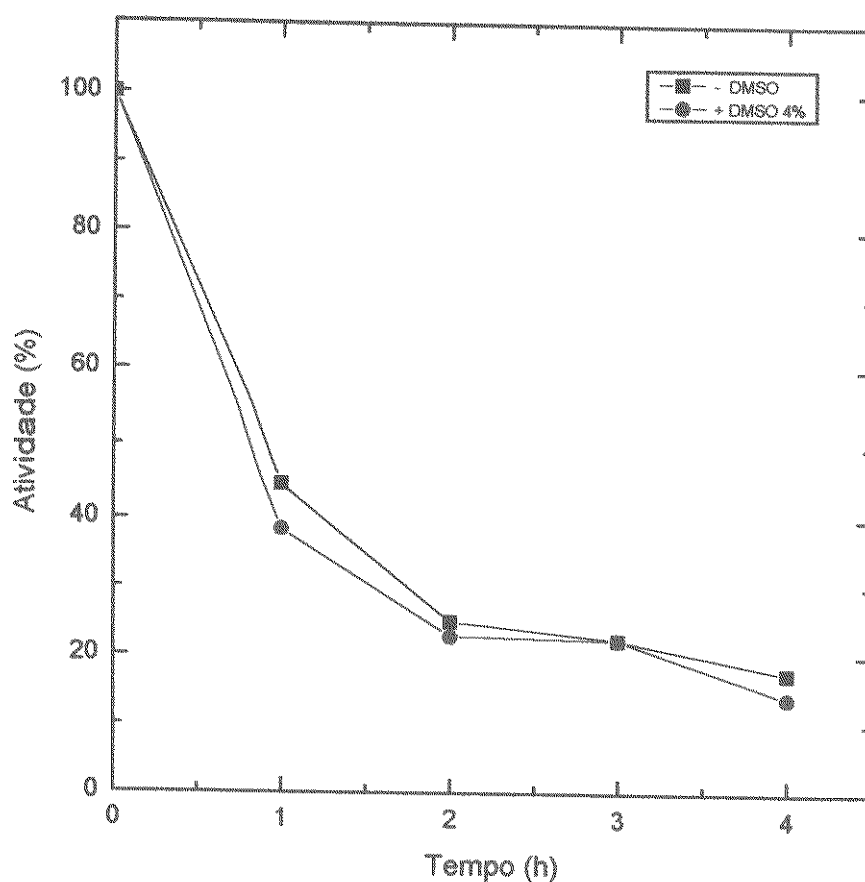


FIGURA 28. Efeito de DMSO na Pré-incubação de Transcriptase Reversa de AMV.

A transcriptase reversa foi pré-incubada a 0°C, na ausência e em presença de DMSO 4 %. Em seguida, adicionou-se os demais reagentes necessários para a reação enzimática dependente de poli(rA)(dT)₁₂, como descrito em Material e Métodos.

Tabela IX. Efeito do DMSO no Km Aparente na Reação Catalisada por Transcriptase Reversa com Relação a Poli(rA)(dT)₁₂.

Condições	Km (µg/ml)
Controle	9,1
+ DMSO	3,3

As condições de ensaio são as mesmas descritas em Material e Métodos, variando-se as concentrações de poli(rA)(dT)₁₂, na ausência e em presença de DMSO 6%.

(BOLTON & KEARNS, 1978). Substituindo-se o grupo OH na posição 2' por fluor, o efeito ativador de DMSO é mais pronunciado, e ocorre para uma concentração maior do solvente (Figura 26). É importante mencionar que o fluor conceitualmente pode formar pontes de H com a água, a exemplo de tRNA e dos polirribonucleotídeos (KAKIUCHI et al., 1982).

Efeitos de outros solventes na atividade de transcriptase reversa tem sido descritos na literatura. Entre eles encontram-se o efeito do polietilenoglicol (CHAN et al., 1980), glicerol e desinfetantes químicos (LIN et al., 1991).

3.4.3 Alcalóides Solúveis em DMSO

A maior parte dos alcalóides obtidos do Instituto de Química da Unicamp, é insolúvel em água. Estes alcalóides foram solubilizados em dimetil sulfóxido. A Tabela X mostra o efeito de alcalóides solúveis em DMSO na atividade de transcriptase reversa.

Os alcalóides erisodina, N-óxido de erisotrina, eritravina, eritravina acetilada, eritristemina e os sintéticos 2, 3 e 4 possuem estruturas análogas (Anexo I). Destes compostos, apenas erisodina e eritristemina mostraram efeito inibitório mais apreciável na reação catalisada por transcriptase reversa dependente de poli(rA)(dT)₁₂. Com DNA ativado como matriz, os alcalóides testados não apresentaram uma inibição apreciável na atividade de transcriptase reversa. Os alcalóides indicados na Tabela X como

Tabela X. Efeito de Alcalóides Solúveis em DMSO na Atividade de Transcriptase Reversa de AMV.

Adição	(³ H)TMP incorporado (%)	
	Poli(rA)(dT) ₁₂	DNA ativado
Nenhuma	100	100
Erisodina	30	55
Sintético 1	62	58
Sintético 2	109	74
Sintético 3	100	72
N-óxido de erisotrina	95	92
Eritravina	85	72
Eritristemina	30	100
Eritravina acetilada	88	79
Sintético 4	81	57

As condições de ensaio são as mesmas descritas em Material e Métodos, em presença de poli(rA)(dT)₁₂ ou DNA ativado como matriz-iniciador e de Mg²⁺. Concentração dos alcalóides: 500 µg/ml.

sintéticos 1, 2, 3 e 4, referem-se a alcalóides que foram sintetizados a partir de outros alcalóides naturais (SARRAGIOTO, 1981).

Das estruturas destes alcalóides (Anexo I) e correspondentes efeitos biológicos na atividade da enzima viral, podemos fazer algumas observações: a) substituintes no anel pentavalente (contendo N) e/ou ciclização (anel contendo 2 átomos de oxigênio) vizinho ao anel benzênico não aumenta o poder inibitório dos alcalóides (sintéticos 2, 3 e 4); b) acetilação do grupamento OH da eritravina não altera o efeito biológico do alcalóide; c) a presença de um átomo de oxigênio ligado ao nitrogênio (N-óxido da erisotrina) também não afeta o efeito do alcalóide; d) a metoxilação do alcalóide erisodina, no anel benzênico e no anel hexavalente contendo o átomo de nitrogênio, ainda mantém o efeito inibitório do composto na atividade de transcriptase reversa.

Apesar de uma efetiva inibição da TR por eritristemina em presença de poli(rA)(dT)₁₂ (Tabela X), a quantidade disponível deste alcalóide não era suficiente para um estudo mais detalhado.

3.4.4 Estudo do Alcalóide Erisodina

Estudou-se o efeito de erisodina na atividade de transcriptase reversa, em presença de diferentes matrizes (Figura 29). Baixas concentrações do alcalóide apresenta um maior efeito inibitório sobre a atividade de transcriptase reversa quando se usa DNA ativado como matriz. Assim, 50 µg/ml do alcalóide inibe 42% a atividade da enzima viral, em presença de DNA ativado, e 28% em presença de poli(rA)(dT)₁₂. Em presença de concentrações mais elevadas do alcalóide, a inibição é mais apreciável na reação de transcriptase reversa dirigida por poli(rA)(dT)₁₂. Com o análogo 2'-fluorado de poli(rA)(dT)₁₂, a menor inibição observada sugere a importância do grupo substituinte na posição 2' do açúcar. A inibição causada pelo alcalóide parece ser dependente do cátion divalente utilizado, uma vez que baixa inibição foi observada quando o Mg²⁺ foi substituído pelo Mn²⁺ na reação enzimática em presença de poli(rA)(dT)₁₂.

A erisodina é um inibidor do tipo competitivo com relação a matriz-iniciador poli(rA)(dT)₁₂ na reação catalisada pela transcriptase reversa (Figura 30). A erisodina compete, portanto, com o poli(rA)(dT)₁₂ pelo sítio ativo da enzima. Aumentando-se a concentração da matriz-iniciador 1,5 vezes (de 0,010 mg/ml, como descrito em Material e Métodos, para 0,015 mg/ml), o efeito inibitório da erisodina é revertido, voltando a apresentar uma atividade semelhante aquela obtida na ausência do inibidor, até a concentração de 400 µg/ml, inibindo a maiores concentrações. Portanto, 400

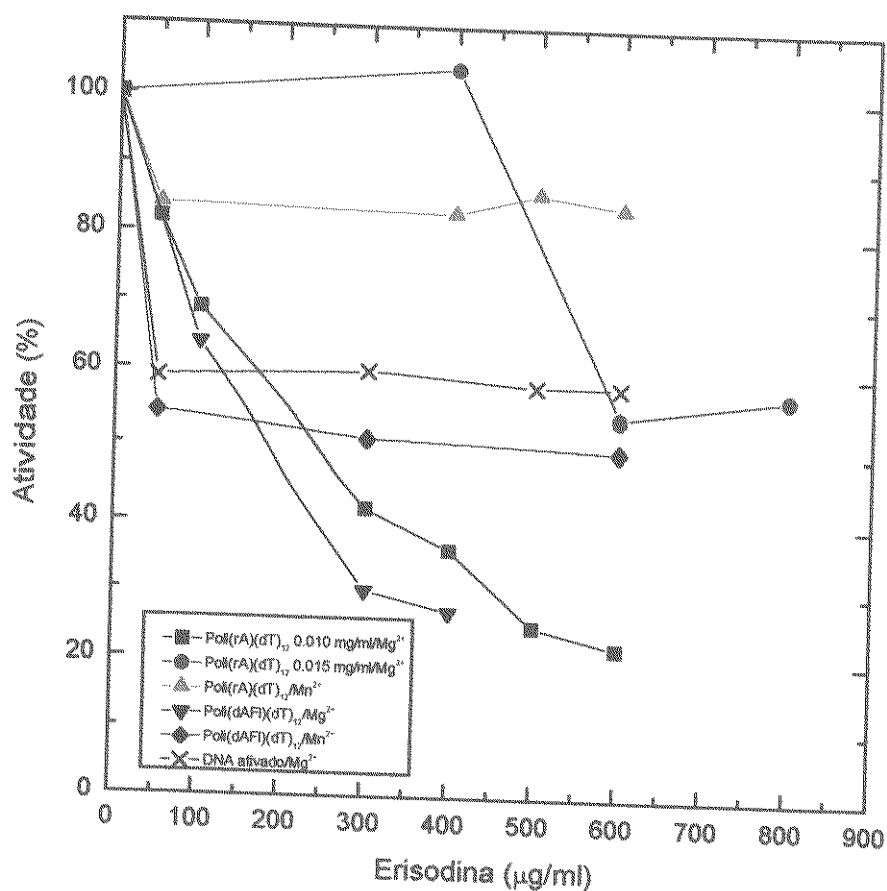


FIGURA 29. Curvas Dose-Resposta de Inibição Catalítica da Transcriptase Reversa de AMV por Erisodina.

As condições experimentais são as mesmas descritas em Material e Métodos, utilizando-se poli(rA)(dT)₁₂ 0,010 mg/ml e 0,015 mg/ml, poli(dAFI)(dT)₁₂ 0,010 mg/ml, DNA ativado 0,02 mg/ml, Mg²⁺ 6,0 mM e Mn²⁺ 0,2 mM. A atividade residual foi calculada como uma percentagem daquela obtida na ausência do composto.

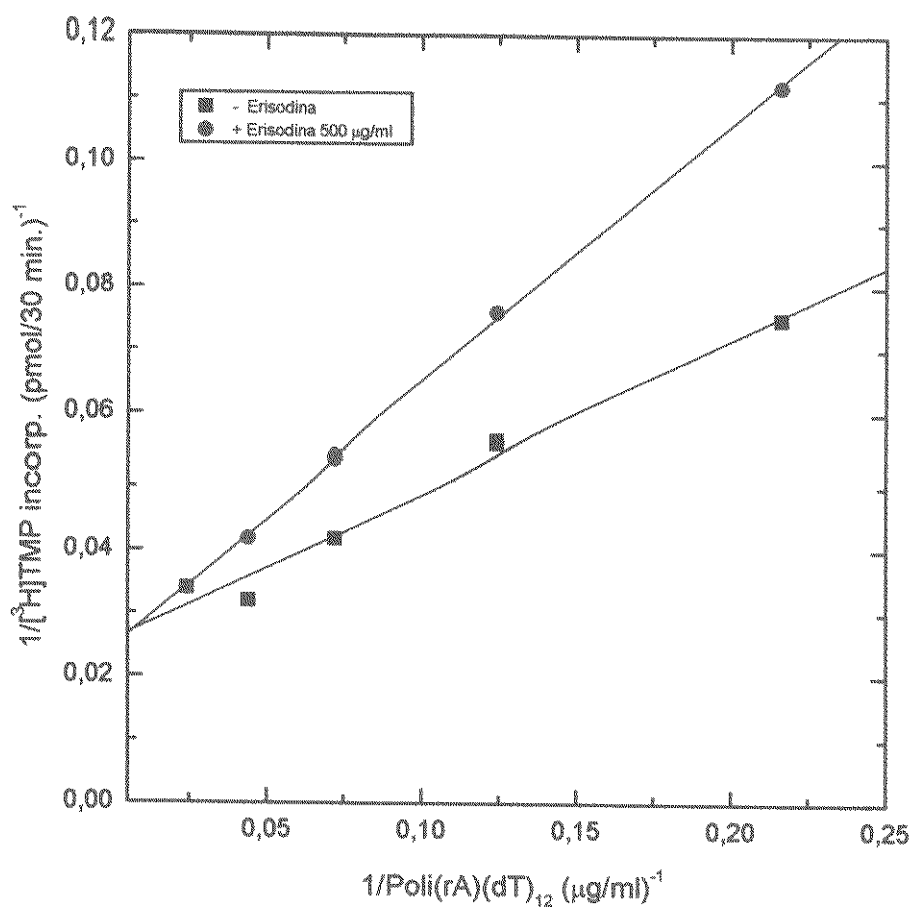


FIGURA 30. Gráfico dos Duplo-Recíprocos de Lineweaver-Burk de Inibição da Transcriptase Reversa de AMV por Erisodina, em Relação a Poli(rA)(dT)_{12} .

A atividade foi determinada conforme descrito em Material e Métodos, variando-se a concentração de poli(rA)(dT)_{12} , na ausência e em presença de erisodina 500 $\mu\text{g/ml}$.

$\mu\text{g/ml}$ de erisodina inibe cerca de 70% da atividade da transcriptase reversa em presença de poli(rA)(dT)₁₂ 0,010 mg/ml, enquanto que em presença de poli(rA)(dT)₁₂ 0,015 mg/ml, nenhum efeito inibitório foi observado (Figura 29).

3.5 EFEITO DE COMPOSTOS PLATÍNICOS

Os efeitos de compostos platínicos sobre a atividade de transcriptase reversa de AMV também foram analisados neste estudo e suas estruturas são apresentadas no Anexo I. Inicialmente foi feita uma seleção de compostos α -diimínicos de platina (II) e em seguida foi escolhido o composto Pt(BCP)(CBDCA) para um estudo mais detalhado de cinética enzimática (Tabela XI). Esta seleção foi realizada através da determinação dos valores de IC₅₀ obtidos das Figuras 31 a 35, utilizando-se a matriz-iniciador poli(rA)(dT)₁₂ (atividade DNA polimerase RNA-dependente) (RDDP) e DNA ativado (atividade DNA-dependente) (DDDP). Foi previamente mostrado que, como para outras transcriptases reversas, poli(rA)(dT)₁₂ é superior a poli(rC)(dG)₁₂ como matriz-iniciador sintético para a atividade DNA polimerase RNA-dirigida (HIZI et al., 1991; LOYA et al., 1995).

Os compostos platínicos (Tabela XI) foram sintetizados por FERREIRA (1994) a partir do sal de potássio de tetracloroplatina (II), K₂PtCl₄. Como ligante neutro foram utilizados heterocíclicos α -diimínicos derivados de fenantrolina, 2,2'-dipiridina, triazina e pirazina: 2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10 fenantrolina bactocuproina (BCP); 2,3-bis(2-piridil) pirazina (DPP); 2-[5,6-bis(4-sulfofenil)-1,2,4-triazina-3-il]-4-(4-sulfofenil)piridina (STSPY) e os ligantes aniônicos etilmalonato (EtMal) e 1,1'-ciclobutano dicarboxilato (CBDCA) (FERREIRA, 1994).

De acordo com os resultados da Tabela XI e Figura 33A, o composto Pt(BCP)(CBDCA) apresentou um menor valor de IC₅₀ para a atividade RDDP, enquanto que o IC₅₀ para a atividade DDDP foi cerca de 5 vezes maior. Pt(BCP)(CBDCA) é, então, um inibidor mais efetivo da atividade DNA polimerase RNA-dependente do que da atividade DNA polimerase DNA-dependente (Figura 33A). O composto K₂PtCl₄, que deu origem aos outros compostos platínicos utilizados, inibiu a atividade RDDP em maiores concentrações, mas o valor de IC₅₀ é mais de 8 vezes maior quando comparado ao composto Pt(BCP)(CBDCA). A atividade DDDP foi aumentada mais de 40% (Figura 31). Um padrão de inibição e ativação semelhante ao K₂PtCl₄ foi observado com o composto Pt(DPP)(CBDCA), apesar de suas estruturas serem bem diferentes (Figura 34A). O efeito de ativação é, portanto, dependente da matriz usada (RNA ou DNA). Previamente, já havíamos observado um

Tabela XI. Inibição das Atividades RDDP e DDDP de Transcriptase Reversa de AMV por Compostos Platínicos

Compostos Platínicos	Atividade [IC ₅₀ (mM)]	
	RDDP	DDDP
Pt(BCP)(CBDCA)	0,13	0,69
Pt(BCP)(EtMal)	0,15	0,82
Pt(DPP)(CBDCA)	1,01	*
Pt(DPP)(EtMal)	1,55	*
Pt(STSPY)(CBDCA)	0,17	0,30
Pt(STSPY)(EtMal)	0,18	0,40
K ₂ PtCl ₄	1,08	*
Pt(NH ₃) ₂ (CBDCA)	*	*

* Valores de IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50% da atividade enzimática) não atingidos.

Abreviações: BCP-2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10 fenantrolina (bactocuproina); CBDCA-1,1'-ciclobutano dicarboxilato; EtMal-etilmalonato; DPP-2,3-bis(2-piridil)pirazina; STSPY-2-[5,6-bis (4-sulfonil)- 1,2,4-triazina-3-il] -4-(4-sulfonil) piridina; Pt(NH₃)₂ (CBDCA)-carboplatina.

Os compostos platínicos foram testados em concentrações crescentes. A atividade RDDP (DNA polimerase RNA-dependente) foi ensaiada com poli(rA)(dT)₁₂ 0,010 mg/ml e a atividade DDDP (DNA polimerase DNA-dependente) com DNA ativado 0,020 mg/ml. As condições do ensaio são as mesmas descritas em Material e Métodos. Os valores de IC₅₀ foram determinados através das diferentes curvas de inibição (Figuras 31-35).

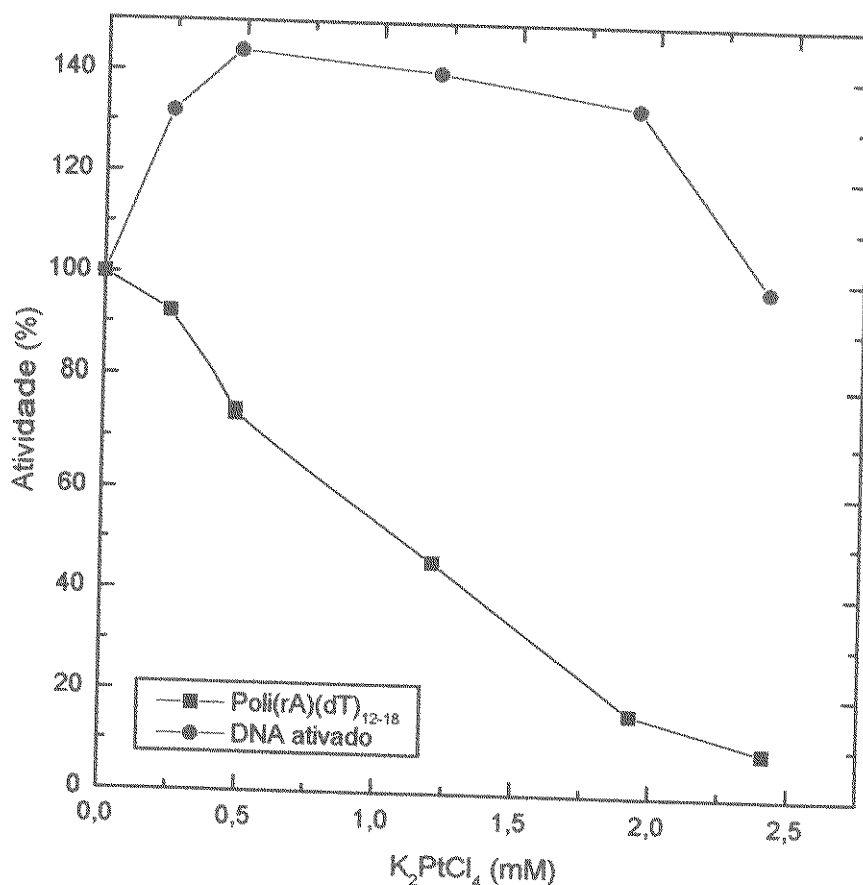


FIGURA 31. Efeito de Tetracloroplatina (II) na Atividade de Transcriptase Reversa de AMV.

