

OTÁVIO DE MELO ESPÍNDOLA

**EFEITO DO AZT SOBRE A PROLIFERAÇÃO E O CICLO MITÓTICO DE
CÉLULAS VERO: AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE METABÓLICA PELA
BIOSSÍNTESE DE VÍRUS DA INFLUENZA A**



Dissertação apresentada ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF. PAULO DE GÓES

Rio de Janeiro

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

ESPÍNDOLA, Otávio de Melo

Efeito do AZT sobre a proliferação e o ciclo mitótico de células Vero: avaliação da integridade metabólica pela biossíntese de vírus da influenza A. Rio de Janeiro, IMPPG, UFRJ, 2006.

xi, 55 p.

Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Palavras-chave:

1. AZT (Zidovudina);
 2. Bloqueio do ciclo celular;
 3. Citometria de fluxo;
 4. Vírus da Influenza A;
 5. Integridade metabólica.
- I. Universidade Federal do Rio de Janeiro (IMPPG)
 - II. Título.

Trabalho realizado no Departamento de Virologia, do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, sob orientação do Prof^o. Maulori Curié Cabral.

Aos meus pais, Mauricea e Décio, e ao meu irmão,
Eduardo, com orgulho e gratidão.

A João Henrique da Silva e Severina da Silva Henrique
por todo o apoio e carinho.

Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive

Ricardo Reis, *Odes*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Mauricea e Décio, ao meu irmão, Eduardo, a João Henrique da Silva e Severina da Silva Henrique, e a todos os meus amigos pelo incentivo nos momentos de fraqueza, e por sempre terem acreditado em mim.

Agradeço também aos professores Maulori Curié Cabral e Maria Isabel Madeira Liberto, e a Barbara C.E.P.D. Oliveira pela orientação acadêmica, pela paciência, e pelo carinho que sempre demonstraram por mim, e aos amigos do laboratório por sempre estarem disponíveis a me ajudar.

Aos professores da banca examinadora: Vivian M. Rumjanek, Maria Tereza V. Romanos, José Nelson S.S. Couceiro, e Davis F. Ferreira por terem aceitado o convite atenciosamente e pelas sugestões para um melhor entendimento deste trabalho.

Aos professores Pedro Persechini e Vivian M. Rumjanek pela colaboração para realização deste trabalho, e às agências de fomento CNPq e FUJB.

SUMÁRIO

ITENS	PÁGINA
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
ABREVIATURAS	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Ciclo celular: mecanismos de regulação	5
1.2. Replicação do DNA celular e mecanismos de <i>checkpoint</i>	9
1.3. Biossíntese dos vírus da influenza A por células infectadas	12
1.4. Síntese de timidina: vias <i>de novo</i> e <i>salvage</i>	23
2. HIPÓTESE	25
3. OBJETIVOS	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. Cultivo de células Vero	25
4.2. Preparo da solução-estoque de AZT	27
4.3. Purificação de vírus da influenza A (X31 - H3N2)	27
4.4. Determinação do título infeccioso da amostra purificada de vírus A/X31 em dose infecciosa para 50% das culturas de células inoculadas (CCID ₅₀)	27
4.5. Cinética de inibição da proliferação de células Vero pelo AZT, avaliada pela técnica de contagem ao microscópio	28
4.6. Determinação da concentração de AZT capaz de inibir a proliferação de células Vero em 50 % (CI ₅₀), através da técnica de MTT	29
4.7. Determinação da influência do AZT sobre as fases do ciclo celular por citometria de fluxo	29
4.8. Determinação do grau de infecção por vírus da influenza A (X31) em culturas de células Vero tratadas com AZT	30
5. RESULTADOS	31
5.1. AZT inibe a proliferação de células Vero	31
5.2. Bloqueio do ciclo mitótico de células Vero na fase S pelo AZT	33
5.3. Células Vero retidas na fase S pelo AZT são metabolicamente competentes para a produção de partículas de vírus da influenza A	36
6. DISCUSSÃO	37
7. REFERÊNCIAS	45