Concentrações crescentes de K_2PtCl_4 foram adicionadas a diferentes meios de reação, utilizando-se $poli(rA)(dT)_{12}$ 0,010 mg/ml (atividade RDDP) e DNA ativado 0,020 mg/ml (atividade DDDP). As condições do ensaio são as mesmas descritas em Material e Métodos e a atividade enzimática de 100 % corresponde à da reação controle, na ausência do composto.

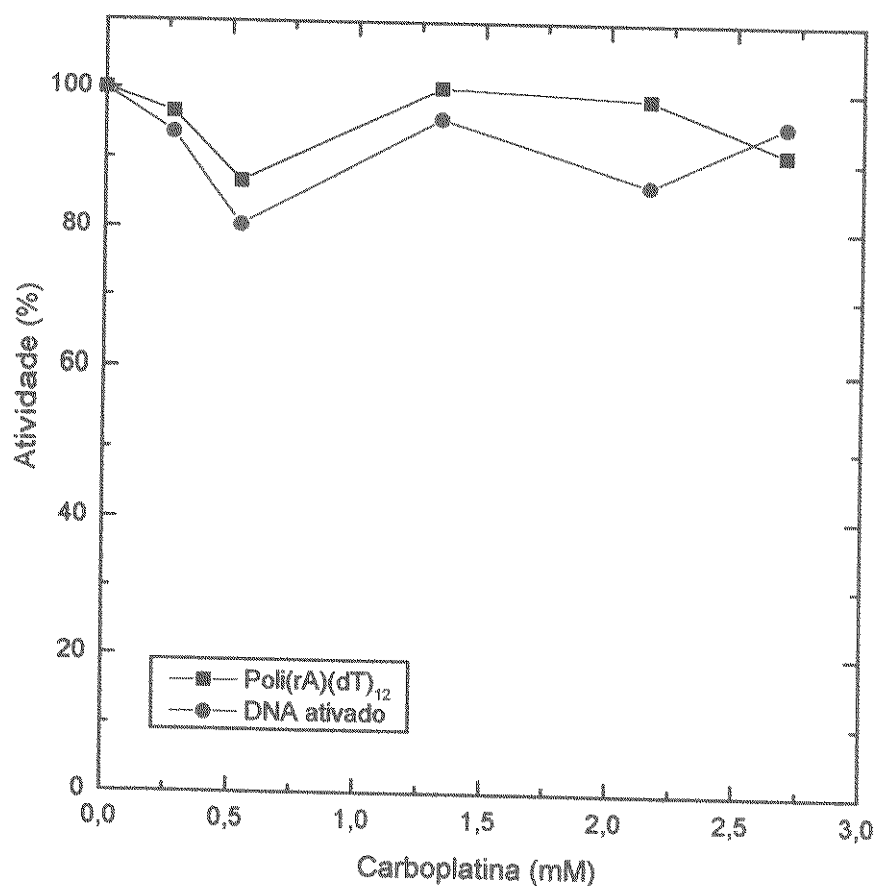


FIGURA 32. Efeito de Carboplatina na Atividade de Transcriptase Reversa de AMV.

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos, utilizando-se poli(rA)(dT)₁₂ 0,010 mg/ml (atividade RDDP) e DNA ativado 0,020 mg/ml (atividade DDDP). A atividade residual foi calculada como uma percentagem daquela obtida na ausência do composto, considerada como 100 %.

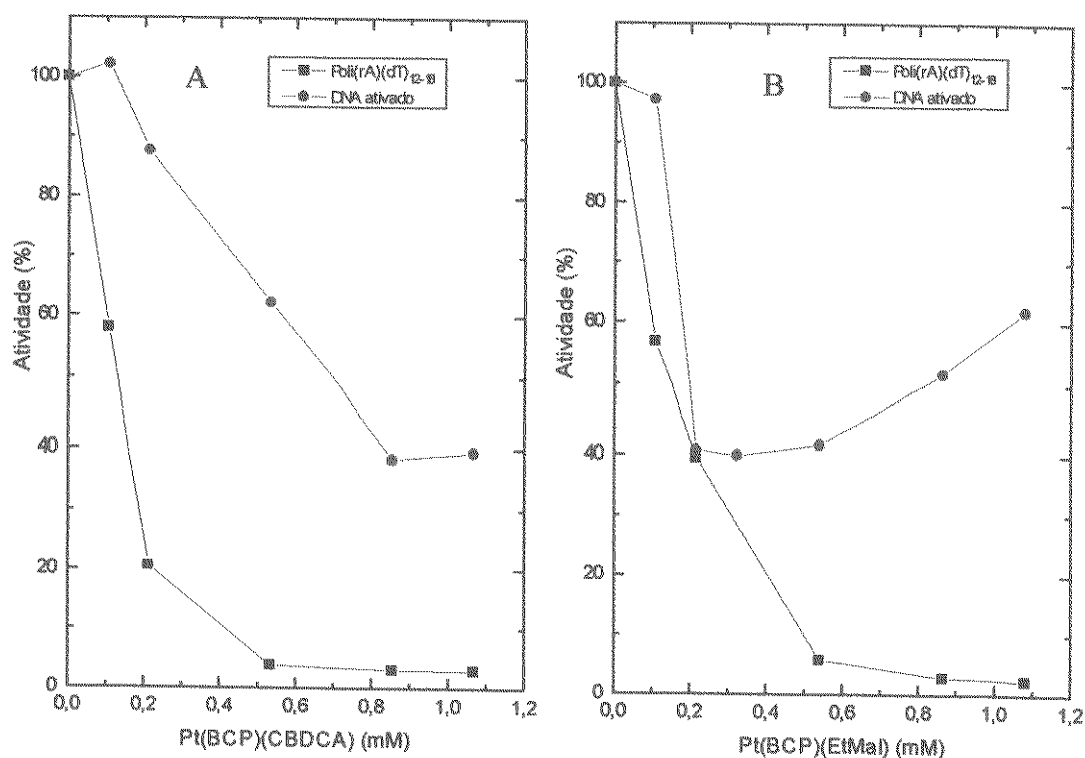


FIGURA 33. Efeito de Pt(BCP)(CBDCA)(A) e Pt(BCP)(EtMal)(B) na Atividade de Transcriptase Reversa de AMV.

Concentrações crescentes dos compostos platínicos foram adicionadas a diferentes meios de reação, utilizando-se poli(rA)(dT)₁₂ 0,010 mg/ml (atividade RDDP) e DNA ativado 0,020 mg/ml (atividade DDDP). As atividades obtidas foram calculadas como uma porcentagem das amostras controle sem os compostos platínicos e são apresentados como uma função das concentrações finais dos compostos. As condições do ensaio são as mesmas descritas em Material e Métodos.

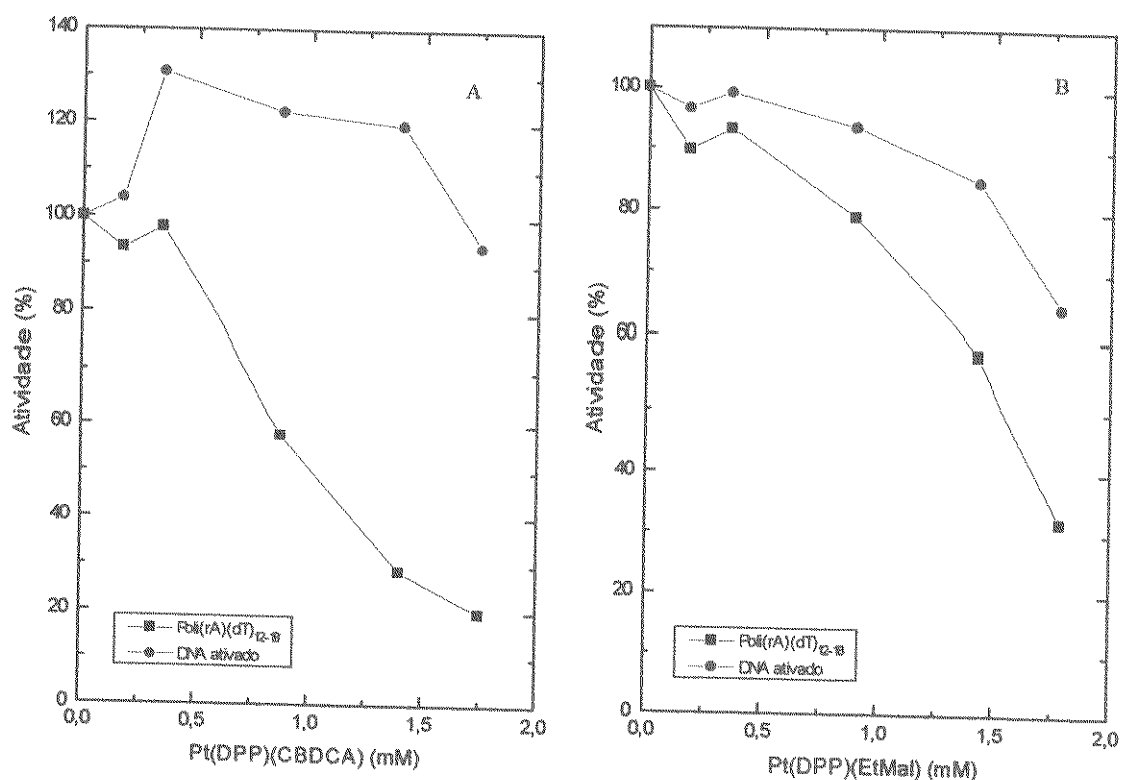


FIGURA 34. Efeito de Pt(DPP)(CBDCA)(A) e Pt(DPP)(EtMal)(B) na Atividade de Transcriptase Reversa de AMV.

As atividades da enzima foram ensaiadas como descrito em Material e Métodos, utilizando-se como matrizes, poli(rA)(dT)₁₂ 0,010 mg/ml (atividade RDDP) e DNA ativado 0,020 mg/ml (atividade DDDP). As atividades enzimáticas foram calculadas como uma percentagem daquela obtida na ausência do composto (100 %).

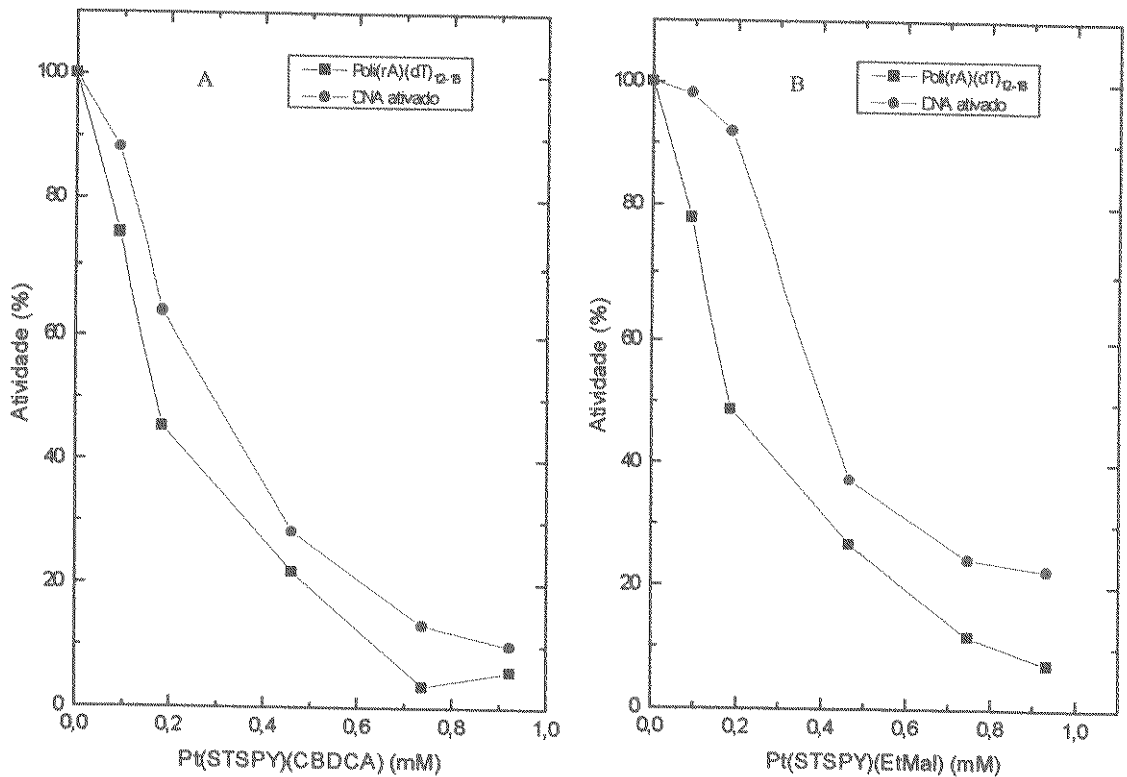


FIGURA 35. Efeito de Pt(STSPY)(CBDCA)(A) e Pt(STSPY)(EtMal)(B) na Atividade de Transcriptase Reversa de AMV.

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos, utilizando-se poli(rA)(dT)₁₂ 0,010 mg/ml (atividade RDDP) e DNA ativado 0,020 mg/ml (atividade DDDP). A atividade residual foi calculada como uma porcentagem daquela obtida na ausência do composto.

outro efeito de ativação da transcriptase reversa de AMV, porém na presença de dimetil sulfoxido (até a concentração de 5%) (JUCÁ & AOYAMA, 1995, Anexo III). Este efeito pode ser atribuído, em parte, à dissociação das sub-unidades alfa-beta da enzima (GRANDGENETT, 1976).

Carboplatina [Pt(NH₃)(CBDCA)] não alterou significativamente a atividade da transcriptase reversa, com uma inibição em torno de 10% e permanecendo praticamente constante nas concentrações utilizadas para as duas atividades (RDDP e DDDP) (Figura 32). Quando as duas moléculas de amônia da carboplatina foram substituídas pelo ligante BCP (Figura 33A e 33B) houve uma forte inibição da atividade RDDP e uma inibição moderada da atividade DDDP. Esta inibição deve ser atribuída, provavelmente, ao ligante BCP dos compostos Pt(BCP)(CBDCA) e Pt(BCP)(EtMal). Estes compostos também discriminam as duas atividades DNA polimerase da transcriptase reversa (RNA-dependente e DNA-dependente). O ligante EtMal diminui, então, a seletividade entre as duas atividades polimerásicas (Figura 33B). O ligante DPP diminuiu a inibição da enzima, principalmente a atividade DDDP (Figura 34A e 34B).

Os compostos Pt(STSPY)(CBDCA) e Pt(STSPY)(EtMal) inibiram significativamente as duas atividades da transcriptase reversa mas não apresentaram sensibilidades diferenciais para as atividades DNA polimerase RNA-dependente e DNA-dependente da enzima (Figura 35A e 35B).

Os compostos das Figuras 33A, 33B, 35A e 35B apresentaram uma maior inibição sobre a transcriptase reversa de AMV. O efeito inibitório observado nas Figuras 35A e 35B pode ser atribuído, provavelmente, à presença do átomo de enxofre nestas moléculas. Grupos S-H podem interagir com grupos mercapto da proteína para formar pontes dissulfeto temporárias (TÖKÉS & ARADI, 1996). Com relação a outros átomos, compostos contendo silício foram efetivos inibidores de transcriptase reversa de HIV, enquanto que compostos contendo boro eram inativos e, somente um composto contendo fósforo apresentou seletiva atividade anti-viral (MOORE et al., 1995).

O efeito do composto platínico Pt(BCP)(CBDCA) sobre a transcriptase reversa foi determinado através do estudo de inibição da atividade catalítica da enzima (Figura 36).

Nós analisamos duas funções da transcriptase reversa: a função polimerase RNA-dependente (RDDP) usando-se a matriz-iniciador sintética poli(rA)(dT)₁₂, em

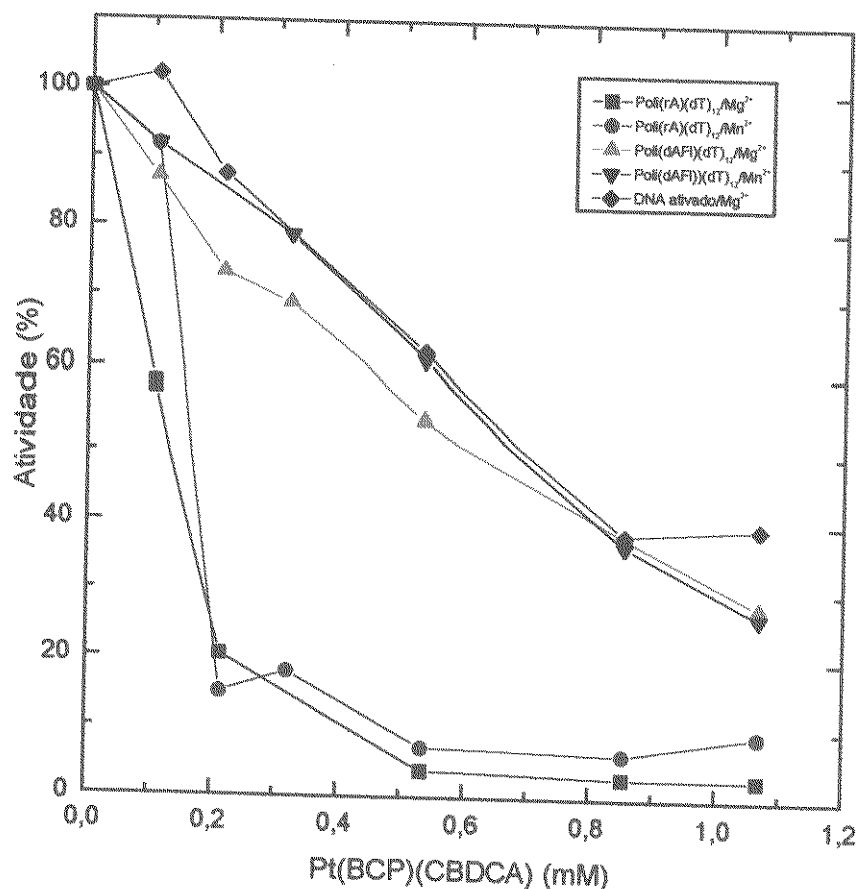


FIGURA 36. Curvas Dose-Resposta da Inibição da Função Catalítica de Transcriptase Reversa de AMV por Pt(BCP)(CBDCA).

As condições experimentais são as mesmas descritas em Material e Métodos, utilizando-se poli(rA)(dT)₁₂ 0,010 mg/ml, poli(dAFI)(dT)₁₂ 0,010 mg/ml, DNA ativado 0,020 mg/ml, Mg²⁺ 6,0 mM e Mn²⁺ 0,2 mM. A atividade residual foi calculada como uma percentagem daquela obtida na ausência do composto.

presença de Mg^{2+} e Mn^{2+} e a função DNA polimerase DNA-dependente (DDDP) (usando-se DNA ativado). Foi também utilizado a matriz-iniciador poli(dAFl)(dT)₁₂ em presença de Mg^{2+} e Mn^{2+} para o estudo do mecanismo de reação enzimática.

Os resultados apresentados na Figura 36 e Tabela XII demonstram que o composto platínico Pt(BCP)(CBDCA) é um potente inibidor da síntese de DNA poli(rA)(dT)₁₂ dirigida de transcriptase reversa de AMV mas, foi 4,5 a 5,5 vezes menos efetivo quando DNA ativado e poli(dAFluor)(dT)₁₂ foram usados como matrizes para a enzima, indicando que a natureza da matriz-iniciador influencia a atividade inibitória do composto platínico. Porém, quando Mg^{2+} foi substituído por Mn^{2+} , na presença das duas matrizes usadas, não houve alterações significativas nos perfis de inibição. Para determinar se as atividades RNA e DNA-dependentes apresentaram sensibilidades diferenciais à inibição por Pt(BCP)(CBDCA), valores de IC₅₀ foram obtidos usando-se diferentes matrizes. Como mostrado na Tabela XII, a atividade polimerásica RNA-dependente foi 4,5 a 5,5 vezes mais sensível à inibição do que a atividade DNA-dependente. O composto platínico usado neste estudo foi, então, capaz de discriminar as duas atividades de DNA polimerase desta enzima. Diferentes sensibilidades de transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 e tipo 2 (HIV-1 e HIV-2) também foram observados por LOYA et al. (1992), utilizando o carotenóide halocintiaxantina como inibidor.

Potentes inibidores da função DDDP associada à transcriptase reversa podem afetar também o metabolismo de células normais, pela inibição de DNA polimerases celulares DNA-dependentes. Portanto, inibidores específicos da atividade RDDP, que são específicos para transcriptases reversas, são vantajosos uma vez que estes podem ser menos tóxicos para células normais.