RESUMO

AZT é um nucleosídeo análogo da timidina que, após ser trifosforilado por enzimas celulares, interfere no processo de síntese de DNA. Depois de incorporada no DNA, esta droga impossibilita a inserção do nucleotídeo subsequente, em decorrência da substituição da hidroxila do carbono 3' da desoxirribose por um radical azido. Esta interferência no processo de replicação do DNA celular desencadeia os mecanismos de *checkpoint* e de reparo, provocando um aumento no tempo de divisão celular, principalmente, nos estágios de síntese de DNA (fase S), e de conferência da integridade genômica (fase G₂). Partindo dessa premissa, a proliferação de células Vero foi avaliada na presença de diferentes doses de AZT, utilizando-se as técnicas de redução do MTT, contagem de células ao microscópio e analisando-se, também, as alterações no perfil do ciclo celular das culturas com auxílio da citometria de fluxo. Paralelamente, as análises do efeito da composição do meio de cultura sobre o efeito inibitório do nucleosídeo AZT na proliferação celular mostraram que, após 24h de incubação em meio 199 com 200µM de AZT, e em MEM com 400µM, a maioria das células permaneceu retida na fase S ($74,9 \pm 2,1\%$ e $60,2 \pm 5,5\%$, respectivamente), diferente dos controles ($14,0 \pm 0,2\%$ e $15,7 \pm 0,3\%$, respectivamente). Quando as culturas foram tratadas com AZT na concentração equivalente à CI₅₀ no meio 199 (50µM) e no MEM (100µM), foi possível revelar a retenção das células Vero na fase S como um processo temporário, como pôde ser observado pelo aumento da quantidade de células nas fases G₀/G₁ e G₂/M após 72h de incubação. A sensibilidade ao AZT mostrou-se duas vezes maior nas culturas de células Vero incubadas em meio 199 do que naquelas cultivadas em MEM. O metabolismo basal das células Vero, na presença de AZT, foi avaliado pela utilização de vírus da influenza A como ferramentas moleculares, analisando-se, através da biossíntese deste tipo viral, a integridade dos processos de síntese de mRNA, além da síntese e endereçamento de proteínas. Neste estudo, a similaridade nos títulos infecciosos, obtidos em CCID₅₀, nas culturas tratadas e não tratadas com AZT sugerem que tais atividades mantiveram-se funcionais, mesmo na presença de 400µM de AZT, embora em células linfóides e da medula óssea os efeitos adversos desta droga comprometam a síntese de RNA e de proteínas.

ABSTRACT

AZT is a nucleoside analogue of thymidine, which after triphosphorylation by cellular kinases, interferes with DNA synthesis. When incorporated into DNA, this drug impairs the addition of a subsequent nucleotide due to an azido radical in substitution to the 3'-hydroxyl group from deoxyribose. This interference with cellular DNA replication unleashes the checkpoint and repair mechanisms that prolong the time required for cell division mainly in the stages for DNA synthesis (S phase) and for checking of genome integrity (G₂ phase). Based on this premise, the proliferation of Vero cells was evaluated in the presence of different AZT doses with techniques of MTT reduction and of cell counting on microscope. Abnormalities in cell cycle profiles were also analyzed through flow cytometry. Concurrently, the analysis from the effect of the culture medium composition on the AZT activity upon cell proliferation showed that the majority of cells were arrested in S phase after 24 h of incubation with AZT at 200 μ M in 199 medium ($74.9 \pm 2.1\%$) and at 400 μ M in MEM ($60.2 \pm 5.5\%$). In contrast, the controls presented, respectively, only $14.0 \pm 0.2\%$ and $15.7 \pm 0.3\%$ of the cells in S phase. When the cell cultures were treated with AZT at doses equivalent to the CI₅₀ in 199 medium (50 μ M) and in MEM (100 μ M), the arrest of Vero cells in S phase was a temporary process. It was observed an increase in cells in G₀/G₁ and G₂/M phases after 72 h of incubation. Therefore, the sensitivity of Vero cells to AZT was twice higher in cultures incubated in 199 medium than in MEM. The basal metabolism of Vero cells in the presence of AZT was evaluated using influenza A virus as molecular tools. The integrity of distinct cellular processes, such as mRNA synthesis and protein synthesis and addressing, were analyzed through the biosynthesis of this viral type. In this study, the similarity of the infectious titres, obtained in CCID₅₀, in the Vero cell cultures treated and non-treated with AZT suggests that the cellular activities cited above were still functional, even in the presence of 400 μ M of AZT, in despite of the side effects on RNA and protein synthesis observed in lymphocytes and in bone marrow cells.

ABREVIATURAS

3TC: 2',3'-didesoxi-3'-tiacitidina

ATM: *ataxia-telangiectasia mutated*

ATR: *ataxia-telangiectasia Rad3-related*

AZT: 3'-azido-3'-desoxitimidina

AZT-MP: AZT monofosfato

AZT-TP: AZT trifosfato

CCID₅₀: dose infecciosa para 50% das culturas de células inoculadas

CDK: *cyclin-dependent kinase*

CF: *cleavage factor*

Chk: *checkpoint effector kinase*

CI₅₀: concentração capaz de inibir em 50% a proliferação celular

CPSF: *cleavage/polyadenylation specificity factor*

cRNA: RNA complementar

CstF: *cleavage specificity factor*

D.O.: densidade ótica

d4T: 2',3'-didesidro-2',3'-didesoxitimidina

ddC: 2',3'-didesoxicitidina

ddl: 2',3'-didesoxi-inosina

DMSO: *dimetilsulfóxido*

dNTP: desoxinucleotídeo trifosfato

eIF: fator eucarionte de iniciação da tradução (*Eukaryotic initiation factor*)

HA: hemaglutinina

HBSS: solução salina tamponada de Hanks (*Hanks' buffered saline solution*)

HIV: vírus da imunodeficiência humana (*Human immunodeficiency virus*)

I κ B: inibidor de NF- κ B

ICK: inibidor de CDK

IFN: interferon

IKK: I κ B quinase (*I κ B kinase*)

M1: proteína matriz 1

M2: proteína matriz 2

MCM: *minichromosome maintenance*

MEM: meio mínimo essencial (*Minimum essential medium*)

mRNA: RNA mensageiro

MTT: brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-y1)-2,5-difenil tetrazólio
NA: neuraminidase
NEP: proteína de exportação nuclear (*Nuclear export protein*)
NF-κB: fator nuclear κB (*Nuclear factor κB*)
NLS: sinal de localização nuclear (*Nuclear localization signal*)
NP: nucleoproteína
NS1: proteína não-estrutural 1 (*Non-structural protein 1*)
PA: proteína ácida
PAB II: *poli(A) binding-protein II*
PAP: poliadenilato polimerase
PB1: proteína básica 1
PB2: proteína básica 2
PBS: salina fosfatada tamponada (*Phosphate buffered saline*)
PCNA: *proliferating cell nuclear antigen*
PKR: proteína quinase ativada por RNA*ds* (*Protein kinase dsRNA-activated*)
pol: polimerase
pRb: proteína supressora de *Retinoblastoma*
RFC: *replication factor complex*
RNA*df*: RNA de dupla-fita
RNP: ribonucleoproteína
RPA: *replication protein A*
RpRd: RNA polimerase-RNA dependente
SFB: soro fetal bovino
SIDA: síndrome da imunodeficiência adquirida
snRNA: *small nuclear RNA*
TK1: timidina quinase citosólica
TK2: timidina quinase mitocondrial
TLS: síntese translesão (*Translesion synthesis*)
TR: transcriptase reversa
Vero: linhagem celular de rim de macaco verde africano

1. INTRODUÇÃO:

O análogo nucleosídico da timidina, AZT (3'-azido-3'-desoxitimidina), também conhecido como zidovudina, foi inicialmente sintetizado por Horwitz, Chua & Noel (1964). Contudo, a aplicação clínica desta molécula começou a ser avaliada apenas na década seguinte (Lin & Prussoff, 1978), sendo usada como um inibidor da proliferação de células tumorais. Posteriormente, Mitsuya *et al.* (1985) demonstraram, *in vitro*, que o AZT era capaz de inibir a infecção de linfócitos T CD4⁺ pelos vírus da imunodeficiência humana (HIV), e sugeriram a utilização desta droga no tratamento da SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida). O emprego do AZT para tais fins foi autorizado pelo *Food and Drug Administration* (FDA, Estados Unidos) em 1987, quando passou a ser produzido e comercializado pelos laboratórios Burroughs-Wellcome (Souza & Almeida, 2002). Atualmente, a dosagem terapêutica de AZT recomendada pelo Ministério da Saúde é de 600mg ao dia, que resulta numa concentração sanguínea de 6 a 10 μ M (Langtry & Campoli-Richards, 1989; Ministério da Saúde, 2004).

A monoterapia com AZT é aceitável apenas para a quimioprofilaxia da transmissão vertical da infecção por HIV. Por outro lado, esta prática é desaconselhada na terapia de pacientes com SIDA, devido ao fenômeno de seleção de variantes das transcriptases reversas (TR) de HIV resistentes a esta droga. Por isso, o coquetel terapêutico inicial é composto por dois inibidores análogos de nucleosídeo, sendo um deles geralmente AZT, em associação a um inibidor não-análogo de nucleosídeo ou a um inibidor de protease (Ministério da Saúde, 2004).