Estudos cinéticos foram realizados através do aumento da concentração da matriz-iniciador poli(rA)(dT)₁₂ ou dTTP, na ausência e em presença de $0,66 \times 10^{-4}$ e $1,33 \times 10^{-4}$ M de Pt(BCP)(CBDCA). As velocidades iniciais lineares de incorporação de [³H]TMP foram calculadas e os valores das constantes cinéticas foram determinados através dos gráficos de duplo-recíprocos da velocidade *versus* a concentração do substrato (Lineweaver-Burk). O padrão de inibição da atividade DNA polimerase da transcriptase reversa por Pt(BCP)(CBDCA) é não competitiva em relação a matriz-iniciador poli(rA)(dT)₁₂ (Figura 37). Os gráficos internos da inclinação e interseção da Figura 37 foram lineares, indicando uma inibição estritamente não competitiva com poli(rA)(dT)₁₂ como matriz variável. O valor de K_m foi 6,25 µg/ml, independente da concentração do inibidor (Tabela XIII). Estes resultados sugerem que o composto platínico Pt(BCP)(CBDCA) liga-se à transcriptase

Tabela XII. Efeito de Pt(BCP)(CBDCA) na Atividade de Transcriptase Reversa de AMV Utilizando-se Diferentes Matrizes e Cátions Divalentes

Matrizes	IC ₅₀
Poli(rA)(dT) ₁₂ /Mg ²⁺	0,13
Poli(rA)(dT) ₁₂ /Mn ²⁺	0,17
Poli(dAFl)(dT) ₁₂ /Mg ²⁺	0,60
Poli(dAFl)(dT) ₁₂ /Mn ²⁺	0,67
DNA ativado	0,70

A atividade enzimática anti-AMV foi determinada conforme descrito em Material e Métodos. Os valores de IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50% da atividade enzimática) são expressos em mM e foram determinados através das curvas dose-resposta (Figura 36) de inibição das diferentes atividades obtidas com o aumento da concentração do composto platínico.

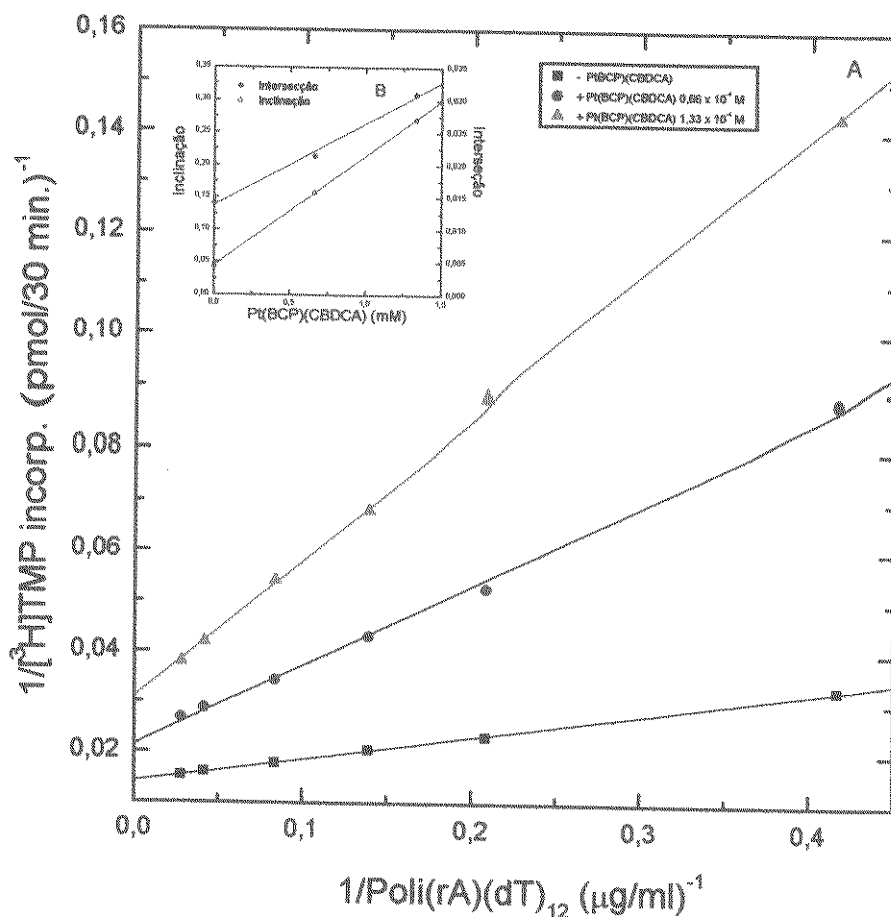


FIGURA 37. Gráfico dos Duplo-Recíprocos de Lineweaver-Burk de Inibição da Transcriptase Reversa de AMV por Pt(BCP)(CBDCA) em Relação a Poli(rA)(dT)₁₂(A).

A atividade foi determinada conforme descrito em Material e Métodos, variando-se a concentração de poli(rA)(dT)₁₂, na ausência e em presença de Pt(BCP)(CBDCA) $0,66 \times 10^{-4} \text{ M}$ e $1,33 \times 10^{-4} \text{ M}$. B: Gráfico da inclinação e interseção das retas contra a concentração do inibidor.

Tabela XIII. Parâmetros Cinéticos da Reação Catalisada por Transcriptase Reversa de AMV na Ausência e em Presença de Pt(BCP)(CBDCA).

Substrato	K_m^a	K_i^a	K_i/K_m
dTTP	14,63	104,00	7,11
Poli(rA)(dT) ₁₂	6,25	111,55	17,85

^a Expresso em μM para dTTP e $\mu\text{g/ml}$ para poli(rA)(dT)₁₂.

Os valores de K_m foram determinados através dos gráficos duplos-recíprocos (Lineweaver-Burk) utilizando-se o programa Origin a partir dos dados das Figuras 11 e 12. Os valores de K_i

foram determinados a partir das fórmulas $K_i = \frac{i}{\frac{K_p}{K_m} - 1}$ para inibição competitiva, onde K_i , i , K_p e K_m são, respectivamente, a constante de inibição, concentração do inibidor, constante de Michaelis na presença do inibidor e constante de Michaelis na ausência do inibidor e

$K_i = \frac{i}{\frac{V}{V_p} - 1}$ para inibição não competitiva, onde K_i , i , V_p e V são, respectivamente, a constante de inibição, concentração do inibidor, velocidade máxima na presença do inibidor e velocidade máxima em ausência do inibidor.

reversa de AMV em sítios diferentes aos sítios de ligação de poli(rA)(dT)₁₂ na síntese de DNA RNA-dependente.

Em uma análise da inibição usando dTTP como substrato variável, Pt(BCP)(CBDCA) apresentou uma inibição competitiva. Através dos gráficos de Lineweaver-Burk foram obtidos os valores de 14,63 e 104,00 μM para K_m e K_i , respectivamente (Figura 38 e Tabela XIII). A linearidade obtida no gráfico da inclinação *versus* a concentração de Pt(BCP)(CBDCA) (Interno, Figura 38) indica uma inibição estritamente competitiva em relação ao substrato dTTP. Isto sugere que o inibidor interage com a enzima da mesma forma que o dTTP. O valor de K_i para Pt(BCP)(CBDCA), obtido com concentrações variáveis de dTTP foi maior que o valor de K_m para o substrato, como indicado pela alta razão $K_i/K_m = 7,11$ (Tabela XIII). Estes resultados sugerem que a enzima tem uma maior afinidade por dTTP do que pelo inibidor, sob as condições empregadas. Cinéticas de inibição semelhantes foram relatadas para HPA-23 na inibição da atividade de transcriptase reversa do vírus da leucemia murina (MLV) (CHERMANN et al., 1975). Cinética de inibição inversa a Pt(BCP)(CBDCA) foi observada com benzofenona 4-maleimida sobre a atividade DNA-polimerase da transcriptase reversa de MLV, onde o inibidor apresentou uma inibição competitiva com relação à matriz-iniciador e não competitiva com relação ao dTTP (BASU et al., 1993).

Portanto, a inibição parece ser complexa, onde alguns inibidores competem com a matriz-iniciador e outros com o nucleotídeo trifosfato. A escolha do substrato é, então, importante desde que este pode influenciar o grau de inibição a uma concentração fixa do inibidor. É curioso observar efeitos semelhantes de substrato sobre a inibição com compostos que agem por mecanismos completamente diferentes. As drogas BI-RG-587 e TIBO inibem seletivamente a transcriptase reversa de HIV-1 em um sítio distinto do sítio de ligação do substrato na enzima (WU et al., 1991). Outras DNA polimerases, incluindo as de HIV-2, não são inibidas (MERLUZZI et al., 1990; DEBYSER et al., 1991).

Resultados a respeito da reversibilidade da inibição da transcriptase reversa de AMV pelo composto platínico foram obtidos através da velocidade da reação poli(rA)(dT)₁₂-dirigida como uma função da concentração da enzima (Figura 39). A velocidade de síntese de DNA foi medida a várias diluições da enzima em presença de concentrações saturantes da matriz-iniciador poli(rA)(dT)₁₂ (120 $\mu\text{g/ml}$) e do substrato marcado [³H]dTTP (10 μM). A velocidade da reação controle e da reação em presença de Pt(BCP)(CBDCA) $1,33 \times 10^{-4}$ M foi reduzida cerca de 50% em todas as

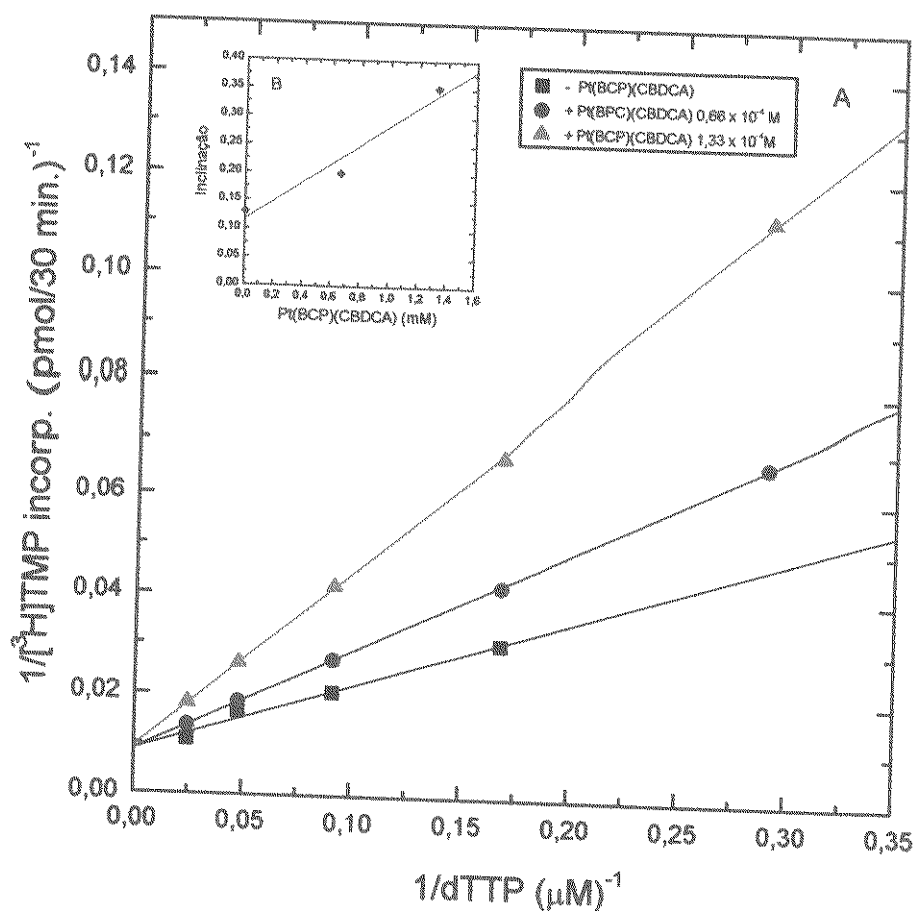


FIGURA 38. Gráfico dos Duplo-Recíprocos de Lineweaver-Burk de Inibição da Transcriptase Reversa de AMV por Pt(BCP)(CBDCA) em Relação a dTTP(A).

A atividade foi determinada conforme descrito em Material e Métodos, variando-se a concentração de dTTP, na ausência e em presença de Pt(BCP)(CBDCA) $0,66 \times 10^{-4} \text{ M}$ e $1,33 \times 10^{-4} \text{ M}$. B: Gráfico da inclinação das retas contra a concentração do inibidor.

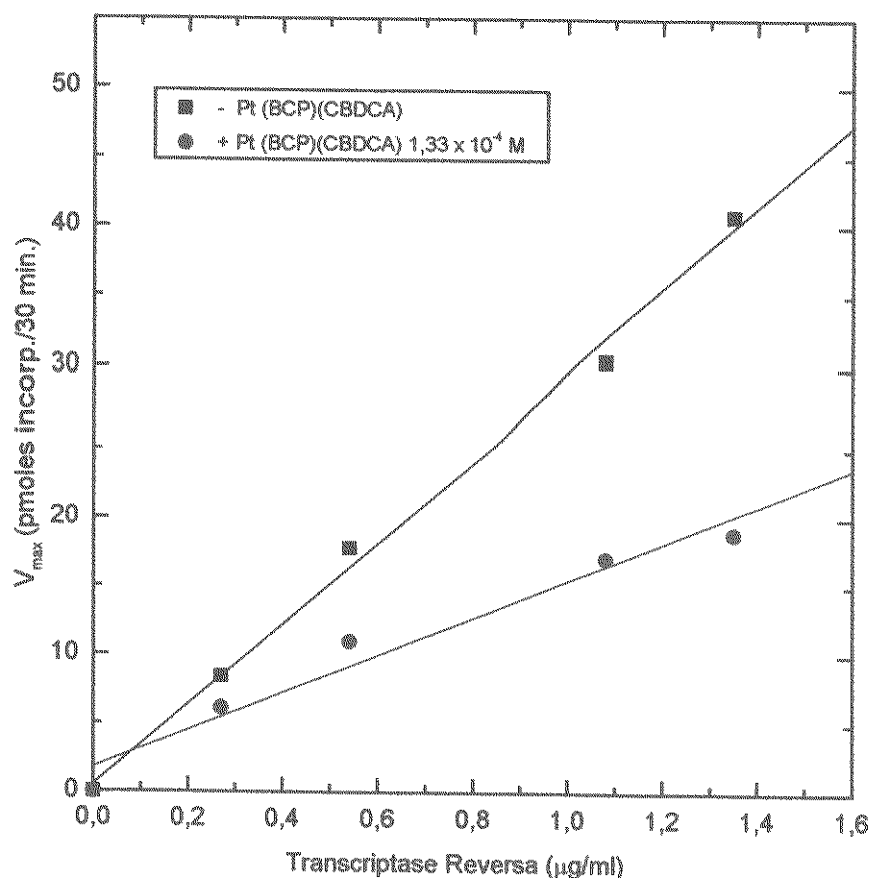


FIGURA 39. Efeito de Pt(BCP)(CBDCA) na Velocidade da Reação Poli(rA)(dT)-dirigida da Transcriptase Reversa de AMV como uma Função da Concentração Enzimática.

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos e a velocidade de incorporação de dTTP radioativo em ausência e na presença de Pt(BCP)(CBDCA) $1,33 \times 10^{-4}$ M foi medida como uma função de crescentes concentrações da enzima. As reações foram feitas em concentrações de saturação da matriz-iniciador poli(rA)(dT)₁₂ (12,0 $\mu\text{g/ml}$) e do substrato radioativo dTTP (10,0 μM) por 30 min. a 37°C.

concentrações da enzima testadas. Esta redução foi, portanto, proporcional ao decréscimo da concentração enzimática. Nenhum aumento da atividade inibitória do composto platínico foi observado com o decréscimo da concentração proteica. Estes resultados demonstram que a inibição da transcriptase reversa por Pt(BCP)(CBDCA) é reversível.

Deve ser enfatizado, portanto, que este composto platínico é um inibidor mais efetivo da atividade RDDP do que da função DDDP da transcriptase reversa de AMV. Isto indica que o mecanismo de catálise da polimerização DNA-dependente não é idêntica à polimerização RNA-dependente. É possível que os domínios catalíticos envolvidos no desempenho de uma atividade não estejam completamente sobrepostos aqueles envolvidos na outra função de DNA polimerase. Estes resultados também oferecem novas perspectivas de desenvolvimento de compostos anti-TR, potentes e altamente específicos, uma vez que a atividade DNA polimerase RNA-dependente é a única atividade de transcriptases reversas que não é expressa por DNA polimerases presentes em células normais de mamíferos.

3.6 DIFICULDADES ENCONTRADAS

Fazendo uma análise de nosso trabalho sobre inibidores de TR de AMV, tivemos algumas dificuldades:

a) Baixa solubilidade de alguns compostos testados. Em parte este problema teve um aspecto positivo, que foi o estudo de DMSO na atividade enzimática.

Entretanto vários compostos deixaram de ser testados, pois as suas solubilidades em solventes como DMSO demandavam controles adicionais nos ensaios, implicando no uso de maior quantidade de TR, um dos reagentes caros em nosso trabalho.

b) Falta de estudos com a matriz-iniciador poli(rC)(dG)₁₂. Este composto é uma boa matriz para a TR. A dificuldade residia na pouca estabilidade e no preço do radioisótopo necessário nestes estudos, o [³H]dGTP.

c) Estudos de interação TR-droga. O preço da enzima foi um fator limitante e decisivo para que deixássemos de estudar sua interação com inibidores adequados, utilizando-se técnicas como espectrofotometria, fluorescência, diálise de equilíbrio, filtração em gel, entre outras que demandavam uma quantidade apreciável de TR.

4. CONCLUSÕES

Novobiocina inibiu 50% da atividade da transcriptase reversa (IC_{50}) de vírus de mieloblastose de aves (TR de AMV) na concentração de 0,5 mM, independentemente da matriz utilizada: DNA ativado, poli(rA)(dT)₁₂ e poli(rC)(dG)₁₂. Este antibiótico não inibe especificamente a TR, pois inibe também as DNA polimerases celulares α e β e é um ativador da DNA polimerase δ a baixas concentrações e um inibidor a concentrações mais elevadas. A inibição é do tipo não competitivo tanto em relação a dTTP ($K_m = 1,4 \times 10^{-5}$ M), quanto a DNA ativado ($K_m = 3,7 \mu\text{g/ml}$).

Brometo de etídeo e tetrametilbrometo de etídeo são inibidores mais efetivos em presença da matriz-iniciador poli(rA)(dT)₁₂. Brometo de etídeo é um inibidor não competitivo tanto em relação a dTTP ($K_m = 1,0 \mu\text{M}$, $K_i = 5,0 \mu\text{M}$) quanto a poli(rA)(dT)₁₂ ($K_m = 2,2 \mu\text{g/ml}$, $K_i = 2,8 \mu\text{M}$) na reação poli(rA)(dT)₁₂-dependente. Este tipo de inibição se mantém em relação a dTTP na reação poli(dAFI)(dT)₁₂/Mg²⁺-dependente ($K_m = 100,0 \mu\text{M}$, $K_i = 10,0 \mu\text{M}$) e na reação poli(dAFI)(dT)₁₂/Mn²⁺-dependente ($K_m = 16,0 \mu\text{M}$, $K_i = 5,7 \mu\text{M}$). Tetrametil brometo de etídeo também inibiu a enzima não competitivamente utilizando-se poli(AM)(dT)₁₂ como matriz em relação a dTTP em presença de Mn²⁺ ($K_m = 0,33 \mu\text{M}$, $K_i = 10,0 \mu\text{M}$) e Mg²⁺.

A inibição pelos alcalóides metoximetilvoacalotina e erisodina tiveram como matriz preferencial poli(rC)(dG)₁₂ e poli(rA)(dT)₁₂, respectivamente. O tipo de inibição é não competitiva em relação a poli(rA)(dT)₁₂ e DNA ativado para metoximetilvoacalotina e competitiva para erisodina.

O alcalóide laurifolina inibiu efetivamente a TR de AMV. Os perfis de inibição não foram significativamente alterados quando a matriz-iniciador poli(rA)(dT)₁₂ foi substituída por poli(dAFI)(dT)₁₂, como também quando o cátion divalente, Mg²⁺ foi substituído por Mn²⁺. Laurifolina inibe a atividade enzimática da TR de AMV, não competitivamente em relação a poli(rA)(dT)₁₂ e dTTP. Os valores de K_m e K_i foram 6,28 μM e 0,66 μM para dTTP e 6,25 $\mu\text{g/ml}$ e 0,45 $\mu\text{g/ml}$ para poli(rA)(dT)₁₂, respectivamente. A inibição da TR de AMV por laurifolina é reversível.

DMSO, solvente frequentemente usado para solubilizar drogas para testes de inibição de TR, ativava a reação catalisada pela enzima de AMV, com um máximo na concentração de 4%. Este solvente não protege a enzima da inativação.