A molécula de AZT constitui uma pró-droga que precisa ser trifosfatada antes que possa agir como inibidor da síntese de DNA (Rowe, Weissing & Lawrence, 2001). Por isso, a atividade do AZT é dependente da sua conversão gradual até AZT trifosfato (AZT-TP), processo este catalisado pelas enzimas celulares timidina quinase, timidilato quinase e pirimidina-nucleosídeo-difosfato quinase (Barry *et al.*, 1996). Contudo, enquanto as cinéticas das reações de fosforilação do AZT e da timidina pela timidina quinase citosólica não apresentam diferenças significativas (Furman *et al.*, 1986), a cinética de fosforilação do AZT monofosfato (AZT-MP), pela timidilato quinase, é 60 vezes mais lenta do que a do timidilato (Ostermann *et al.*, 2000). Dessa forma, conforme demonstrado *in vitro* por Furman *et al.* (1986), linfócitos tratados com AZT acumulam altos níveis de AZT-MP, enquanto as concentrações de AZT di- e trifosfato mantêm-se duas ordens de magnitude menores. Por isso, a função da timidilato quinase representa um fator limitante para o potencial biológico do AZT (Lavie *et al.*,

1997). Uma vez trifosfatado, o AZT compete com a desoxitimidina trifosfato (dTTP) na síntese de DNA mediada por TRs (Richman, 2001), e também na de DNA polimerases (pols) celulares (Nickel *et al.*, 1992) e mitocondriais (Lim & Copeland, 2001).

O processo de replicação do DNA nuclear requer, pelo menos, as DNA pols α , δ e ε , enquanto as demais DNA pols eucarióticas descritas atuam, principalmente, em mecanismos de reparo [Tabela 1.1]. Por outro lado, a replicação do DNA mitocondrial é realizada exclusivamente pela pol γ . Em alguns casos, as DNA pols são complexos que desempenham múltiplas funções, como por exemplo a pol α , em que duas de suas quatro subunidades formam uma enzima denominada DNA primase, que sintetiza *primers* de RNA (Hübscher, Maga & Spadari, 2002).

TABELA 1.1: DNA pols expressas em células de mamíferos.

NOME	FUNÇÕES
Pol α (alfa)	Síntese de <i>primers</i> de RNA, replicação e reparo do DNA
Pol δ (delta)	Replicação do DNA, reparo na excisão de bases e nucleotídeos
Pol ε (epsilon)	Replicação do DNA, reparo na excisão de bases e nucleotídeos
Pol γ (gama)	Replicação do DNA mitocondrial e reparo na excisão de bases
Pol β (beta)	Reparo na excisão de bases
Pol θ (theta)	Reparo de <i>crosslinks</i>
Pol λ (lambda)	Reparo meiótico
Pol ζ (zeta)	Síntese translesão (TLS) e hipermutação somática
Pol η (eta)	TLS, hipermutação somática, coesão da cromátide irmã
Pol μ (mu)	Hipermutação somática
Pol σ (sigma)	Coesão das cromátides irmãs
Pol ι (iota)	TLS
Pol κ (kappa)	TLS
Rev1	TLS

Adaptado de Hübscher, Maga & Spadari (2002).

A ação enzimática comum a todas as DNA pols ocorre pelo favorecimento do ataque nucleofílico do grupo 3'-OH do nucleotídeo terminal da molécula de DNA ao fósforo 5'- α do dNTP a ser adicionado, resultando na incorporação deste à cadeia de DNA, e na liberação de um pirofosfato [Figura 1.1] (Hübscher, Maga & Spadari, 2002).

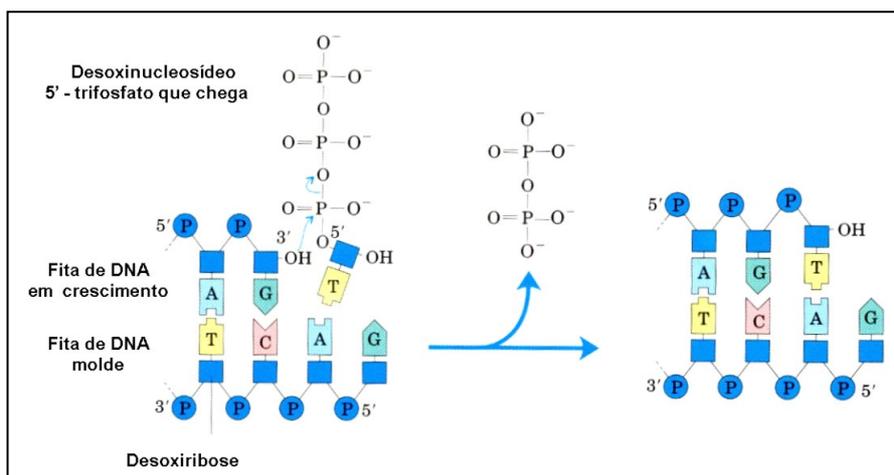


Figura 1.1. Atividade catalítica comum às DNA pols (Nelson & Cox, 2000).

Por isso, a incorporação de AZT nas moléculas de DNA inviabiliza o processo de alongamento realizado por DNA pols, sendo esta inibição consequência da presença de um radical azido (N_3) em substituição à 3'-OH da desoxirribose [Figura 1.2] (Furman *et al.*, 1986).

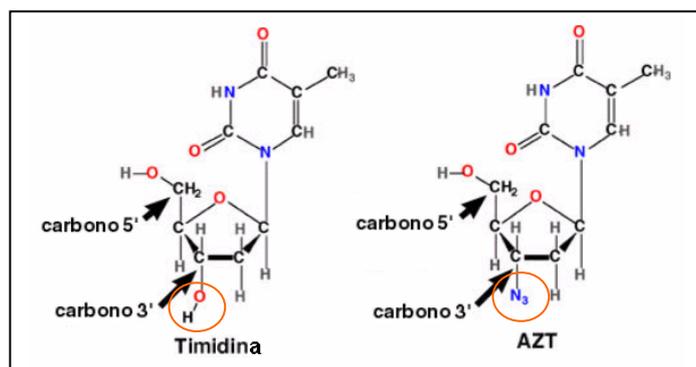


Figura 1.2. Comparação entre as moléculas de timidina (PM = 242,23) e de AZT (PM = 267,24). O análogo AZT apresenta um grupamento azido no lugar da 3'-OH da timidina (Casiday & Frey, 2001).

Conforme demonstrado *in vitro* por Nickel *et al.* (1992), a atividade polimerásica das DNA pols α , δ e ϵ é inibida pelo AZT-TP. Contudo, as concentrações inibitórias de AZT-TP definidas para cada uma destas três DNA pols foram pelo menos duas ordens de magnitude maior do que os níveis de AZT-TP detectados no citoplasma de células expostas ao AZT (Furman *et al.*, 1986). A incorporação de AZT em moléculas de DNA somente foi verificada quando da atividade da pol α . Por outro lado, o DNA sintetizado pelas pols δ e ϵ apresentaram níveis indetectáveis de AZT. Esse processo foi relacionado à função de exonuclease 3'→5' destas pols e, por isso, foi concluído que é

improvável que o bloqueio da proliferação celular seja referente à interferência direta do AZT-TP com a atividade das DNA pols α , δ e ϵ . Além disso, Nickel *et al.* (1992) demonstraram que as DNA pols δ e ϵ são capazes de remover o AZT terminal das fitas de DNA sintetizadas pela pol α antes de iniciar o seu alongamento, em decorrência da ação de exonuclease 3'→5'. Contudo, a cinética deste processo, em comparação com a de controles com dTTP, foi até 100 vezes mais lenta. Por isso, o impedimento físico que a molécula de AZT-MP representa para a atividade das pols δ e ϵ no alongamento dos segmentos de DNA, sintetizados inicialmente pela DNA pol α , é responsável pelo retardo do processo de replicação do DNA nuclear em células expostas a esta droga.

Por outro lado, o efeito inibitório do AZT-TP sobre a atividade das transcriptases reversas de HIV se resume ao bloqueio do alongamento da fita de DNA complementar, após a incorporação desta droga durante a transcrição da molécula de RNA genômico. Furman *et al.* (1986) comprovaram que a sensibilidade das transcriptases reversas de HIV ao efeito inibitório proporcionado pela incorporação de AZT, é pelo menos 100 vezes maior que a da DNA pol α . Embora a transcriptase reversa de HIV não exerça função de exonuclease 3'→5' (Roberts, Bebenek & Kunkel, 1988), Meyer *et al.* (1999) descreveram que esta enzima é capaz de remover o AZT-MP 3'-terminal do DNA, através de um mecanismo que utiliza o ATP como molécula receptora. Contudo, este mecanismo mostrou-se pouco eficiente, pois a cinética de alongamento de fitas de DNA com AZT-MP terminal foi 200 vezes mais lenta do que a obtida com segmentos de DNA contendo um terminal 3'-OH. Posteriormente, Naeger, Margot & Miller (2002), demonstraram que este processo não se restringe ao AZT, pois a TR de HIV promove a remoção de análogos nucleosídicos distintos, como por exemplo: d4T (2',3'-didesidro-2',3'-didesoxitimidina), ddl (2',3'-didesoxi-inosina), 3TC (2',3'-didesoxi-3'-tiacitidina), e ddC (2',3'-didesoxicitidina).