Dos oito compostos platínicos estudados, Pt(BCP)(CBDCA) apresentou uma inibição mais efetiva sobre a TR de AMV. Pt(BCP)(CBDCA) é capaz de discriminar

as duas atividades da transcriptase reversa com uma inibição 5,5 vezes maior para a atividade DNA polimerase RNA-dependente do que para a atividade DNA polimerase DNA-dependente. Transcriptase reversa de AMV foi inibida mais fortemente com a matriz poli(rA)(dT)₁₂ do que com poli(dAFl)(dT)₁₂ ou DNA ativado. Os cations divalentes, Mg²⁺ e Mn²⁺, não alteraram os perfis de inibição. Pt(BCP)(CBDCA) inibe a atividade da TR de AMV não competitivamente em relação a poli(rA)(dT)₁₂ e competitivamente em relação a dTTP. Os valores de K_m e K_i foram 14,6 µM e 104,0 µM para dTTP e 6,2 µg/ml e 111,5 µg/ml para poli(rA)(dT)₁₂, respectivamente. A inibição da TR de AMV por Pt(BCP)(CBDCA) é reversível.

5. PERSPECTIVAS

Transcriptase reversa de vírus de mieloblastose de aves foi utilizada neste trabalho como modelo de DNA polimerase retroviral. Este modelo animal tem sido usado para avaliação da eficiência de potenciais agentes anti-vírus da imunodeficiência humana (anti-HIV). Uma boa parte de nossos trabalhos já havia sido realizada com a TR de AMV, quando a enzima de HIV começou a ser comercializada. A seleção, caracterização bioquímica e efeito de inibidores utilizando-se transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana será uma das metas em nossos futuros projetos. Este estudo é de extrema importância como um dos meios para bloquear a replicação viral no combate à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS).

O desenvolvimento de estratégias terapêuticas não tóxicas com um agente anti-retroviral ou uma combinação de agentes anti-retrovirais prolonga a sobrevivência de seres com infecções retrovirais.

O uso de inibidores de transcriptases reversas virais é uma estratégia especialmente interessante, desde que suas especificidades para a replicação retroviral são únicas quando comparadas com análogos proteicos encontrados na célula humana. Portanto, o conhecimento das diferenças entre enzimas virais e celulares levará a projetos de drogas que são específicas para o vírus e menos tóxicas para a célula hospedeira.

Como já foi mencionado, a transcriptase reversa possui três atividades enzimáticas distintas em uma única molécula: uma DNA polimerase RNA-dependente, uma DNA polimerase DNA-dependente e uma RNase H. Assim, o estudo de inibidores de cada uma destas funções será de fundamental importância no bloqueio da replicação.

Em contraste com o extenso número de pesquisas sobre a inibição das atividades DNA polimerase associada com várias transcriptases reversas, drogas antivirais que têm como alvo a atividade ribonuclease H (RNase H) da transcriptase reversa são relativamente poucas, apesar de ser esta atividade essencial para a infecção viral. A falta de (i) informações estruturais detalhadas, (ii) substratos definidos e (iii) enzimas recombinantes purificadas para análise *in vitro* tem dificultado estudos anteriores. Portanto, o estudo de inibidores da atividade RNase H da transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana oferece uma outra estratégia na intervenção terapêutica da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS).

A determinação dos parâmetros cinéticos, tipo de inibição, especificidade e eficiência de matrizes-iniciadores são importantes nos estudos do mecanismo de reação enzimática.

Progressos futuros na área de terapia anti-retroviral irá depender da efetiva pesquisa básica adequada a princípios de ensaios clínicos controlados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLUWALIA, G.; CONNEY, D.A.; MITSUYA, H.; FRIDLAND, A.; FLORA, K.P.; HAO, Z.; DALAL, M.; BRODER, S. & JOHNS, D.G. (1987) **Initial studies on the cellular pharmacology of 2-3-dideoxyinosine, an inhibitor of HIV infectivity.** *Biochem. Pharmacol.*, 36: 3797-3800.
- ALTHAUS, I.W.; FRANKS, K.M.; LANGLEY, K.B.; KEZDY, F.J.; PETERSON, T.; BUXSER, S.E.; DECKER, D.E.; DOLAK, L.A.; ULRICH, R.G. & REUSSER, F. (1996) **The amphiphilic properties novenamides determine their activity as inhibitors of HIV-1 RNase H.** *Experientia*, 52:329-335.
- AOYAMA, H.; SARIH-COTTIN, L.; TARRAGO-LITVAK, L.; KAKIUCHI, N.; LITVAK, S. & GUSCHLBAUER, W. (1985) **2'-Fluoro-2'-deoxy-polynucleotides as templates and inhibitors for RNA- and DNA-dependent DNA polymerases.** *Biochim. Biophys. Acta*, 824: 225-22.
- AOYAMA, H. (1985a) **Efeito de Mn^{2+} nas atividades de transcriptase reversa com derivados de ácido poliadenílico como matrizes.** *Química Nova*, 8: 285-287.
- AOYAMA, H. (1985b) **Template requirements for AMV reverse transcriptase.** *Arq. Biol. Tecnol.*, 28: 413-420.
- AOYAMA, H. (1988) **O reverso da transcrição.** *Ci. e Cult.*, 40: 5-14.
- APOSHIAN, N.V. & KORNBERG, A. (1962) **Enzymatic synthesis of DNA. IX. The polymerase formed after T_2 bacteriophage infection of *E. coli*: a new enzyme.** *J. Biol. Chem.*, 237: 519-524.
- ARAYA, A.; HEVIA, E. & LITVAK, S. (1980) **Study of the interaction between AMV reverse transcriptase and primer tRNA. Affinity labeling and interaction of the enzyme by periodate treated tRNA^{trp}.** *Nucleic Acids Res.*, 8: 4009-4020.
- ARTS, E.J. & WAINBERG, M.A. (1996) **Mechanisms of nucleoside analog antiviral activity and resistance during human immunodeficiency virus reverse transcription.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40: 527-540.
- AVERY, R.J. & LEVY, J.A. (1979) **The effect of ethidium bromide on C type virus production and induction.** *Virology*, 95: 277-284.
- BABA, M.; TANAKA, H.; DE CLERCQ, E.; PAUWELS, R.; BALZARINI, J.; SCHOLS, D.; NAKASHIMA, H.; PERNO, C.-F.; WALKER, R.T. & MIYASAKA, T. (1989) **Highly specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by a novel 6-substituted acyclouridine derivative.** *Biochem. Biophys Res. Commun.*, 165: 1375-1381.
- BABA, M.; DE CLERCQ, E.; TANAKA, H.; UBASAWA, M.; TAKASHIMA, H.; SEKIYA, K.; NITTA, I.; UMEZU, K.; NAKASHIMA, H.; MORI, S.; SHIGETA, S.; WALKER, R.T. & MIYASAKA, T. (1991a) **Potent and selective inhibition of**

- human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by 5-ethyl-6phenylthiouracil derivatives through its interaction with the HIV-1 reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 2356-2360.
- BABA, M.; DE CLERCQ, E.; TANAKA, H.; UBASAWA, M.; TAKASHIMA, H.; SEKIYA, K.; NITTA, I.; UMEZU, K.; WALKER, R.T.; MORI, S.; ITO, M.; SHIGETA, S. & MIYASAKA, T. (1991b) **Highly potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by a novel series of 6substituted acycloauridine derivatives.** *Mol. Pharmacol.*, 39: 805-810.
- BAKHANASHVILI, M., & HIZI, A. (1994) **Interaction of reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 with DNA.** *Biochemistry*, 33: 12222-12228.
- BALTIMORE, A. (1970) **Viral RNA-dependent DNA polymerase.** *Nature*, 226: 1209-1211.
- BALTIMORE, D. & SMOLER, D. (1972) **Association of a endoribonuclease with the avian myeloblastosis virus DNA polymerase.** *J. Biol. Chem.*, 247: 7282-7287.
- BALZARINI, J.; KANG, G.J.; DALAL, M.; HERDEWIJN, P.; DE CLERCQ, E.; BRODER, S. & JOHNS, D.G. (1987) **The anti-HTLV-III(anti-HIV) and cytotoxic of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxyribonucleosides: a comparison with their parental 2',3'-dideoxyribonucleosides.** *Mol. Pharmacol.*, 32: 162-167.
- BALZARINI, J.; HOLY, A.; JINDRICH, J.; DVORAKOVA, H.; HAO, Z.; SNOECK, R.; HERDEWIJN, P.; JOHNS, D.G. & DE CLERCQ, E. (1991) **9-[2(RS)-3-Fluoro-2-phosphonylmethoxypropyl] derivatives of purines: a class of highly selective antiretroviral agents "in vitro" and "in vivo".** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 4961-4965.
- BALZARINI, J.; PÉREZ-PÉREZ, M.-J.; SAN-FELIX, A.; VELÁZQUEZ, S.; CAMARASA, M.-J. & DE CLERCQ, E. (1992a) **[2',5'-Bis-O-(tert-butylidimethylsilyl)]-3'- spiro-5"- (4"- amino-1",2"- oxathiole-2",2"- dioxide) (TSAO) derivatives of purine and pyrimidine nucleosides as potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36: 1073-1080.
- BALZARINI, J.; VELÁZQUEZ, S.; SAN-FELIX, A.; KARLSSON, A.; PEREZ-PEREZ, M.-J.; CAMARASA, M.-J. & DE CLERCQ, E. (1992b) **Human immunodeficiency virus type 1-specific [2',5'-bis-O-(tert-butylidimethylsilyl)-β-D-ribofuranosyl]-3'- spiro-5"- (4"- amino-1",2"-oxathiole-2",2"-dioxide)-purine analogues show a resistance spectrum that is different from that of the human immunodeficiency virus type 1-specific non-nucleoside analogues.** *Mol. Pharmacol.*, 43: 109-114.
- BALZARINI, J.; KARLSSON, A.; PEREZ-PEREZ, M.-L.; VRANG, L. WALBERS, J.; OBERG, B.; VANDAMME, A.-M.; CAMARASA, M.-J. & DE CLERCQ, E. (1993) **HIV-1 specific reverse transcriptase inhibitors show differential activity**

- against HIV-1 mutant strains containing different amino acid substitutions in the reverse transcriptase. *Virology*, 192: 246-253.
- BARNARD, J.; BORKOW, G. & PARNIAK, M.A. (1997) The thiocarboxanilide nonnucleoside UC781 is a tight-binding inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry*, 36: 7786-7792.
- BASU, S.; BASU, A. & MODAK, M.J. (1993) Sulphydryl groups in the template-primer-binding domain of murine leukemia virus reverse transcriptase. Identification and functional analysis of cysteine-90. *Biochem. J.*, 296: 577-583.
- BECHTOLD, C.M.; PATICK, A.K.; ALAM, M. GREYTOK, J.; TINO, J.A.; CHEN, P.; GORDON, E.; AHMAD, S.; BARRISH, J.C.; ZAHLER, R.; LIN, P.-F.; & COLONNO, R.J. (1995) Antiviral properties of aminodiol inhibitors against human immunodeficiency virus and protease. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39: 374-379.
- BELLAROSA, D.; ANTONELLI, G.; BAMBACIONI, FF.; GIANNOTTI, D.; VITI, G.; NANNICINI, R.; GIACHETTI, A.; DIANZANI, F.; WITVROUW, M.; PAWELS, R.; DESMYTER, J. & DE CLERCQ, E. (1996) New arylpyridodiazepine and -thiodiazepine derivatives are potent and highly selective HIV-1 inhibitors targeted at the reverse transcriptase. *Antiviral Res.*, 30: 109-124.
- BEUTLER, J. A.; CARDELLINA, J.H., II; McMAHON, J.B.; BOYD, M.R. & CRAGG, G.M. (1992) Anti-HIV and cytotoxic alkaloids from *Buchenavia capitata*. *J. Nat. Prod.*, 55: 207-213.
- BILELLO, J.A.; MACAULEY, C.; FREDRICKSON, T.N.; BELL, M.M.; MCKISSICK, C.; SHAPERO, S.G.; PERSONETTE, R. & EISEMAN, J.L. (1990) in AIDS: Anti-HIV agents, therapies, and vaccines. Georgiev, Vassil St. & McGowan, J.J., ed., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 616: 238-251.
- BISHOP, J.M. (1985) Viral oncogenes. *Cell*, 42: 23-38.
- BOLTON, P.H. & KEARNS, D.R. (1978) Hydrogen bonding of the 2' OH in RNA. *Biochim. Biophys. Acta*, 517: 328-337.
- BOYD, M.R. (1988) Strategies for the identification of new agents for the treatment of AIDS: A national program to facilitate the discovery and preclinical development of new drug candidates for clinical evaluation. In **AIDS Etiology, Diagnosis, Treatment and Prevention**. DeVita, V.T., Jr.; Hellman, S.; Rosenberg, S.A., Eds.; Lippincott: Philadelphia, pp 305-319.
- BRENNAN, T. M.; TAYLOR, D.L.; BRIDGES, C.G.; LEYDA, J.P. & TYMS, A.S. (1995) The inhibition of human immunodeficiency virus type 1 in vitro by a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor MKC-442, alone and in combination with other anti-HIV compounds. *Antivir. Res.*, 26: 173-187.

- BUDD, M.E. & CAMPBELL, J.L. (1993) DNA polymerases δ and ϵ are required for chromosomal replication in *Sacharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 13: 496-505.
- BURRES, N.S.; SAZESH, S.; GUNAWARDANA, G.P.; CLEMENT, J.J. (1989) Antitumor activity and nucleic acid binding properties of dercitin, a new acridine alkaloid isolated from a marine *Dercitus* species sponge. *Cancer Res.*, 49: 5267-5274.
- CALABRESI, P. & PARKS, JR., R.E. (1975) in *The pharmacological basis of therapeutics*, eds. Goodman, L.S. & Gilman, A., 5th edn. MacMillan, New York, p. 1284.
- CHAN, E.W.; DALE, P.J.; GRECO, I.L.; ROSE, J.G. & O'CONNOR, T.E. (1980) Effects of polyethylene glycol on reverse transcriptase and other polymerase activities. *Biochim. Biophys. Acta*, 606: 353-361.
- CHENG, Y.-C.; DUTCHMAN, G.E.; BASTOW, M.K.; SARNGADHARAN, M.G. & TING, R.Y.C. (1987) Human immunodeficiency virus reverse transcriptase: general properties and its interaction with nucleoside triphosphate analogs. *J. Biol. Chem.*, 262: 2187-2189.
- CHERMANN, J.C.; SINOUSI, F.C. & JASMIN, C. (1975) Inhibition of RNA-dependent DNA polymerase of murine oncornaviruses by ammonium-5-tungsto-2-antimoniate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 65: 1229-1236.
- CONDRA, J.H.; SCHLEIF, W.A.; BLAHY, O.M.; GABRYELSKI, L.J.; GRAHAM, D.J.; QUINTERO, J.C.; RHODES, A.; ROBBINS, H.L.; ROTH, E.; SHIVAPRAKASH, M.; TITUS, D.; YANG, T.; TEPLER, H.; SQUIRES, K.E.; DEUTSCH, P.J. & EMINI, E.A. (1995) In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. *Nature*, 374: 569-571.
- CONNOLLY, K.J. & HAMMER, S.M. (1992) Antiretroviral therapy: Reverse transcriptase inhibition. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36: 245-254.
- DARLIX, J.-L.; LAPADAT-TAPOLSKY, M.; DE ROCQUIGNY, H. & ROQUES, B.P. (1995) First glimpses at structure-function relationships of the nucleocapsid protein of retrovirus. *J. Mol. Biol.*, 254: 523-537.
- DE CLERCQ, E. (1991) Broad-spectrum anti-DNA virus and anti-retrovirus activity of phosphonylmethoxyalkylpurines and -pyrimidines. *Biochem. Pharmacol.*, 42: 963-972.
- DE CLERCQ, E. (1992) HIV inhibitors targeted at the reverse transcriptase. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 8: 119-134.
- DE CLERCQ, E. (1994) HIV resistance to reverse transcriptase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.*, 47: 155-169.
- DEBYSER, Z.; PAUWELS, R.; ANDRIES, K.; DESMYTER, J.; KUKLA, M.; JANSSEN, P.A. & DE CLERCQ, E. (1991) An antiviral target on reverse

- transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 revealed by tetrahydroimidazo-[4,5*i*]-[1,4]benzodiazepin-2(1*H*)-one and thione derivatives. *Proc Natl. Acad. Sci USA*, 88: 1451-1455.
- DEBYSER, Z.; PAUWELS, R.; ANDRIES, K.; DESMYTER, J.; ENGELBORGH, Y.; JANSSEN, P.A.J. & DE CLERCQ, E. (1992a) Allosteric inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by tetrahydroimidazo[4,5,1-*jk*][1,5]benzodiazepin-2(1*H*)-one and -thione compounds. *Mol. Pharmacol.*, 41: 203-208.
- DEBYSER, Z.; PAUWELS, R.; BABA, M.; DESMYTER, J. & DE CLERCQ, E. (1992b) Common features in the interaction of tetrahydroimidazo[4,5,1-*jk*][1,4]benzodiazepin-2(1*H*)-one and -thione and 1-[2-hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymine derivatives with the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Mol. Pharmacol.*, 41: 963-968.
- DEBYSER, Z.; DE VREESE, K.; KNOPS-GERRITS, P.P.; BAEKELANDT, V.; BHIKHABHAI, R.; STRANDBERG, B.; PAUWELS, R.; ANNÉ, J.; DESMYTER, J. & DE CLERCQ, E. (1993) Kinetics of different human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase resistant to human immunodeficiency virus type 1-specific reverse transcriptase inhibitors. *Mol. Pharmacol.*, 43: 521-526.
- DeCONTI, R.C. & CREASEY, W.A. (1975) in *The Catharanthus alkaloids*, eds. Taylor, W.I. & Franworth, N.R., Marcel Dekker, New York, p. 237.
- DEMINIE, C.A.; BECHTOLD, C.M.; STOCK, D.; ALAM, M.; DJANG, F.; BALCH, A.H.; CHOU, T.-C.; PRICHARD, M.; COLONNO, R.J. & LIN, P.-F. (1996) Evaluation of reverse transcriptase and protease inhibitors in two-drug combinations against human immunodeficiency virus replication. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40: 1346-1351.
- DORMONT, D.; SPIRE, B.; BARRE-SONOUSSI, F.; MONTAGNIER, L. & CHERMANN, J.C. (1985) Inhibition of RNA-dependent DNA polymerase of AIDS and SAIDS retrovirus by HPA-23 (ammonium-21-tungsto-9-antimoniate) *Ann. Inst. Pasteur/Virol.*, 136: 75-83.
- DROBNÍK, J. (1983) Antitumor activity of platinum complexes. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 10: 145-149.
- FARAS, A.J. & DIBBLE, N.A. (1975) RNA-directed DNA synthesis by the DNA polymerase of Rous sarcoma virus: structural and functional identification of 4 S RA primer in infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 859-863.
- FERREIRA, A.D.Q. (1994) Complexos α -diimínicos de platina (II). Tese de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp.
- FISCHL, M.A.; STANLEY, K.; COLLIER, A.C.; ARDUINO, J.M.; STEIN, D.S.; FEINBERG, J.E.; ALLAN, J.D.; GOLDSMITH, J.C.; POWDERLY, W.G. & THE NACT GROUP (1995) Combination and monotherapy with zidovudine and zalcitabine in patients with advanced HIV disease. *Ann. Intern Med.*, 122: 24-32.

- FRANK, K.B.; NOLL, G.J.; CONNELL, E.V. & SIM, I.S. (1991) **Kinetic interaction of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase with the antiviral tetrahydroimidazo [4,5,1-jk] [1,4- benzodiazepine-2 (1H)- thione compound, R82150.** *J. Biol. Chem.*, 266; 14232-14236.
- FRIDLENDER, B. & WEISSBACH, A. (1971) **DNA polymerases of tumor virus: specific effect of ethidium bromide on the use of different synthetic templates.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 68: 3116- 3119.
- FRY, M. (1981) **Enzymes of nucleic acid synthesis and modification.** CRC Press, Boca Raton, Florida, vol. I, pp. 39-92.
- FUJIWARA, M.; IJICHI, K.; TOKUHISA, K.; KATSUURA, K.; SHIGETA, S.; KONNO, K.; WANG, G.-Y.-S.; UEMURA, D.; YOKOTA, T. & BABA, M. (1996) **Mechanism of selective inhibition of human immunodeficiency virus by ingenol triacetate.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40: 271-273.
- FURMAN, P.A.; FYFE, J.A.; ST. CALIR, M.H.; WEINHOLD, K.; RIDEOUT, J.L.; FREEMAN, G.A.; NUSINOFF-LEHRMAN, S.; BOLOGNESI, D.P.; BRODER, S.; MITSUYA, H. & BARRY, D.W. (1986) **Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 8333-8337.
- GALE, E.F.; CUNLIFFE, E.; REYNOLDS, P.E.; RICHMOND, M.H. & WAREING, M.J. (1972) **The molecular basis of antibiotic action.** Wiley, London.
- GEORGIEV, V. ST. & MCGOWAN, J.J. (1990) in **AIDS: Anti-HIV agents, therapies, and vaccines.** Ann. New York Acad. Sci., 161: 1-10.
- GERARD, G.F. (1983) **Enzymes of nucleic acid synthesis and modification** (Jacob, S.T., ed.) CRC Press, Boca Raton, Florida, vol. I, 1-38.
- GETMAN, D.P.; DeCRESCENZO, G.A.; HEINTZ, R.M.; REED, K.L.; TALLEY, J.J.; BRYANT, M.L.; CLARE, M.; HOUSEMAN, K.A.; MARR, J.J.; MUELLER, R.A.; VAZQUEZ, M.L.; SHIEH, H.-S.; STALLINGS, W.C. & STEGEMAN, R.A. (1993) **Discovery of a novel class of potent HIV-1 protease inhibitors containing the (R)-hydroxyethyl-urea isostere.** *J. Med. Chem.*, 36: 288-291.
- GOFF, S.P. (1990) **Retroviral reverse transcriptase, synthesis, structure and function.** *J. Acquired Immune Defic. Syndr.*, 3: 817-831.
- GOLDMAN, M.E.; NUNBERG, J.H.; O'BRIEN, J.A.; QUINTERO, J.C.; SCHLEIF, W.A.; FREUND, K.F.; GAUL, S.L.; SAARI, W.S.; WAI, J.S.; HOFFMAN, J.M.; ANDERSON, P.S.; HUPE, D.J.; EMINI, E.A. & STERN, A.M. (1991) **Pyridinone derivatives: specific human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitors with antiviral activity.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 6863-6867.