Dessa forma, o efeito de inibição do AZT na síntese de DNA é mais evidente sobre as transcriptases reversas dos HIV, devido à presença de um sistema de reparo ineficiente (Meyer *et al.*, 1999). Em contrapartida, as DNA pols α , δ e ϵ , por possuírem função de exonuclease 3'→5', são capazes de remover o AZT-MP terminal após a sua incorporação, minimizando com isso a interferência desta droga com o processo de síntese de DNA (Furman *et al.*, 1986). Contudo, células tratadas com AZT acumulam altas concentrações de AZT-MP (aproximadamente 900pmol/10⁶ células) no citoplasma (Furman *et al.*, 1986), que interferem com a função de exonuclease 3'→5' da DNA pol δ e, por isso, afetam a sua retirada das fitas de DNA, aumentando os níveis de AZT-MP incorporado ao genoma celular, fenômeno este que contribui em parte com a toxicidade

celular (Bridges, Faraj & Sommadossi, 1993; Harrington, Reardon & Spector, 1993).

A interferência do AZT na síntese de DNA celular gera diferentes efeitos adversos nos indivíduos sob terapia com esta droga, tais como: (i) miopatias, associadas à lipodistrofia e à acidose láctica, resultantes de alterações funcionais da mitocôndria (Dalakas *et al.*, 1990), tais como perda de DNA mitocondrial, devido à interferência com a função da DNA pol γ , acúmulo de lipídeos, e inibição do ciclo de Krebs e da cadeia respiratória, gerando um aumento da produção de ácido láctico, proveniente da glicólise (Benbrik *et al.*, 1997; Pan-Zhou *et al.*, 2000); (ii) tumorigênese e redução dos telômeros em células mielóides e linfóides (Olivero *et al.*, 2005); e (iii) mielossupressão (anemia e neutropenia) (Ministério da Saúde, 2004), corroborada por ensaios *in vitro*, em que a proliferação de células hematopoiéticas mielóides e eritróides foi reduzida em 50% na presença de $0,9 \pm 0,1\mu\text{M}$ e $2,4 \pm 0,4\mu\text{M}$ de AZT, respectivamente (Sommadosi & Carlisle, 1987).

A duplicação do genoma celular é um processo complexo, que pode ser ainda mais dificultado com agentes externos que interfiram com a replicação de DNA. O ciclo de divisão celular consiste de dois eventos, caracterizados pela replicação do DNA e pela subsequente segregação dos cromossomos nas duas novas células geradas. A divisão celular em eucariontes é academicamente dividida em dois estágios: a mitose, que consiste do próprio processo físico de divisão, e a intérfase, que representa o interlúdio entre duas fases M. Os estágios da mitose incluem prófase, metáfase, anáfase e telófase. Sob observação microscópica, células em intérfase simplesmente aumentam de tamanho. Contudo, diferentes técnicas revelaram que a intérfase inclui as fases G_1 , S e G_2 (Johnson & Walker, 1999; Vermeulen, Bockstaele, & Berneman, 2003). Uma vez que a incorporação de AZT interfere com a síntese de DNA, é provável que este processo retarde a progressão do ciclo celular durante a fase S.

1.1. CICLO CELULAR: MECANISMOS DE REGULAÇÃO

Muitas informações e hipóteses sobre a regulação da progressão do ciclo celular de eucariontes vêm de estudos genéticos, bioquímicos e estruturais realizados com leveduras. Um dos primeiros genes identificados como um importante regulador do ciclo celular em leveduras foi o que codifica para a quinase Cdc2. Em mamíferos, o homólogo desta enzima é denominado CDK1 (CDK, *Cyclin-dependent kinase*) (Nurse & Bissett, 1981). A ativação das CDKs requer a associação com uma subunidade regulatória denominada ciclina. Inicialmente, as ciclinas foram identificadas em ouriços

marinhos, como proteínas cuja concentração oscila durante o ciclo celular (Rosenthal, Hunt & Ruderman, 1980; Evans *et al.*, 1983). Essa oscilação, que ocorre pela alternância de síntese e destruição periódica das ciclinas, regula a atividade das CDKs e propicia o significado básico da regulação do ciclo celular (Johnson & Walker, 1999). Em contraste aos eucariontes inferiores, que apresentam no máximo dois produtos gênicos semelhantes à Cdc2, em células de mamíferos já foram identificadas nove CDKs (CDK1-9), com atividade serina/treonina quinase (Vermeulen, Bockstaele, & Berneman, 2003). Além disso, ainda em mamíferos, foram descritas, pelo menos, 16 ciclinas, identificadas como: A, B1, B2, C, D1, D2, D3, E, F, G1, G2, H, I, K, T1 e T2 [Tabela 1.2]. Todas as ciclinas contêm uma região homóloga destinada à interação com as CDKs, e assim exercem a regulação da atividade destas quinases (Johnson & Walker, 1999).

TABELA 1.2: Ciclinas e CDKs expressas em células de mamíferos.

CICLINAS	CDKs ASSOCIADAS	FUNÇÕES
A	CDK1 (<i>cdc2</i>), CDK2	Entrada e transição para a fase S
B1, B2	CDK1	Saída da fase G ₂ e mitose
C	CDK8	Regulação transcricional e transição de G ₀ para S
D1, D2, D3	CDK4, CDK6	Transição de G ₀ para S
E	CDK2	Transição de G ₁ para S
F	?	Transição de G ₂ para M
G1, G2	CDK5	Resposta ao DNA danificado e diferenciação neural
H	CDK7	Ativação de CDK, regulação transcricional, reparo de DNA
I	?	?
K	?	Regulação transcricional, ativação de CDK
T1, T2	CDK9	Regulação transcricional

Adaptado de Johnson & Walker (1999).

As primeiras etapas do processo de divisão celular são reguladas por ciclinas D, cuja expressão é induzida durante a fase G₂ do ciclo de divisão antecedente, ou na transição de G₀ para G₁ (Hitomi & Stacey, 2001). Nesse processo, as ciclinas D se associam com as CDKs 4 e 6, formando complexos enzimáticos que fosforilam a pRb (Proteína supressora de Retinoblasma), que é um repressor do fator de transcrição E2F. O fator pRb regula a progressão da fase G₁ modulando a ação de E2F. Este fator encontra-se inativo quando ligado com pRb que, ao ser fosforilado pelos complexos CDK4,6/ciclina D, se dissocia de E2F [Figura 1.3] (Johnson & Walker, 1999).

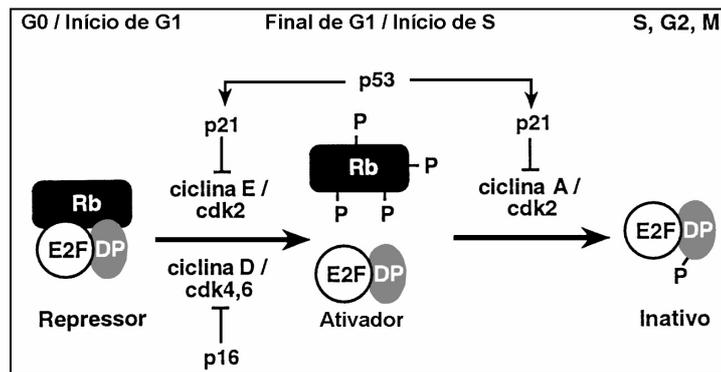


Figura 1.3. Regulação da atividade transcricional de E2F. Este fator, que possui uma subunidade de dimerização (DP), encontra-se inativo quando ligado com pRb que, ao ser fosforilado pela CDK4,6/ciclina D, se dissocia de E2F, que induz a expressão de ciclinas E e A. Como *feedback* positivo, a CDK2/ciclina E mantém a pRb fosforilada e, como *feedback* negativo, a CDK2/ciclina A inativa E2F. Em resposta às interferências com o ciclo celular, ocorre a ativação de p53, que é um fator de transcrição que induz a expressão da proteína p21. As proteínas p21 e p16 atuam como inibidores das CDK2 e CDK4,6, respectivamente (Adaptado de Johnson & Walker, 1999).

Quando ativo, E2F induz a expressão de proteínas envolvidas na replicação de DNA e na progressão da fase S, incluindo as ciclinas E e A, CDK1, Cdc25, DNA pol α , dihidrofolato redutase, e a timidina quinase citosólica (Johnson & Schneider-Broussard, 1998). A ciclina E, cuja expressão é induzida por E2F, em associação com CDK2 regula a progressão da fase G_1 para S (Ohtsubo *et al.*, 1995). Dessa forma, a disponibilidade de E2F ativo é garantida pelos complexos CDK2/ciclina E, que através de fosforilação mantém a pRb reprimida [Figura 1.3] (Johnson & Walker, 1999). A concentração da ciclina A, que também é regulada por E2F, aumenta na transição da fase G_1 para S, e permanece estável ao longo desta última. Esta ciclina se associa inicialmente com a CDK2 e, posteriormente com CDK1, na etapa tardia da fase S e durante G_2 , promovendo a entrada da célula na fase M. A ciclina A, quando associada à CDK2, ativa a iniciação da replicação através da fosforilação da DNA pol α , e quando ligada à CDK1, previne o excesso de replicação [Figura 1.4] (Vermeulen, Bockstaele, & Berneman, 2003).

Além disso, o fator E2F contém domínios que permitem a interação direta com a ciclina A. Isto permite que a CDK2 fosforile a subunidade DP de dimerização de E2F, inibindo assim a função deste fator. Por isso, enquanto a ciclina E regula positivamente a ação de E2F, a ciclina A regula negativamente [Figura 1.3] (Johnson & Walker, 1999).