- GOODMAN, N.C. & SPIEGELMAN, S. (1971) **Distinguishing reverse transcriptase of an RNA tumor virus from other known DNA polymerases.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**: 2203-2206.
- GOPALAKRISHNAN, V. & BENKOVIC, S. (1994) **Effect of a thiobenzimidazolone derivative on DNA strand transfer catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase.** *J. Biol. Chem.*, **269**: 4110-4115.
- GRANDGENETT, D.P. (1976) **Dissociation of alpha beta DNA polymerase of avian myeloblastosis virus by dimethyl sulfoxide.** *J. Virology*, **17**: 950-961.
- GUNTAKA, R.V.; MAHY, B.W.; BISHOP, J.M. & VARMUS, H.E. (1975) **Ethidium bromide inhibits appearance of closed circular viral DNA and integration of virus-specific DNA in duck cells infected by avian sarcoma virus.** *Nature*, **253**: 507-511.
- HAHN, F.E. & CIAK, J. (1975) **Antibiotics**, vol. 3, Gottliebe, d.; Shaw, P.D. & Cocoran, W., Eds., Spring-Verlag, New York.
- HAMAMOTO, Y., NAKASHIMA, H.; MATSUI, T.; MATSUDA, A.; UEDA, T. & YAMAMOTO, N. (1987) **Inhibitory effect of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxynucleosides on infectivity, cytopathic effects, and replication of human immunodeficiency virus.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, **31**: 907-910.
- HARADA, F.; PETERS, G.G. & DAHLBERG, J.E. (1979) **The primer tRNA for Moloney murine leukemia virus DNA synthesis: nucleotide sequence and amino acylation to tRNA^{Pro}.** *J. Biol. Chem.*, **254**: 10979-10985.
- HARDER, H.C. & ROSENBERG, B. (1970) **Inhibitory effects of antitumor platinum compounds on DNA.** *Int. J. Cancer*, **6**: 207-216.
- HART, G.J.; ORR, D.C.; PENN, C.R.; FIGUEIREDO, H.T.; BOCHME, N.M. & CAMERON, J.M. (1992) **Effects of (-)-2'-deoxy-3'-thiacytidine (3TC) 5'-triphosphate on human immunodeficiency virus reverse transcriptase and mammalian DNA polymerases alpha, beta, and gamma.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, **36**: 1688-1694.
- HITCHCOCK, M.J.M. (1991) **2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine (d4T), an anti-HIV agent.** *Antivir. Chem. Chemother.*, **2**: 125-132.
- HIZI, A.; TAL, R.; SHAHARABANY, M. & LOYA, S. (1991) **Catalytic properties of the reverse transcriptases of human immunodeficiency viruses type 1 and type 2.** *J. Biol. Chem.*, **266**: 6230-6239.
- HO, Y.-K.; FIEL, R.J.; ARADI, J. & BARDOS, T.J. (1980) **Enzymatic synthesis of polyuridylic acid containing modified bases.** *Nucleic Acids Res.*, **14**: 3175-3191.
- HOWLE, J.A. & GALE, G.R. (1970) **cis-Dichlorodiammineplatinum (II). Persistent and selective inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis in vivo.** *Biochem. Pharmacol.*, **19**: 2757-2762.

- HU, W.-S. & TEMIN, H.M. (1990) **Retroviral recombination and reverse transcription.** *Science*, 250: 1227-1233.
- JACOBO-MOLINA, A. & ARNOLD, E. (1991) **HIV reverse transcriptase structure-function relationships.** *Biochemistry*, 30: 6351-6361.
- JACOBO-MALINA, A.; DING, J.; NANNI, R.G.; CLARK, JR., A.D.; LU, X.; TANTILLO, C.; WILLIAMS, R.L.; KAMER, G.; FERRIS, A.L.; CLARK, P.; HIZI, A.; HUGHES, S.H. & ARNOLD, E. (1993) **Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6320-6324.
- JAJU, M.; BEARD, W.A. & WILSON, S.H. (1995) **Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. 3'-Azidodeoxythymidine 5'-triphosphate inhibition indicates two-step binding for template-primer.** *J. Biol. Chem.*, 270: 9740-9747.
- JOHNSON, N.P.; BUTOUR, J.-L.; VILLANI, G.; WIMMER, F.L.; DEFAIS, M.; PIERSON, V. & BRABER, V. (1989) **Metal antitumour compounds: The mechanism of action of platinum complexes.** *Prog. Clin. Biochem. Med.*, 10: 1-24.
- JONES, C.R.; BOLTON, P.H. & KEARNS, D.R. (1978) **Ethidium bromide binding to transfer RNA: Transfer RNA as model system for studying drug-RNA interactions.** *Biochemistry*, 17: 601-607.
- JUCÁ, M.B. & AOYAMA, H. (1995) **Effect of dimethyl sulfoxide on reverse transcriptase activity.** *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 28: 285-290.
- JUCÁ, M.B. & AOYAMA, H. (1996) **Inhibition of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase by an alkaloid purified from *Peschiera campestris*.** *Phytother. Res.*, 10: 113-116.
- KAKIUCHI, N.; MARCK, C.; ROUSSEAU, N.; LENG, M.; DE CLERCQ, E. & GUSCHLBAUER, W. (1982) **Polynucleotide helix geometry and stability. Spectroscopy, antigenic, and interferon-inducing properties of deoxiribose-, ribose-, or 2'-deoxy-2'-fluoro-ribose-containing duplexes of poly (inosinic acid)-poly(cytidylic acid).** *J. Biol. Chem.*, 257: 1924-1928.
- KAKIUCHI, N.; HATTORI, M. & NAMBA, T.; NISHIZAWA, M.; YAMAGISHI, T. & OKUDA, T. (1985) **Inhibitory effect of tannins on reverse transcriptase from RNA tumor virus.** *J. Nat. Prod.*, 48: 614-621.
- KAKIUCHI, N.; HATTORI, M.; ISHII, H. & NAMBA, T. (1987) **Effect of benzo[c]phenanthridine alkaloids on reverse transcriptase and their binding property to nucleic acids.** *Planta Med.*, 53: 22-27.
- KASHMAN, Y.; GUSTAFSON, K.R.; FULLER, R.W.; CORDELLINA, J.H., II; McMAHON, J.B.; CURRENS, M.J.; BUCKHEITR.W., JR.; HUGHES, S.H.; CRAGG, G.M. & BOYD, M.R. (1992) **The calanolides, a novel HIV-inhibitory**

- class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*. *J. Med. Chem.*, 35: 2735-2743.
- KATZ, R.A. & SKALKA, A.M. (1994) **The retroviral enzymes**. *Annu. Rev. Biochem.*, 63: 133-173.
- KEMPF, D.J.; CODACOV, L.; WANG, X.C.; KOHLBRENNER, W.E.; WIDEBURG, N.E.; SALDIVAR, A.; VASAVANONDA, S.; MARSH, H.C.; BRYANT, P.; SHAM, H.L.; GREEN, B.E.; BETEBENNER, D.A.; ERICKSON, J. & NORBECK, D.W. (1993) **Symmetry-based inhibitors of HIV protease. Structure-activity studies of acylated 2,4-diamino-1,5-diphenyl-3-hydroxypentane and 2,5-diamino-1,6-diphenylhexane-3,4-diol**. *J. Med. Chem.*, 36: 320-330.
- KOHLSTAEDT, L.A.; WANG, J.; FRIEDMAN, J.M.; RICE, P.A. & STEITZ, T.A. (1992) **Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor**. *Science*, 256: 1783-1790.
- KONIG, H.; BEHR, E.; LOWER, J. & KURTH, R. (1989) **Azidothymidine triphosphate is as inhibitor of both human immunodeficiency virus type 1 and DNA polymerase gamma**. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33: 2109-2114.
- KOPP, E.B.; MIGLIETTA, J.J.; SHRUTKOWSKI, A.G.; SHIH, C.-K.; GROB, P.M. & SKOOG, M.T. (1991) **Steady state kinetics and inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by a non-nucleoside dipyridodiazepinone, BI-RG-587, using a heteropolymeric template**. *Nucl. Acids Res.*, 19: 3035-3039.
- KORNBERG, A. (1980) **DNA replication**. Freeman and Co., San Francisco.
- KORNBERG, A. & BAKER, T.A. (1992) **DNA replication**. Freeman, San Francisco, 931 pp. 2nd ed.
- KUSUMOTO, I.T.; SHIMADA, I.; KAKIUCHI, N.; HATTORI, M.; NAMBA, T. & SUPRIYATANA, S. (1992) **Inhibitory effects of Indonesian plant extracts on reverse transcriptase of an RNA tumour virus (I)**. *Phytother. Res.*, 6: 241-244.
- LARDER, B.A.; DARBY, G. & RICHMAN, D.D. (1989) **HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy**. *Science*, 243: 1731-1734.
- LENG, M. & BRABEC, V. (1994) in **DNA adducts: identification and biological significance** (Hemminki, K.; Dipple, A.; Shuker, D.E.G.; Kadlubar, F.F.; Segerback, D. & Bartsch, H., eds) pp. 339-348. IARC Scientific Publications n° 125, International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- LIN, T.; SCHINAZI, R.F. & PRUSOFF, W.H. (1987) **Potent and selective *in vitro* activity of 3'-deoxythymidin-2'-ene (3'-deoxy-2',3'-didehydrothymidine) against human immunodeficiency virus**. *Biochem. Pharmacol.*, 36: 2713-2718.

- LIN, T.H.; QUIN, T.; WALSH, M.; GRANDGENETT, D. & LEE, J.C. (1991) **Avian myeloblastosis virus reverse transcriptase. Effect of glycerol on its hydrodynamic properties.** *J. Biol. Chem.*, 266: 1635-1640.
- LOEHRER, P.J. & EINHORN, L.H. (1984) **Cisplatin.** *Ann. Intern. Med.*, 100: 704-713.
- LOYA, S. & HIZI, A. (1990) **The inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by avarol and avarone derivatives.** *FEBS Lett.*, 269: 131-134.
- LOYA, S.; KASHMAN, Y. & HIZI, A. (1992) **The Carotenoid Halocynthiaxanthin: A novel inhibitor of the reverse transcriptase of human immunodeficiency viruses type 1 and type 2.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 293: 208-212.
- LOYA, S.; BAKHANASHVILI, KASHMAN, Y & HIZI, A. (1995) **Peyssonols A and B, two novel inhibitors of the reverse transcriptases of human immunodeficiency virus types 1 and 2.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 316: 789-796.
- LOYA, S.; RUDI, A.; KASHMAN, Y. & HIZI, A. (1997) **Mode of inhibition of HIV reverse transcriptase by 2-hexaprenylhydroquinone, a novel general inhibitor of RNA-and DNA-directed DNA polymerases.** *Biochem. J.*, 324: 721-727.
- MAJUMDAR, C.; ABBOTTS, J.; BRODER, S. & WILSON, S.H. (1988) **Studies of the mechanism of human immunodeficiency virus reverse transcriptase. Steady-state kinetics, processivity, and polynucleotide inhibition.** *J. Biol. Chem.*, 263: 15657-15665.
- MAJUMDAR, C.; STEIN, C.A.; COHEN, J.S.; BRODER, S.; WILSON, S.H. (1989) **Stepwise mechanism of HIV reverse transcriptase: primer function of phosphorothioate oligodeoxynucleotide.** *Biochemistry*, 28: 1340-1346.
- MANFREDI, K.P.; BLUNT, J.W.; CARDELLINA, II, J.H.; McMAHON, J.B.; PANNELL, L.L.; CRAGG, G.M. & BOYD, M.R. (1991) **Novel alkaloids from the tropical plant *Ancistrocladus abbreviatus* inhibit cell killing by HIV-1 and HIV-2.** *J. Med. Chem.*, 34: 3402-3405.
- MANSURI, M.M.; STARRETT JR., J.E.; GHAZZOULI, I.; HITCHCOCK, M.J.; STERZYCKI, R.Z.; BRANKOVAN, V.; LIN, T.S.; AUGUST, E.M.; PRUSOFF, W.M. & SOMMADOSSI, J.P. (1989) **1-(2,3-dideoxy-beta-D-glycero-pent-2-enofuranosyl)thymine. A highly potent and selective anti-HIV agent.** *J. Med. Chem.*, 32: 461-466.
- MARSAIOLI, A.J.; RÚVEDA, E.A. & REIS, F.A.M. (1978) **¹³C NMR spectral analysis of some isoquinoline alkaloids.** *Phytochemistry*, 17: 1655-1658.
- McMAHON, J.B.; CURRENS, M.J.; GULAKOWSKI, R.J.; BUCKHEIT, JR., R.W.; LACKMAN-SMITH, C.; HALLOCK, Y.F. & BOYD, M.R. (1995) **Michellamine B, a novel plant alkaloid, inhibits human immunodeficiency virus-induced cell**

- killing by at least two distinct mechanisms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39: 484-488.
- MELLORS, J.W.; DUTSCHMAN, G.E.; IM, G.-J.; TRAMONTANO, E.; WINKLER, S.R. & CHENG, Y.-C. (1992) **In vivo selection and molecular characterization of human immunodeficiency virus-1 resistant to non-nucleoside inhibitors of reverse transcriptase.** *Mol. Pharmacol.*, 41: 446-451.
- MERLUZZI, V.J.; HARGRAVE, K.D.; LABADIA, M.; GROZINGER, K.; SKOOG, M.; WU, J.C.; SHIH, C.-K.; ECKNER, K.; HATTOX, S.; ADAMS, J.; ROSENTHAL, A.S.; FAANES, R.; ECKNER, R.J.; KOUP, R.A. & SULLIVAN, J.L. (1990) **Inhibition of HIV-1 replication by a nonnucleoside reverse transcriptase inhibition.** *Science*, 250: 1411-1413.
- MITSUYA, H.; WEINHOLD, K.J.; FURMAN, P.A.; ST. CLAIR, M.H.; LEHRMAN, S.N.; GALLO, R.C.; BOLOGNESI, D.; BARRY, D.W. & BRODER, S. (1985) **3'-Azido-3'-deoxythymidine (BWA509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 7096-7100.
- MITSUYA & BRODER (1986) **Inhibition of the in vitro infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (HTLVIII/LAV) by 2',3'-dideoxynucleosides.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 1911-1915.
- MITSUYA, H.; JARRETT, R.F.; MATSUKURA, M.; DI MARZO VERONESE, F.; DE VICO, A.L.; SARNGADHARAN, M.G.; JOHNS, D.G.; REITZ, M.S. & BRODER, S. (1987) **Long-term inhibition of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (human immunodeficiency virus) DNA synthesis and RNA expression in T cells protected by 2',3'-dideoxynucleosides in vitro.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 2033-2037.
- MITSUYA, H.; YARCHOAN, R. & BRODER, S. (1990) **Molecular targets for AIDS therapy.** *Science*, 249: 1533-1544.
- MIYASAKA, T.; TANAKA, H.; BABA, M.; HAYAKAWA, R.; WALKER, T.; BALZARINI, J. & DE CLERCQ, E. (1989) **A novel lead for specific anti-HIV-1 agents: 1-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymine.** *J. Med. Chem.*, 32: 2507-2509.
- MONTAGNIER, L.; CHERMANN, J.C.; BARRÉ-SINOUSI, F.; CHAMARET, S.; GRUEST, J.; NUGEYRE, M.T.; REY, F.; DAUGET, C.; AXLER-BLIN, C.; VEZINET-BRUN, F.; ROUZIOUX, C.; SAIMOT, G.; ROZENBAUM, J.C.; GRISCELLI, C. & BRUNET, J.B. (1984) in **Human T-cell leukemia/lymphoma virus** (Gallo, R.C.; Essex, M. & Gross, L. eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 363-370.

- MONTELARO, R.C.; RYSHLOW, K.E.; BALL, J.M. & CHONG, Y.H. (1991) in **AIDS research reviews** (Koff, w.c.; Wong-Staal, f. & Kennedy, R.C., eds) vol. 1, pp, 219-234, Dekker, NY.
- MOORE, P.S.; JONES, C.J.; MAHMOOD, N.; EVANS, I.G.; GOFF, M.; COOPER, R. & HAY, A.J. (1995) **Anti-(human immunodeficiency virus) activity of polyoxotungstates and their inhibition of human immunodeficiency virus reverse transcriptase.** *Biochem. J.*, 307: 129-134.
- MOULDING, T.; DUTT, A.K. & REICHMAN, L.B. (1995) **Fixed-dose combinations of antituberculous medications to prevent drug resistance.** *Ann. Intern. Med.*, 122: 951-954.
- NAKANE, H. & ONO, K. (1990) **Differential inhibitory effects of some catechin derivatives on the activities of human immunodeficiency virus reverse transcriptase and cellular deoxyribonucleic and ribonucleic acid polymerases.** *Biochemistry*, 29: 2841-2845.
- NARAYAN, O. & CLEMENTS, J.E. (1990) in **Virology** (Fields, b.N. & Knipe, D.M., eds) 2nd edn, pp. 1571-1589, Raven Press, Ltd. NY.
- OLSEN, D.B.; CARROL, S.S.; CULBERSON, J.C.; SHAFER, J.A. & KUO, L.C. (1994) **Effect of template secondary structure on the inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by a pyridinone non-nucleoside.** *Nucleic Acids Res.*, 22: 1437-1443.
- ONO, K.; OGASAWARA, M.; IWATA, Y.; NAKANE, H.; FUJII, T.; SAWAI, K. & SANEYOSHI, M. (1986) **Inhibition of reverse transcriptase activity by 2',3'-dideoxythymidine 5'-triphosphate and its derivatives modified on the 3' position.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 140: 498-507.
- ONO, K.; NAKANE, H. & FUKUSHIMA, M. (1988a) **Differential inhibition of various deoxyribonucleic and ribonucleic acid polymerases by suramin.** *Eur. J. Biochem.*, 172: 349-353.
- ONO, K.; NAKANE, H.; BARRÉ-SINOUSI, F. & CHERMANN, J.C. (1988b) **Differential inhibition of various mamalian DNA polymerase activities by ammonium 21-tungsto-9-antimoniate (HPA-23).** *Eur. J. Biochem.*, 176: 305-310.
- ONO, K.; NAKANE, H.; HERDEWIJN, P.; BALZARINI, J. & DE CLERCQ, E. (1989a) **Differential inhibitory effects of several pyrimidine 2',3'-dideoxynucleoside 5'-triphosphate on the activities of reverse transcriptase and various cellular DNA polymerases.** *Mol. Pharmacol.*, 35: 578-583.
- ONO, K.; NAKANE, H.; FUKUSHIMA, M.; CHERMANN, J.-C. (1989b) **Inhibition of reverse transcriptase activity by a flavonoid compound, 5,6,7-trihydroxyflavone.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 160: 982-987.
- ONO, K. & NAKANE, H. (1990) **Mechanism of inhibition of various cellular DNA and RNA polymerases by several flavonoids.** *J. Biochem.*, 108: 609-613.

- ONO, K.; NAKANE, H.; FUKUSHIMA, M.; CHERMANN, J.-C. & BARRÉ-SINOUSSE, F. (1990) **Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases.** *Eur. J. Biochem.*, 190: 469-476.
- ORLANDO, P.; STRAZZULLO, G.; CARRETTA, F.; DE FALCO, M. & GRIPPO, P. (1996) **Inhibition mechanism of HIV-1, Mo-MuLV and AMV reverse transcriptases by Kelleitin A from *Buccinulum corneum*.** *Experientia*, 52: 812-817.
- PAPAS, T.S.; SANDHAUS, L.; CHIRIGOS, M.A. & FURUSAWA, E. (1973) **Inhibition of DNA polymerase of avian myeloblastosis virus by an alkaloid extract from *Narcissus tazetta* L.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 52: 88-92.
- PAUWELS, R.; BALZARINI, J.; SCHOLS, D.; BABA, M.; DESMYTER, J.; ROSENBERG, I. & DE CLERCQ, E. (1988) **Phosphonylmethoxyethyl purine derivatives, a new class of anti-human immunodeficiency virus agents.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32: 1025-1030.
- PAUWELS, R.; ANDRIES, K.; DESMYTER, J.; SCHOLS, D.; KUKLA, M.J.; BRESLIN, H.J.; RAEYMAECKERS, A.; VAN GELDER, J.; WOESTENBORGH, R.; HEYKANTS, J.; SCHELLEKENS, K.; JANSEN, M.A.C.; DE CLERCQ, E. & JANSEN, P.A.J. (1990) **Potent and selective inhibition of HIV-1 replication *in vitro* by a novel series of TIBO derivatives.** *Nature*, 343: 470-474.
- PAUWELS, R.; ANDRIES, K.; DEBYSER, Z.; VAN DAELE, P.; SCHOLS, D.; STOFFELS, P.; DE VREESE, K.; WOESTENBORGH, R.; VANDAMME, A.-M.; JANSSEN, C.G.M.; ANNÉ, J.; CAUWENBERGH, G.; DESMYTER, J.; HEYKANTS, J.; JANSSEN, M.A.C.; DE CLERCQ, E. & JANSSEN, P.A.J. (1993) **Potent and highly selective human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) inhibition by a series of 6-anilinophenylacetamide derivatives targeted at HIV-1 reverse transcriptase.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 1711-1715.
- PAUWELS, R.; ANDRIES, K.; DEBYSER, Z.; KUKLA, M.; SCHOLS, D.; BRESLIN, H.J.; WOESTENBORGH, R.; DESMYTER, J.; JANSSEN, M.A.C.; DE CLERCQ, E. & JANSSEN, P.A.J. (1994) **New tetrahydroimidazol [4,5,1-*jk*] [1,4]-benzodiazepin-2(1*H*)-one and -thione derivatives are potent inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 replication and are synergistic with 2',3'-dideoxynucleoside analogs.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 38: 2863-2870.
- RAO, K.S.P.B.; COLLARD, M.-P.; DEJONGHE, J.P. & TROET, A. (1990) **The chemistry and structure-activity relationships of some new prodrugs of vinca alkaloids in The chemistry of antitumor agents.** Ed. By Derry E.V. Wilman. Chapman & Hale, New York, p. 370.
- REARDON, J.E. & MILLER, W.H. (1990) **Human immunodeficiency virus reverse transcriptase: substrate and inhibitor kinetics with thymidine 5'-triphosphate**

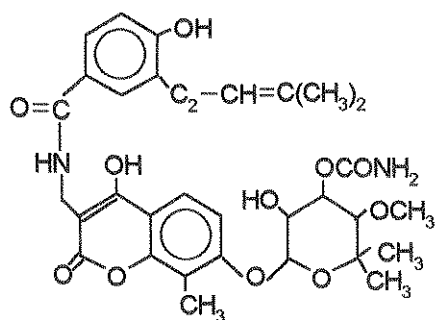
- and 3'-azido-3'-deoxythymidine 5'-triphosphate. *J. Biol. Chem.*, 265: 20302-20307.
- REEDIJK, J. (1992) **The relevance of hydrogen bonding in the mechanism of action of platinum anti-tumor compounds.** *Inorg. Chim. Acta*, 198-200: 873-881.
- RICHMAN, D.D.; FISCHL, M.A.; GRICCO, M.H.; GOTTLIEB, M.S.; JACKSON, G.G.; DURACK, D.T. & LEHRMAN-NUSINOFF, S. (1987) **The toxicity of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial.** *New Engl. J Med.*, 371: 192-197.
- RICHMAN, D.D.; ROSENTHAL, S.; SKOOG, M.; ECKNER, R.J.; CHOU, T.-C.; SABO, J.P. & MERLUZZI, V.J. (1991) **BI-RG-587 is active against zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1 and synergistic with zidovudine.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35: 305-308.
- RICHMAN, D.D. (1993) **Resistance of clinical isolates of human immunodeficiency virus to antiretroviral agents.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37: 1207-1213.
- RICHTER-COOK, N.J.; HOWARD, K.J.; CIRINO, N.M.; WÖHFL, B.M. & LE GRICE, S.F.J. (1992) **Interaction of tRNA^{Lys-3} with multiple forms of human immunodeficiency virus reverse transcriptase.** *J. Biol. Chem.*, 267: 15952-15957.
- RITTINGER, K.; DIVITA, G. & GOODY, R.S. (1995) **Human immunodeficiency virus reverse transcriptase substrate-induced conformational changes and the mechanism of inhibition by nonnucleoside inhibitors.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 8046-8049.
- ROA, R.C. & BOSE, S.K. (1974) **Inhibition by ethidium bromide of the establishment of infection by murine sarcoma virus.** *J. Gen. Virol.*, 25: 197-205.
- ROBERTS, N.A.; MARTIN, J.A.; KINCHINGTON, D.; BROADHURST, A.V.; CRAIG, J.C.; DUNCAN, I.B.; GALPIN, S.A.; HANDA, B.K.; KAY, J.; KROHN, A.; LAMBERT, R.W.; MERRETT, J.H.; MILLIS, J.S.; PARKES, K.E.B.; REDSHAW, S.; RITCHIE, A.J.; TAYLOR, D.L.; THOMAS, G.J. & MACHIN, P.J. (1990) **Rational design of peptide-based HIV proteinase inhibitors.** *Science*, 248: 358-361.
- ROBINSON, J.D. (1975) **Specific modifications of the Na⁺, K⁺-dependent adenosine triphosphate by dimethyl sulfoxide.** *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 243: 60-72.
- ROMERO, D.L.; BUSO, M.; TAN, C.-K.; REUSSER, F.; PALMER, J.R.; POPPE, S.M.; ARISTOFF, P.A.; DOWNEY, K.M.; SO, A.G.; RESNICK, L. & TARPLEY, W.G. (1991) **Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors that potently and specifically block human immunodeficiency virus type 1 replication.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 8806-8810.
- SARDANA, V.V.; EMINI, E.A.; GOTLIB, L.; GRAHAM, D.J.; LINEBERGER, D.W.; LONG, W.J.; SCHALABACH, A.J.; WOLFGANG, J.A. & CONDRA, J.H.

- (1992) **Functional analysis of HIV-1 reverse transcriptase amino acids involved in resistance to multiple non-nucleoside inhibitors.** *J. Biol. Chem.*, 267: 17526-17530.
- SARIH, L. (1981) **Etude de la reconnaissance du tRNA^{Trp} de foie de boeuf par la DNA polymérase RNA dépendante du virus de la myéloblastose aviaire.** *Tese de Doutorado*. Universidade de Bordeaux, França.
- SARIH-COTTIN, L.; GARRET, M.; AOYAMA, H.; GRAVES, P.; TARRAGO-LITVAK, L. & LITVAK, S. (1983) **The *in vitro* inhibition of DNA polymerase α and avian reverse transcriptase by novobiocin.** *Biochem. Int.*, 7: 79-88.
- SARNGADHARAN, M.G.; ROBERT-GUROFF, M. & GALLO, R. C. (1978) **DNA polymerases of normal and neoplastic mammalian cells.** *Biochim. Biophys. Acta*, 516: 419-487.
- SARRAGIOTO, M.H. (1981) **Isolamento e síntese de alcalóides eritrínicos.** *Tese de Mestrado*, Instituto de Química, Unicamp.
- SETHI, M.L. (1983) **Enzyme inhibition VI: Inhibition of reverse transcriptase activity by protoberberine alkaloids and structure-activity relationships.** *J. Pharm. Sci.*, 72: 538-541.
- SETHI, M.L. (1985) **Comparison of inhibition of reverse transcriptase and antileukemic activities exhibited by protoberberine and benzophenanthridine alkaloids and structure-activity relationships.** *Phytochemistry*, 24: 447-454.
- SHERMAN, S.E. & LIPPARD, S.J. (1987) **Structural aspects of platinum anticancer drug interaction with DNA.** *Chem. Rev.*, 87: 1153-1181.
- SMERDON, S.J.; JÄGER, J.; WANG, J.; KOHLSTAEDT, L.A.; CHIRINO, A.J.; FRIEDMAN, J.M.; RICE, P.A. & STEITZ, T.A. (1994) **Structure of the binding site for nonnucleoside inhibitors of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 3911-3915.
- SPENCE, R.A.; KATI, W.M.; ANDERSON, K.S. & JOHNSON, K.A. (1995) **Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors.** *Science*, 267: 988-993.
- ST. CLAIR, M.H.; RICHARDS, C.A.; SPECTOR, T.; WEINHOLD, K.J.; MILLER, W.H.; LANGLOIS, A.J. & FURMAN, P.A. (1987) **3'-Azido-3'-deoxythymidine triphosphate as a inhibitor and substrate of purified human immunodeficiency virus reverse transcriptase.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 31: 1972-1977.
- ST. CLAIR, M.H.; MATIN, J.L.; TUDOR-WILLIAMS, G.; BACH, M.C.; VAVRO, C.L.; KING, D.M.; KELLAM, P.; KEMP, S.D. & LARDER, B.A. (1991) **Resistance to ddI and sensitivity to AZT induced by a mutation in HIV-1 reverse transcriptase.** *Science*, 245: 1557-1559.

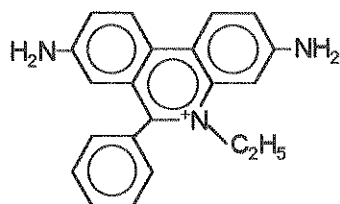
- VRANG, L.; OBERG, B.; LOWER, J. & KURTH, R. (1988) **Reverse transcriptases from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), HIV-2 and simian immunodeficiency virus (SIV_{MAC}) are susceptible to inhibition by foscarnet and 3'-azido-3'-deoxythymidine triphosphate.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32: 1733-1734.
- WAIN-HOBSON, S.; SONIGO, P.; DANOS, O.; COLE, S. & ALISON, M. (1985) **Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV.** *Cell*, 40: 9-17.
- WANG, T.S.-F. (1991) **Eukaryotic DNA polymerases.** *Ann. Rev. Biochem.*, 60: 513-552.
- WEISS, R.; TEICH, N.; VARMUS, H.E. & COFFIN, J. (1985) **RNA Tumor Viruses**, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, New York, 2n Ed.
- WONG, S.W.; SYVAOJA, J.; TAN, C.K.; DOWNEY, K.M.; SO, A.G.; LINN, S. & WANG, T.S.-F. (1989) **DNA polymerases α and δ are immunologically and structurally distinct.** *J. Biol. Chem.*, 264: 5924-5928.
- WOOD, D.C. & WOOD, J. (1975) **Pharmacologic and biochemical considerations of dimethyl sulfoxide.** *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 243: 7-19.
- WU, J.C.; WARREN, T.C.; ADAMS, J.; PROUDFOOT, J.; SKILES, J.; RAHAGNAN, P.; PERRY, C.; POTOCKI, I.; FARINA, P.K. & GROB, P.M. (1991) **A novel dipyrroliquinazolinone inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase acts through a nonsubstrate binding site.** *Biochemistry*, 30: 2022-2026.
- YARCHOAN, R.; PERNO, C.F.; THOMAS, R.V.; KLECKER, R.W.; ALLAIN, J.P.; WILLS, R.J.; McATEE, N.; FISCHL, M.A.; DUBINSKY, R.; McNEELY, M.C.; MITSUYA, H.; PLUDA, J.M.; LAWLEY, T.J.; LEUTHER, M.; SAFAI, B.; COLLINS, J.M.; MYERS, C.E. & BRODER, S. (1988) **Phase I studies of 2,3-dideoxycytidine in severe human immunodeficiency virus infection as a single agent and alternating with zidovudine (AZT).** *Lancet*, 1: 76-81.
- YARCHOAN, R.; MITSUYA, H.; THOMAS, R.V.; PLUDA, J.M.; HARTMAN, N.R.; PERNO, C.-F.; MARCZYK, K.S.; ALLAIN, J.-P.; JOHNS, D.G. & BRODER, S. (1989) **In vivo activity against HIV and favorable toxicity profile of 2'-3'-dideoxycytidine.** *Science*, 245: 412-415.

7. ANEXOS

7.1 ANEXO I: ESTRUTURA DOS COMPOSTOS UTILIZADOS

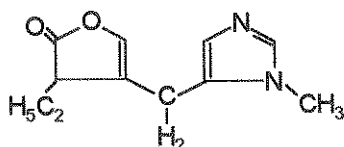


Novobiocina

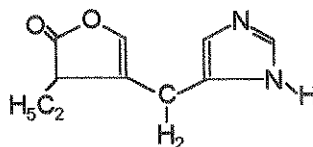


Brometo de Etídeo

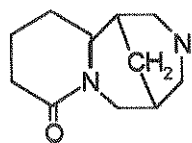
Alcalóides



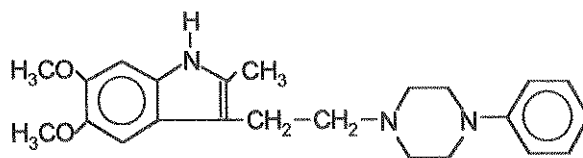
Pilocarpina



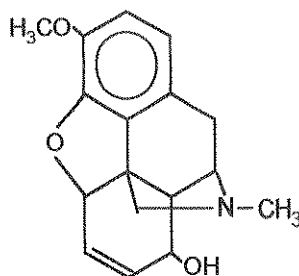
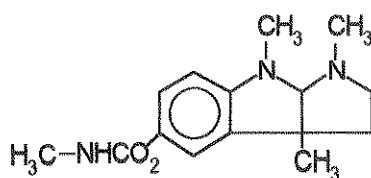
Pilocarpidina

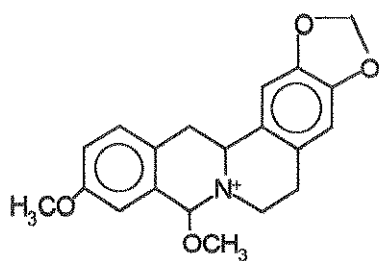


Citisina

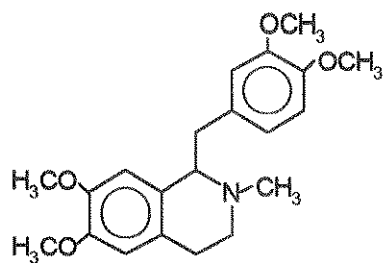


Oxipertina

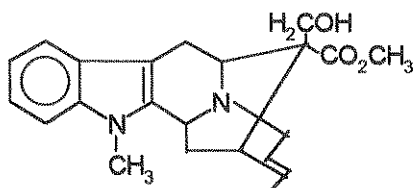




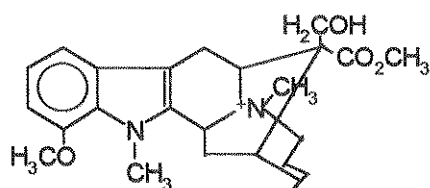
Berberina



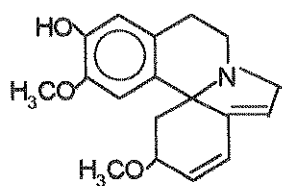
Laudanosina



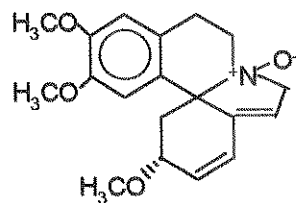
Voacalotina



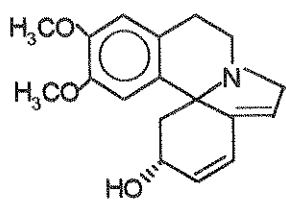
Metoximetilvoacalotina



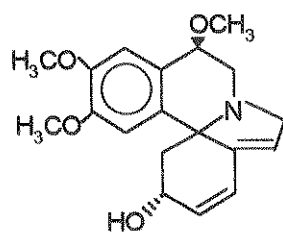
Erisodina



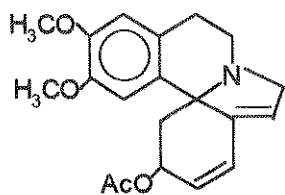
N-Óxido de Erisotrina



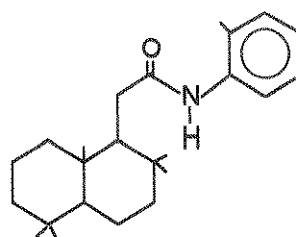
Eritravina



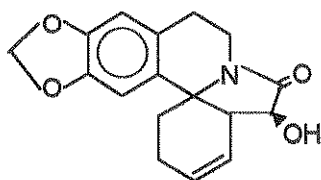
Eritristemina



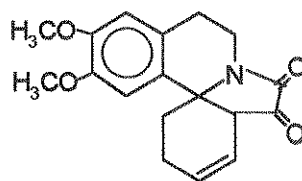
Eritravina Acetilada



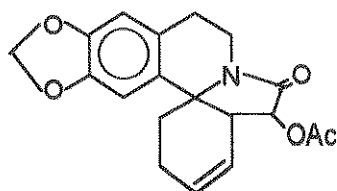
Sintético 1



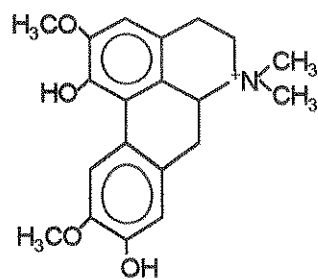
Sintético 2



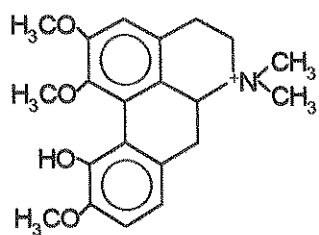
Sintético 3



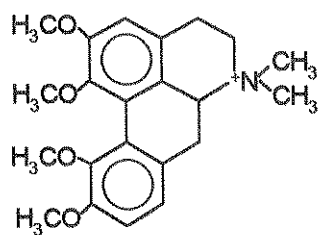
Sintético 4



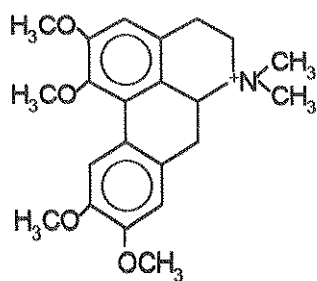
Laurifolina



N-Metil Isocoridina

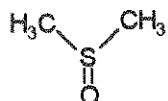


O-Metil-N-Metil Isocoridina

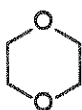


N-Metil Glaucina

Solventes



Dimetilsulfóxido

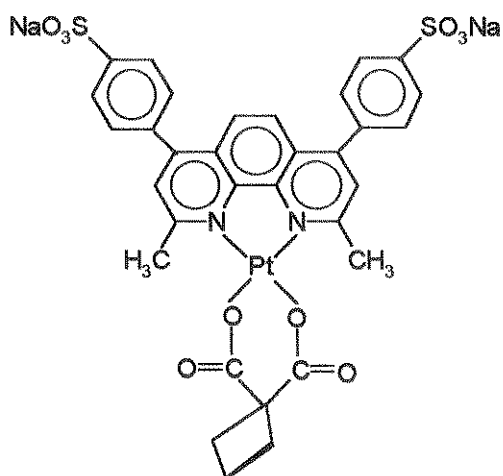


Dioxano

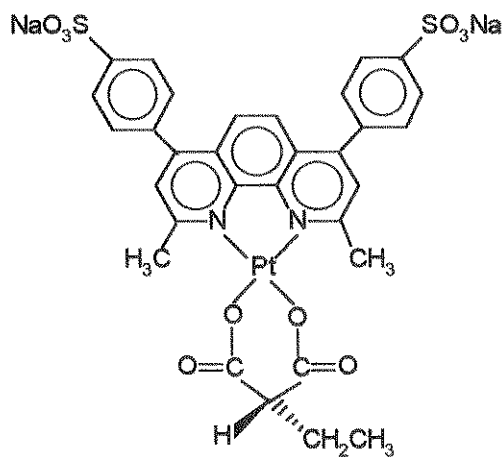


Tetrahidrofurano

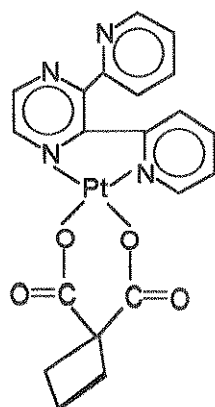
Compostos Platínicos



Pt(BCP)(CBDCA)

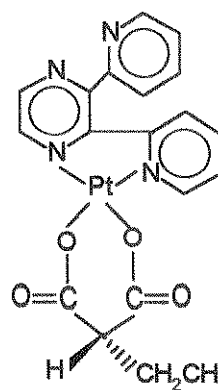


Pt(BCP)(EtMal)

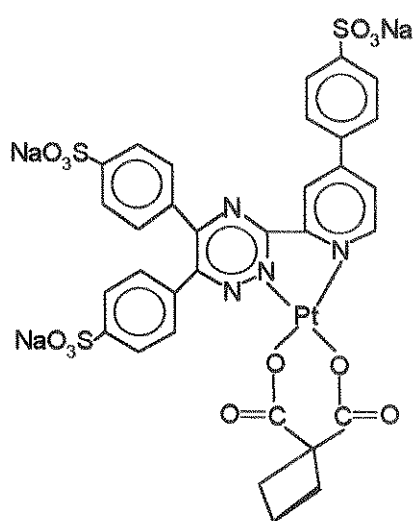


Pt(DPP)(CBDCA)

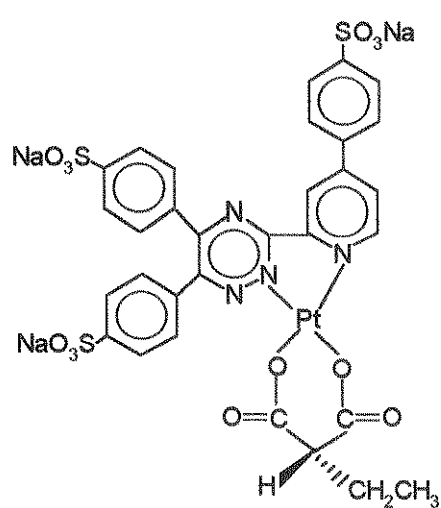
///



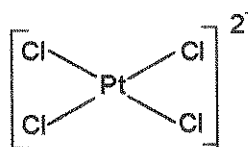
Pt(DPP)(EtMal)



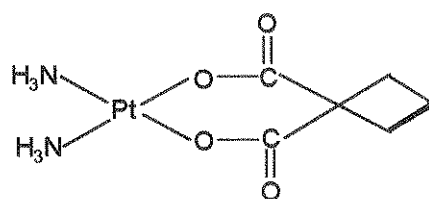
Pt(STSPY)(CBDCA)



Pt(STSPY)(EtMal)



K_2PtCl_4



Pt(NH₃)₂(CBDCA)
(Carboplatina)

7.2 ANEXO II

JUCÁ, M.B. & AOYAMA, H. (1996) Inhibition of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase by an alkaloid purified from *Peschiera campestris*. *Phytotherapy Research*, 10: 113-116.

Inhibition of Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase by an Alkaloid Purified from *Peschiera campestris*

M. B. Jucá and H. Aoyama*

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas, São Paulo, Brazil

12-methoxy-Nb-methylvoachalotine, an alkaloid purified from *Peschiera campestris* inhibited avian myeloblastosis virus reverse transcriptase activities. This inhibition was dependent on the template-primer used; in comparison with polyriboadenylic acid, the polyribocytidylic acid-directed reaction was more affected by the alkaloid. A similar inhibition by the alkaloid was observed both in the presence of polyriboadenylic acid or its 2'-fluorinated analogue. This inhibition also occurred in the presence of Mn^{2+} instead of Mg^{2+} as the divalent cation. Classical non-competitive inhibition kinetics were obtained with respect to activated DNA and to polyriboadenylic acid.

Keywords: reverse transcriptase; alkaloid; inhibition.

INTRODUCTION

Reverse transcriptase (RT) [EC 2.7.7.7] catalyses the complementary DNA synthesis reaction in the presence of natural and synthetic RNA and DNA templates (Gerard, 1983). Activated DNA, several RNAs, polyribonucleotides and polydeoxyribonucleotides can be recognized as templates by the viral enzyme (Duesberg *et al.*, 1971). All those activities require primers which provide free 3'-OH to perform the DNA synthesis. The deoxyribooligomers are more efficient than ribooligomers as primers and they are complementary attached to the templates (Baltimore and Smoller, 1971). If RNA tumour viruses are involved in human neoplasia inhibitors of RT might be useful prophylactic agents in leukaemia and cancer chemotherapy (Weber, 1993). Natural substances have been tested in order to find antiviral agents with reduced cytotoxicity. In this context, inhibitions of RT by several flavonoids (Ono *et al.*, 1990; Chu *et al.*, 1992; Kusumoto *et al.*, 1992), alkaloids (Papas *et al.*, 1973; Sethi, 1985; Kakiuchi *et al.*, 1987; Kusumoto *et al.*, 1992) and other natural compounds (Kakiuchi *et al.*, 1985; Nakane and Ono, 1990; Loya *et al.*, 1994) have been described. We report here the inhibition of avian myeloblastosis virus (AMV) RT by the alkaloid 12-methoxy-Nb-methylvoachalotine (MMV), extracted from *Peschiera campestris* (Rizz.) Rizz., *Apocynaceae*.

MATERIALS AND METHODS

Alkaloid. The alkaloid 12-methoxy-Nb-methylvoachalotine, purified from roots of *Peschiera campestris*, through two silica gel and one anion exchange

columns (Gower *et al.*, 1986), was kindly donated by Dr A. J. Marsaioli (Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil).

Enzyme and chemicals. AMV RT was obtained from Boehringer Mannheim. Calf thymus DNA was activated with DNase I as described by Aposhian and Kornberg (1962). Dithiothreitol (DTT), bovine serum albumin (BSA), calf thymus DNA, polyriboadenylic acid (poly(rA)), polyribocytidylic acid (poly(rC)), oligodeoxythymidylic acid (oligo(dT)), oligodeoxyguanylic acid (oligo(dG)) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) Poly(2'-fluoro-2'-deoxyadenylic acid (poly(dAfl)) was donated by Dr W. Guschlbauer (Service de Biochimie, Saclay, France). Tritium-labelled TTP and dGTP were purchased from New England Nuclear (Du Pont).

Preparation of template-primers. The annealing of the template-primers poly(rA)-oligo(dT) and poly(rC)-oligo(dG) was performed as previously described (Aoyama, 1991). The template:primer ratio was kept at 5:1 in order to avoid multi-strand formation or aggregates (Tambly and Wells, 1975).

Assay of RT. (a) With activated DNA. The incubation mixture in a final volume of 0.05 mL contained 50 mM Tris-HCl (pH 7.9); 2 mM DTT; 200 µg/mL BSA; 10 mM magnesium acetate; 40 mM KCl; 14 µg/mL activated DNA; 50 µM each of dATP, dCTP, dGTP and 10 µM [3H] TTP (1000 cpm/pmol). After addition of 2 units of RT, incubation was carried out at 37°C for 30 min. The reaction was stopped by the addition of 1 mL ice-cold 10% trichloroacetic acid (TCA) solution. The precipitates were filtered through Millipore nitrocellulose membranes, washed with ice-cold 2% TCA acid solution containing 0.1 M sodium pyrophosphate, dried and counted in a PPO/POPOP/toluene scintillation mixture. (b) with synthetic polynucleotides. The incubation mixture in a final volume of 0.05 mL con-

* Author to whom correspondence should be addressed.

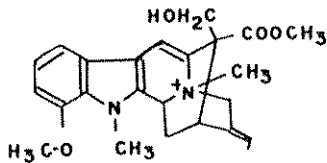


Figure 1. Chemical structure of 12-methoxy-Nb-methylvoachalotine.

tained 50 mM Tris-HCl (pH 7.9); 2 mM DTT; 200 µg/mL BSA; 40 mM KCl; 10 mM magnesium acetate or 0.2 mM manganese chloride; 0.24 A₂₆₀ units/mL poly(rA)-oligo(dT) and 10 µM [³H] TTP (1000 cpm/pmol), or 0.24 A₂₆₀ units/mL poly(rC)-oligo(dG) and 10 µM [³H] dGTP (600 cpm/pmol). The other conditions were the same as described under item (a).

RESULTS AND DISCUSSION

So far only a few alkaloids have been reported to be inhibitory to RT (Papas *et al.*, 1973; Sethi, 1985; Kakiuchi *et al.*, 1987; Kusumoto *et al.*, 1992). Other natural products like flavonoids (Ono *et al.*, 1990; Chu *et al.*, 1992; Kusumoto *et al.*, 1992), terpenoids (Loya and Hizi, 1990), tannins (Kakiuchi *et al.*, 1985), catechin derivatives (Nakane and Ono, 1990), and extracts of blue-green algae (Lau *et al.*, 1993; Loya *et al.*, 1994) have also been described as inhibitors of the viral enzyme activity.

MMV (Fig. 1) belongs to the tryptophan-family of alkaloids (Torsell, 1983) and have been classified as type B, according to Hegnauer (1988). This water-soluble indole alkaloid was purified from root extracts of *Peschiera campestris*, collected in Brasilia, Brazil (Gower *et al.*, 1986).

As shown in Fig. 2, MMV inhibited the RT activity. In order to elucidate the mechanism of enzyme action,

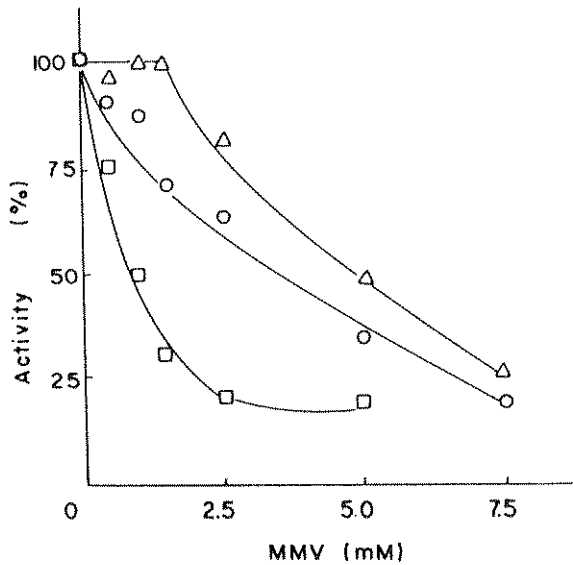


Figure 2. Effect of MMV on the RT activity. RT activity was measured as described in Materials and Methods, in the presence of various concentrations of MMV, by determining the incorporation of [³H]TTP into activated DNA (○), poly(rA)-oligo(dT) (Δ); and of [³H]dGMP into poly(rC)-oligo(dG) (□). 100% activities correspond to 4 (○), 62 (Δ) and 88 (□) pmol of radioactive precursor incorporated/30 min. Each point is the mean of triplicate determinations (SD = ± 7%).

Table 1. Effect of MMV on reverse transcriptase activity with polyadenylic acid analogues as template

Addition	³ H]TMP incorporated (%)	
	poly(rA)-oligo(dT) Mn ²⁺	poly(dAdf)-oligo(dT) Mg ²⁺
None	100 (10)	100 (8)
MMV 2.5 mM	72	76
MMV 5.0 mM	42	30

The assay conditions were the same as described in Materials and Methods, in the presence of 10 mM Mg²⁺ or 0.2 mM Mn²⁺, and MMV at the concentrations indicated. Picomoles of radioactive precursor incorporated/30 min are given in parentheses. TMP incorporation values represent the mean of triplicate determinations (SD = ± 7%).

different template-primers were used in the inhibition studies. The inhibitory aspect was affected by the nature of template-primers, suggesting that the inhibition is not due to the interaction of the alkaloid with the enzyme. The concentrations of MMV giving a 50% inhibition (ID₅₀) were 5.0, 3.5 and 1.0 mM for poly(rA)-oligo(dT), activated DNA and poly(rC)-oligo(dG), respectively. This higher inhibition of the poly(rC)-oligo(dG)-directed RT activity contrasts with the inhibition by another class of alkaloids, benzophenanthridine. The reverse transcription was found to be more sensitive to benzophenanthridine alkaloids inhibition with poly(rA)-oligo(dT) as template-primer than with poly(rC)-oligo(dG); in the last case, no inhibition of enzyme activity was observed (Sethi and Sethi, 1975; Sethi, 1985). The same findings reported in the case of inhibition by tannins, isolated from higher plants, were explained to be a result of strong binding affinity of these compounds with A-T base pairs of the template-primer (Kakiuchi *et al.*, 1985).

The 2'-fluorinated analogue of polyadenylic acid is a good template for AMV RT (Aoyama *et al.*, 1985). When compared with poly(rA), a similar inhibition by the alkaloid MMV was observed using poly(dAdf) as template (Table 1). The MMV inhibition of [³H]TMP incorporation into poly(rA)-oligo(dT) or poly(rC)-oligo(dG) was not significantly altered using Mn²⁺ instead of Mg²⁺ as the divalent cation. Our results suggest that the inhibition of RT is not dependent on the divalent cation (Mg²⁺ or Mn²⁺) used, or on the 2'-substituent in the sugar moiety of polyadenylic acid derivatives (Table 1). Some other compounds, such as synthetic polynucleotides inhibited the poly(rA)- but not the poly(rC)-directed RT reaction (Aoyama *et al.*, 1985).

The inhibition of RT by MMV was analysed kinetically with respect to activated DNA and to poly(rA)-oligo(dT), the two most commonly template-primers used. In both cases, typical non-competitive inhibitions of the viral enzyme by the alkaloid are shown in Fig. 3 and Fig. 4. The binding of MMV to another site would modify the affinity for the sites of the template-primers, without interacting directly with them. The inhibition may also be due to binding of the inhibitor to the enzyme-template complex but not to the template or enzyme alone. In the reactions catalysed by RT, K_i values for MMV were determined by Dixon plots (Fig. 3 and Fig. 4, insets) to be 6.0 and 3.7 mM in relation to activated DNA and to poly(rA)-oligo(dT), respectively. An alkaloid extracted from *Narcissus tazetta* L.

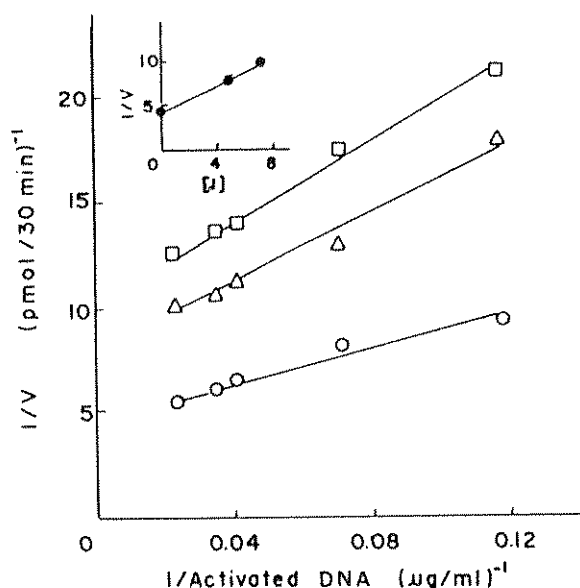


Figure 3. Lineweaver-Burk double-reciprocal plots for the kinetic of inhibition of activated DNA-directed RT reaction by MMV. The assay conditions were the same as described in Materials and Methods, except that various concentrations of activated DNA were used as the template-primer, in the absence (○) and in the presence of 5.0 (Δ) and 7.5 mM (□) MMV. Inset Dixon plot. Each point is the mean of triplicate determinations (SD = ± 7%).

inhibited the AMV RT activity in non-competitive fashion with respect to poly d(A-T) as template-primer (Papas *et al.*, 1973). Phenanthridine alkaloids inhibited differently the poly(rA)-oligo(dT)-directed RT activity. These inhibitors seem to interfere with the binding of template to the enzyme either by directly interacting with template or by competing with the template for the enzyme site, thus preventing synthesis (Sethi, 1976; Kakiuchi *et al.*, 1987).

We are evaluating the inhibitory effects of other

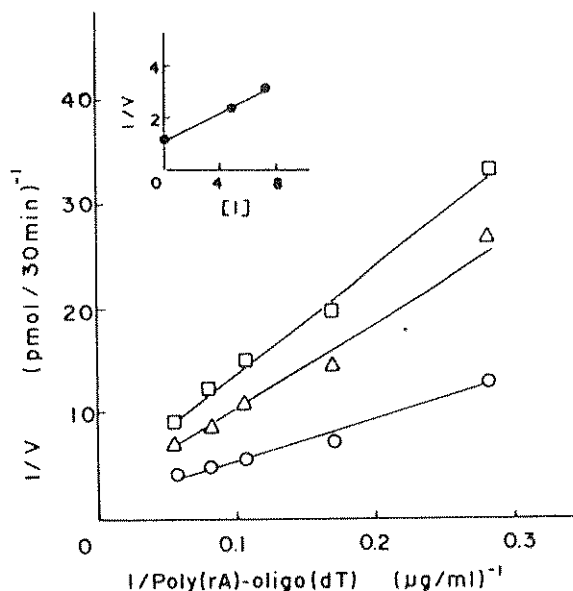


Figure 4. Lineweaver-Burk double-reciprocal plots for the kinetic of inhibition of poly(rA)-oligo(dT)-directed RT reaction by MMV. The assay conditions were the same as described in Materials and Methods, except that various concentrations of poly(rA)-oligo(dT) were used as the template-primer, in the absence (○) and in the presence of 5.0 (Δ) and 7.5 mM (□) MMV. Inset Dixon plot. Each point is the mean of triplicate determinations (SD = ± 7%).

alkaloids purified from *Peschiera campestris* on the viral RT and cellular DNA polymerase activities.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (n° 91/5207-1), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (n° 401679/89-6), and Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa/UNICAMP (n° 34/92). We are grateful to Dr Roy Edward Bruns (Instituto de Química, UNICAMP) for critically reading the manuscript.

REFERENCES

- Aoyama, H. (1991). Avian myeloblastosis virus reverse transcriptase inhibition by nalidixic acid. *Mol. Cell. Biochem.* **108**, 169-174.
- Aoyama, H., Sarih-Cottin, L., Tarrago-Litvak, L., Kakiuchi, N., Litvak, S., and Gushlbauer, W. (1985). 2'-fluoro-2'-deoxy-poly-nucleotides as templates and inhibitors for RNA- and DNA-dependent DNA polymerases. *Biochim. Biophys. Acta* **824**, 225-232.
- Aposhian, H. V., and Kornberg, A. (1962). Enzymatic synthesis of DNA. IX. The polymerase formed after T2 bacteriophage infection of *E. coli*: a new enzyme. *J. Biol. Chem.* **237**, 519-524.
- Baltimore, D., and Smoler, D. (1971). Primer requirement and template specificity of the DNA polymerase of RNA tumor viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 1507-1511.
- Chu, S. C., Hsieh, Y. S., and Lin, J. Y. (1992). Inhibitory effects of flavonoids on Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *J. Nat. Prod.* **55**, 179-183.
- Duesberg, P., Helm, K. V. D., and Canaani, E. (1971). Comparative properties of RNA and DNA templates for the DNA polymerase of Rous sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 2505-2509.
- Gerard, G. F. (1983). Reverse transcriptase. In *Enzymes of Nucleic Acid Synthesis and Modification*, ed. by S. T. Jacob. Vol. 1, pp. 1-38. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Gower, A. E., Pereira, B. S., and Marsaioli, A. J. (1986). Indole alkaloids from *Peschiera campestris*. *Phytochemistry* **25**, 2908-2910.
- Hegnauer, P. (1988). Biochemistry, distribution and taxonomic relevance of higher plant alkaloids. *Phytochemistry* **27**, 2423-2427.
- Kakiuchi, N., Hattori, M., Ishii, H., and Namba, T. (1987). Effect of benzo[c]phenanthridine alkaloids on reverse transcriptase and their binding properties to nucleic acids. *Planta Med* **53**, 22-27.
- Kakiuchi, N., Hattori, M., Namba, T., Nishizawa, M., Yamagishi, T., and Okuda, T. (1985). Inhibitory effect of tannins on reverse transcriptase from RNA tumor virus. *J. Nat. Prod.* **48**, 614-626.
- Kusumoto, I. T., Shimada, I., Kakiuchi, N., Hattori, M., Namba, T., and Supriyatna, S. (1992). Inhibitory effects of Indonesian plant extracts on reverse transcriptase of an RNA tumour virus (I). *Phytother. Res.* **6**, 241-244.
- Lau, A. F., Siedlecki, J., Anleitner, J., Patterson, G. M. L., Caplan, F. R., and Moore, R. E. (1993). Inhibition of reverse transcriptase activity by extracts of cultured blue-green algae (*Cyanophyta*). *Planta Med.* **59**, 148-151.
- Loya, S., and Hizi, A. (1990). The inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by avarol and avarone derivatives. *FEBS Lett.* **269**, 131-134.
- Loya, S., Rudi, A., Tal, R., Kashman, Y., Loya, Y., and Hizi, A. (1994). 3,5,8-Trihydroxy-4-quinolone, a novel natural inhibi-

- tor of the reverse transcriptases of human immunodeficiency viruses type 1 and type 2. *Arch. Biochem. Biophys.* **309**, 315–322.
- Nakane, H., and Ono, K. (1990). Differential inhibitory effects of some catechin derivatives on the activities of human immunodeficiency virus reverse transcriptase and cellular deoxyribonucleic and ribonucleic acid polymerases. *Biochemistry* **29**, 2841–2845.
- Ono, K., Nakane, H., Fukushima, M., Chermann, J. C., and Barré-Sinoussi, F. (1990). Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *Eur. J. Biochem.* **190**, 469–476.
- Papas, T. S., Sandhaus, L., Chirigos, M. A., and Furusawa, E. (1973). Inhibition of DNA polymerase of avian myeloblastosis virus by an alkaloid extract from *Narcissus tazetta* L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **52**, 88–92.
- Sethi, M. L. (1985). Comparison of inhibition of reverse transcriptase and antileukemic activities exhibited by protoberberine and benzophenanthridine alkaloids and structure-activity relationship. *Phytochemistry* **24**, 447–454.
- Sethi, V. S. (1976). Inhibition of mammalian and on coronavirus nucleic acid polymerase activities by alkoxybenzophenanthridine alkaloids. *Cancer Res.* **36**, 2390–2395.
- Sethi, V. S., and Sethi, M. L. (1975). Inhibition of reverse transcriptase activity of RNA-tumor viruses by fagaronine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **63**, 1070–1076.
- Tambly, T. M., and Wells, R. D. (1975). Comparative ability of RNA and DNA to prime DNA synthesis *in vitro*; role of sequence, sugar, and structure of template-primer. *Biochemistry* **14**, 1412–1425.
- Torsell, K. B. G. (1983). *Natural Product Chemistry. A Mechanism and Biosynthetic Approach to Secondary Metabolism*, John Wiley & Sons, New York.
- Weber, J. (1993). The molecular basis of antiretroviral therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* **32**, 789–791.

7.3 ANEXO III

JUCÁ, M.B. & AOYAMA, H. (1995) **Effect of dimethyl sulfoxide on reverse transcriptase activity.** *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 28: 285-290.

Effect of dimethyl sulfoxide on reverse transcriptase activity

M.B. Jucá and
H. Aoyama

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia,
Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas, SP, Brasil

Abstract

At low concentrations, dimethyl sulfoxide (DMSO) stimulated the avian myeloblastosis virus reverse transcriptase activity. About 40% stimulation was obtained in the presence of 5% (v/v) DMSO, using activated DNA and polyriboadenylic acid (poly(rA)) as templates, and Mg^{2+} as divalent cation. A similar stimulation by DMSO was observed with Mn^{2+} for the poly(rA)-dependent reverse transcriptase activity. DMSO at concentrations higher than 15% inhibited the reverse transcriptase reactions, independent of the template-primers used. An exception was detected with the 2'-fluoro analog of poly(rA) as template, where an activation of 100% was found in the presence of 20% DMSO. The stimulation caused by DMSO could be due to a reduction of the apparent K_m value for poly(rA) from 9.1 to 3.3 $\mu g/ml$.

Key words

- Reverse transcriptase
- Avian myeloblastosis virus
- Dimethyl sulfoxide
- Stimulation
- Poly(rA)

Correspondence

H. Aoyama
Departamento de Bioquímica
Instituto de Biologia
UNICAMP
Cidade Universitária
13083-970 Campinas, SP
Brasil

Research supported by FAPESP
(No. 91/5207-1), CNPq (No.
401679/89-6) and FAEP/Unicamp
(No. 0034/92).

Received August 23, 1994
Accepted February 16, 1995

Introduction

Reverse transcriptase (EC 2.7.7.7) catalyzes the complementary DNA synthesis reaction in the presence of natural and synthetic RNA and DNA templates (1,2). Activated DNA, several RNAs, polyribonucleotides and polydeoxyribonucleotides are recognized as templates by this viral enzyme (3,4). All these activities require deoxyribooligomer primers which are attached in a complementary manner to the templates and provide free 3'-OH to perform DNA synthesis (5).

The effects of the following solvents have been tested on reverse transcriptase and other polymerase activities: polyethylene glycol (6), chemical disinfectants such as ethanol, glutaraldehyde and sodium

hypochlorite (7), and glycerol (8).

The relatively polar solvent DMSO has a small and compact structure and can accept a hydrogen bond. This combination of properties results in the ability of DMSO to associate with water, proteins, carbohydrates, nucleic acids, ionic substances, and other constituents of living systems (9).

DMSO has differential effects on the activities of DNA-dependent DNA polymerases (10,11). The solvent did not inhibit reverse transcriptase activity since cell-free Friend murine leukemia virus incubated with and without DMSO showed the same enzyme activity (12). DMSO is currently used as a solvent for a wide range

of chemical substances, including alkaloids whose effect on reverse transcriptase activity is one of the objectives of our studies. Before studying the effects of alkaloids dissolved in DMSO, it was necessary to characterize the mode of action of this solvent. To our knowledge, detailed DMSO effects on kinetic analysis of the reverse transcriptase reaction have not been reported. In the present study we describe the effect of DMSO on reverse transcriptase activity in the presence of different template-primers.

Material and Methods

Avian myeloblastosis virus (AMV) reverse transcriptase was obtained from Boehringer Mannheim. Calf thymus DNA was activated with DNase I as described by Aposhian and Kornberg (13). Dimethylsulfoxide, dithiothreitol, bovine serum albumin, calf thymus DNA, polyriboadenylic acid (poly(rA)), and oligodeoxythymidylate (oligo(dT)) were obtained from Sigma Chemical Co. Poly(2'-fluoro-2'-deoxyadenylic acid) (poly(dAf)) was donated by Dr. W. Gushlbauer (Service de Biochimie, Saclay, France). Tritium-labelled TTP was purchased from New England Nuclear (Du Pont).

Preparation of template-primers

The annealing of the template-primers poly(rA)-oligo(dT) and poly(dAf)-oligo(dT) was performed as previously described (14). The template:primer ratio was maintained at 5:1 in order to avoid multi-strand formation or aggregates (15).

Reverse transcriptase assay

a) With activated DNA. The incubation mixture, in a final volume of 0.05 ml, contained 50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 2

mM dithiothreitol, 200 µg/ml bovine serum albumin, 10 mM magnesium acetate, 40 mM KCl, 14 µg/ml activated DNA, and 50 µM each of dATP, dCTP, dGTP and 10 µM [³H] TTP (1,000 cpm/pmol). After the addition of 2 units of reverse transcriptase, incubation was carried out at 37°C for 30 min. The reaction was stopped by the addition of 1 ml ice-cold 10% trichloroacetic acid. The precipitates were filtered through Millipore nitrocellulose membranes, washed with an ice-cold 2% trichloroacetic acid solution containing 0.1 M sodium pyrophosphate, dried and counted in a PPO/POPOP/toluene scintillation mixture.

b) With synthetic polynucleotides. The incubation mixture, in a final volume of 0.05 ml, contained 50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 2 mM dithiothreitol, 200 µg/ml bovine serum albumin, 40 mM KCl, 10 mM magnesium acetate or 0.2 mM MnCl₂, 0.24 A₂₆₀ units/ml poly(rA)-oligo(dT) or poly(dAf)-oligo(dT), and 10 µM [³H] TTP (1,000 cpm/pmol). The other conditions were the same as described in the previous paragraph.

Results

The effects of different solvents on reverse transcriptase activity are reported in Table 1. We observed that 5% (v/v) DMSO activated the poly(rA)-oligo(dT)-dependent reverse transcriptase reaction; inhibitions were observed in the presence of 10% DMSO, 10% (v/v) dioxane and 10% (v/v) 2-methoxyethanol. Under the same conditions, tetrahydrofuran had no effect. Since DMSO has been used in our laboratory to solubilize several alkaloids in the search for antiviral agents, we focused our attention on the study of this solvent with respect to the reactions catalyzed by reverse transcriptase.

As shown in Figure 1, the effect of DMSO concentration was studied in the

presence of different template-primers. DMSO at the concentration of 5% activated the reaction catalyzed by AMV reverse transcriptase, independent of the tem-

Table 1 - Effect of solvents on reverse transcriptase activity.

The assay was carried out as described in Methods. Poly(rA)-oligo(dT) was used as template-primer. Concentrations are reported as v/v. Data are reported as percent of maximum activity (20 pmol [³H]TMP incorporated/30 min) and were the average of three determinations (SD = ± 7%).

Addition	Concentration (%)	[³ H]TMP incorporated (%)
None		100
Dimethyl sulfoxide	5	140
Dimethyl sulfoxide	10	72
Dioxane	5	113
Dioxane	10	26
Tetrahydrofuran	5	115
Tetrahydrofuran	10	110
2-methoxyethanol	5	105
2-methoxyethanol	10	71

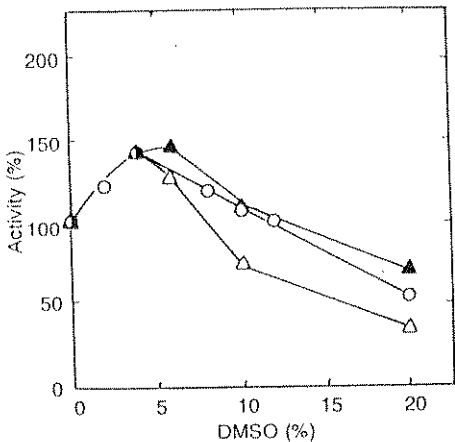


Figure 1 - Effect of DMSO concentration on reverse transcriptase activity. The assay conditions were the same as described in Methods, in the presence of activated DNA (○), poly(rA)-oligo(dT)/Mg²⁺ (△) or poly(rA)-oligo(dT)/Mn²⁺ (▲) as template-primer. One hundred percent activity corresponds to the incorporation of 3.4, 20 and 6.5 pmol/30 min of [³H]TMP into activated DNA, poly(rA)-oligo(dT)/Mg²⁺ and poly(rA)-oligo(dT)/Mn²⁺, respectively. Each point is the mean of triplicate determinations (SD = ± 7%).

plate-primer used. This activating effect was also observed when Mn²⁺ was used instead of Mg²⁺ as divalent cation. In contrast, DMSO at concentrations higher than 10% inhibited the reaction catalyzed by the viral enzyme.

The effect of DMSO on reverse transcriptase activity was also studied in the presence of the 2'-fluorinated analog of poly(rA) as template (Figure 2). Poly(dAfl) was previously shown to be an efficient template for AMV reverse transcriptase (16). In contrast to the effect described in Figure 1, DMSO activated the poly(dAfl)-dependent reverse transcriptase reaction at a higher concentration, about 20%.

As shown in Figure 3, the effect of

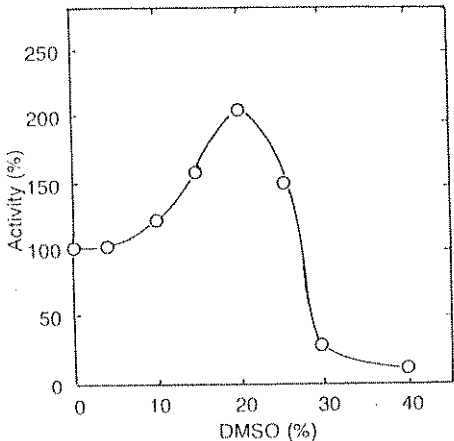


Figure 2 - Effect of DMSO concentration on reverse transcriptase activity with poly(dAfl)-oligo(dT) as template-primer. The assay conditions were as described in Methods. One hundred percent activity corresponds to 3.0 pmol of [³H]TMP incorporated/30 min. Each point is the mean of triplicate determinations (SD = ± 7%).

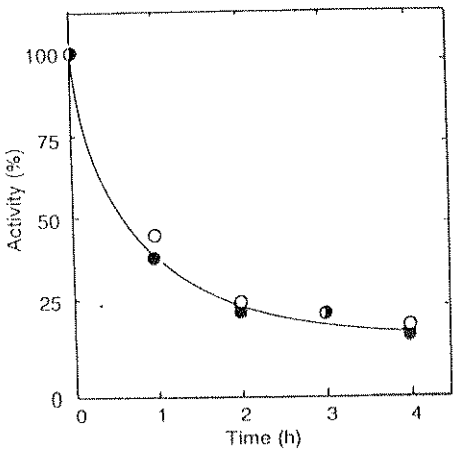


Figure 3 - Effect of DMSO on the stability of reverse transcriptase. Aliquots of 2 units reverse transcriptase were incubated at 4°C in 10 µl 100 mM Tris-HCl, pH 8.9, in the absence (○) and in the presence of 4% DMSO (●) for the times indicated. After the addition of the other components, poly(rA)-dependent reverse transcriptase activity was measured as described in Methods. Each point is the mean of triplicate determinations (SD = ± 7%).

DMSO was studied during the incubation of reverse transcriptase before the enzymatic assay. A loss of enzyme activity occurred independently of the presence of 4% DMSO.

The effect of DMSO on the kinetic parameters of the reaction catalyzed by reverse transcriptase is shown in Table 2.

Table 2 - Kinetic parameters of the poly(rA)-directed reverse transcriptase reaction.

The assay was carried out as described in Methods, with or without 6% DMSO (v/v). Data are reported as means $\pm$ SD for three experiments. The concentration range of poly(rA)-oligo(dT) was 1.2 to 36 μ g/ml.

Conditions	Km (μ g/ml)	Vmax (pmol/30 min)	Vmax/Km
Control	9.1 $\pm$ 0.8	25.0 $\pm$ 2.2	2.7 $\pm$ 0.3
+DMSO	3.3 $\pm$ 0.3	35.7 $\pm$ 3.2	10.8 $\pm$ 0.9

Apparent Km values of 9.1 and 3.3 μ g/ml, for poly(rA), were obtained in the absence and in the presence of 6% DMSO, respectively. Although the Vmax value was not altered significantly, the Vmax/Km ratio was 4-fold higher in the presence of DMSO.

Discussion

Although reverse transcriptase has been the subject of intensive investigation, little information is available regarding the physical state of the enzyme in relation to its biological activities. Polyethylene glycol, a solvent used for concentration of retroviruses, enhanced reverse transcriptase activity, increasing both the rate and duration of polymerization (6). In the search for a sensitive biological test for infectivity, it has been observed that the human immunodeficiency virus reverse transcriptase is inactivated by ethanol, glutaraldehyde and sodium hypochlorite (7). Lin et al. (8) reported some of the basic physical char-

acteristics of AMV reverse transcriptase in solution, studying the effect of glycerol on its hydrodynamic properties. These authors observed that glycerol induced native reverse transcriptase to dimerize, a phenomenon favored by high temperature.

We have tested the effect of dimethyl sulfoxide, dioxane, tetrahydrofuran and 2-methoxyethanol on AMV reverse transcriptase activity (Table 1). Of these solvents, only DMSO showed an activating effect on the viral enzyme activity, at the concentration of 5%.

Because we use DMSO for solubilizing alkaloids, we wished to study in more detail the effect of DMSO on viral reverse transcriptase, the enzyme selected as the target for these natural compounds. We have tested different natural and synthetic template-primers in order to determine the possible participation of templates in the effect of DMSO. Low concentrations of DMSO (about 5%) enhanced the AMV reverse transcriptase activity with activated DNA and poly(rA)-oligo(dT) as template-primers (Figure 1). This solvent did not significantly alter the divalent cation requirement for the poly(rA)-directed reverse transcriptase reaction. Our results suggest that the activating effect in the presence of a low DMSO concentration was independent of the template used (DNA- or RNA-like). The inhibition of the reverse transcriptase activity by high concentrations of DMSO (Figure 1) was not due to a change in pH (17) but could be partially ascribed to the dissociation of alpha-beta enzyme subunits which occurs in 30% DMSO (18). A direct effect of DMSO on the enzyme should be considered, rather than an effect of DMSO on enzyme-template complexes, since inhibition of reverse transcriptase activity was observed independently of the template-primers used.

Although the substitution of the H or

OH at the 2' position of the sugar did not seem to be important for the effect of DMSO (Figure 1), the presence of a fluorine atom was critical. Using a poly(rA) analog with a fluorine atom at the 2' position, we observed a shift in optimal DMSO concentration for activation from 5 to 20% (Figure 2). This effect is not yet well understood. When synthetic polynucleotides are used as template, the activating effect of DMSO could be involved in the hydrogen bonding of 2'-OH with water (19). It is worthwhile mentioning that a highly electronegative 2'-substituent, such as fluorine, can stabilize the polynucleotide structure by forming a hydrogen-bound water bridge (19,20).

The presence of DMSO did not protect the reverse transcriptase from thermal inactivation (Figure 3), in contrast to the observation of Chan et al. (6) with polyethylene glycol.

In order to study the kinetic behavior due to the presence of DMSO on the reverse transcriptase reaction, we focused our attention on poly(rA)-oligo(dT), the most commonly used template-primer by this kind of enzyme. The viral enzyme is highly unstable when kept at 4°C (Figure 3). However, substrates (deoxynucleoside triphosphates) and template-primers prevent this inactivation under the conditions used in our kinetic studies (data not shown). Our results suggest that the stimulatory

effect of DMSO could be partially due to a decrease in the K_m value for poly(rA)-oligo(dT) in the presence of the solvent (Table 2). Under the same conditions, the V_{max} value was increased by a factor of only 1.4, whereas the catalytic efficiency, expressed by V_{max}/K_m , increased 4-fold in the presence of DMSO. This appears also to be the case for the enhancing of the DNA polymerase III activity by DMSO, where the solvent increased V_{max} and decreased K_m values for the deoxynucleoside triphosphates (10). However, the complexity of the DNA synthesis reaction catalyzed by reverse transcriptase, involving the enzyme, four deoxynucleotides, template-primer and divalent cation, makes further interpretation of our kinetic results difficult.

A number of other enzymes have been described whose activity is affected by DMSO, including RNA polymerase (21) and adenosine triphosphatase (22,23). A detailed physical characterization and a relationship to sarcoplasmic reticulum ATPase activities were determined with DMSO and glycerol (22).

Acknowledgment

The authors wish to thank Dr. Ladaslav Sodek (Instituto de Biologia, UNICAMP) for critically reading the manuscript.

References

1. Verma IM (1981). Reverse transcriptase. In: Boyer PD (Editor), *The Enzymes*. Vol. 14-A. Academic Press, New York, 87-103.
2. Gerard GF (1983). Reverse transcriptase. In: Jacob ST (Editor), *Enzymes of Nucleic Acid Synthesis and Modification*. Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1-38.
3. Duesberg P, Helm KVD & Canaani E (1971). Comparative properties of RNA and DNA templates for the DNA polymerase of Rous sarcoma virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 68: 2505-2509.
4. Faras AJ, Taylor JM, McDonnell J, Levinson WE & Bishop JM (1972). Purification and characterization of the DNA polymerase associated with Rous sarcoma virus. *Biochemistry*, 11: 2334-2342.
5. Ballimore D & Smoler D (1971). Primer requirement and template specificity of the DNA polymerase of RNA tumor viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 68: 1507-1511.
6. Chan EW, Dale PJ, Greco IL, Rose JG & O'Connor TE (1980). Effects of polyethylene glycol on reverse transcriptase and other polymerase activities. *Biochimica et Biophysica Acta*, 606: 353-361.
7. Spire B, Montagnier L, Barré-Sinoussi F & Chermann JC (1984). Inactivation of lymphadenopathy associated virus by chemical disinfectants. *Lancet*, 20: 899-901.
8. Lin TH, Quinn T, Walsh M, Grandgenett D & Lee JC (1991). Avian myeloblastosis virus reverse transcriptase. Effect of glycerol on its hydrodynamic properties. *Journal of Biological Chemistry*, 266: 1635-1640.
9. Szmant HH (1975). Physical properties of dimethyl sulfoxide and its function in biological systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 243: 20-23.
10. Heinze JE & Carl PL (1975). The effects of organic solvents on *Escherichia coli* DNA polymerase III. *Biochimica et Biophysica Acta*, 402: 35-40.
11. Lee MYW & Toomey NL (1986). Differential effects of dimethylsulfoxide on the activities of human DNA polymerases alpha and beta. *Nucleic Acids Research*, 14: 1719-1726.
12. Ebert PS & Buell DN (1977). Viral reverse transcriptase suppression associated with erythroid differentiation of Friend leukemia cells. *Journal of National Cancer Institute*, 58: 635-640.
13. Aposhian HV & Kornberg A (1962). Enzymatic synthesis of DNA. IX. The polymerase formed after T2 bacteriophage infection of *Escherichia coli*: a new enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 237: 519-524.
14. Aoyama H, Jucá MB, Castroviejo M & Litvak S (1993). Inhibition of the wheat germ DNA polymerase A activity by the antiviral drug HPA-23. *Plant Molecular Biology*, 23: 1055-1060.
15. Tamby TM & Wells RD (1975). Comparative ability of RNA and DNA to prime DNA synthesis *in vitro*: role of sequence, sugar, and structure of template-primer. *Biochemistry*, 14: 1412-1425.
16. Aoyama H, Sarih-Cottin L, Tarrago-Litvak L, Kakiuchi N, Litvak S & Guschlbauer W (1985). 2'-Fluoro-2'-deoxypolynucleotides as templates and inhibitors for RNA- and DNA-dependent DNA polymerases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 824: 225-232.
17. Wood DC & Wood J (1975). Pharmacologic and biochemical considerations of dimethyl sulfoxide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 243: 7-19.
18. Grandgenett DP (1976). Dissociation of alpha beta DNA polymerase of avian myeloblastosis virus by dimethyl sulfoxide. *Journal of Virology*, 17: 950-961.
19. Bolton PH & Kearns DR (1978). Hydrogen bonding of the 2'OH in RNA. *Biochimica et Biophysica Acta*, 517: 329-337.
20. Guschlbauer W, Blandin M, Drocourt JL & Thang MN (1977). Poly-2'-deoxy-2'-fluoro-cytidylic acid: enzymatic synthesis, spectroscopic characterization and interaction with polyinosinic acid. *Nucleic Acids Research*, 4: 1933-1943.
21. Madon J, Leser U & Zillig W (1983). DNA-dependent RNA polymerase from the extremely halophilic archaebacterium *Halococcus morrhuae*. *European Journal of Biochemistry*, 135: 279-283.
22. de Meis L, Martins OB & Alves EW (1980). Role of water, hydrogen ion, and temperature on the synthesis of adenosine triphosphate by the sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase in the absence of a calcium ion gradient. *Biochemistry*, 19: 4252-4261.
23. Mintz E, Forge V & Guillain F (1993). Dimethyl sulfoxide favours the covalent phosphorylation and not the binding of Pi to sarcoplasmic reticulum ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1162: 227-229.