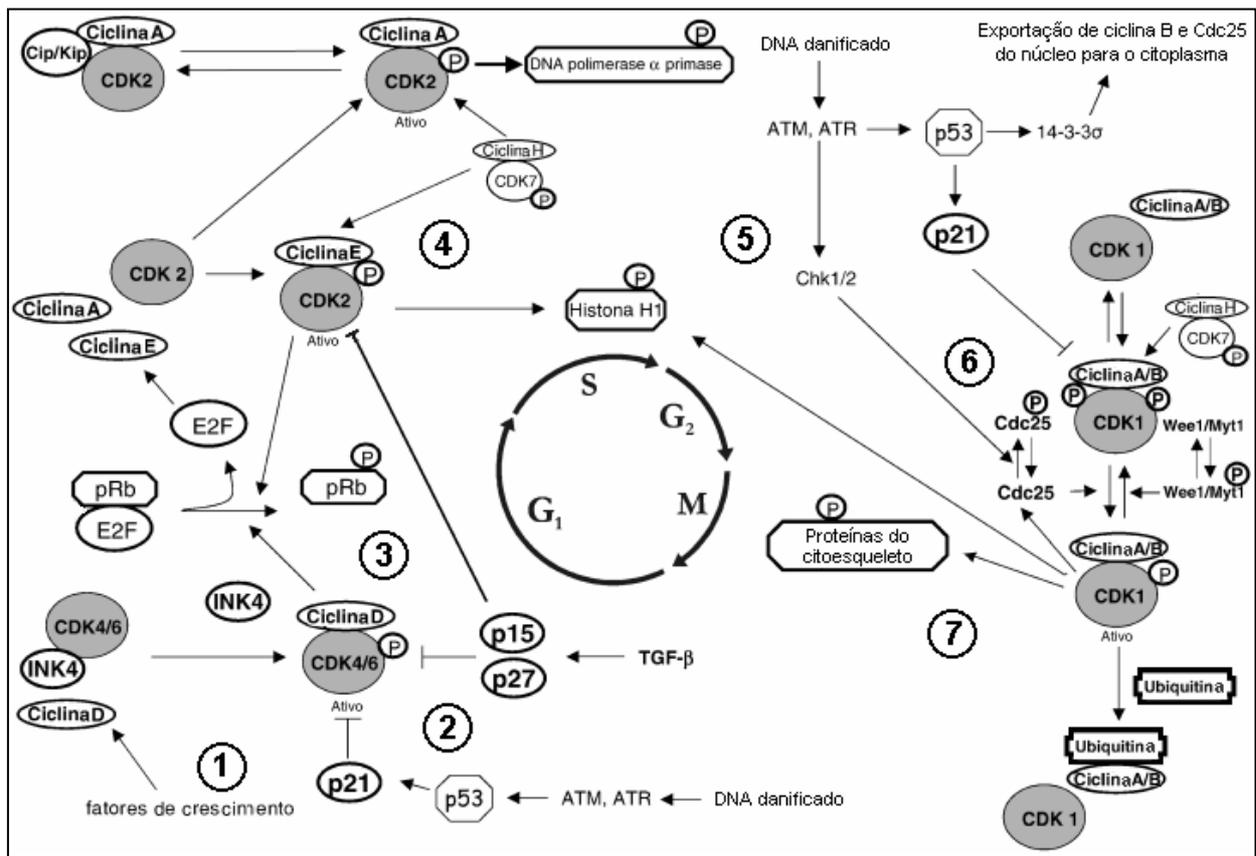


Figura 1.4. Esquema de algumas etapas da regulação do ciclo celular. (1) As primeiras etapas do ciclo são reguladas pelas CDK4/6, que são mantidas inativas pelos inibidores de CDK (ICK) da família INK4. A ativação destas quinases ocorre após ligação à ciclina D, cuja expressão é induzida por fatores de crescimento. (2) Em resposta às lesões no DNA, ocorre a ativação das quinases ATM (*Ataxia-telangietasia mutated*) e ATR (*AT Rad3-related*), que ativam o fator de transcrição p53, que bloqueia o ciclo celular ao induzir a expressão do ICK p21. O ciclo celular também pode ser bloqueado na fase G₁ em resposta ao TGF-β, que induz a expressão dos ICKs p15 e p27. (3) As CDK4,6/ciclina D ao fosforilarem pRb possibilitam a ativação do fator de transcrição E2F, que induz a transcrição das ciclinas E e A. (4) Os complexos CDK2/ciclinas A,E são ativados pela CDK7/ciclina H. Como *feedback* positivo, a CDK2/ciclina E mantém a pRb fosforilada. Este complexo ao fosforilar histonas H1 também permite o rearranjo da cromatina para a replicação, que tem início com a fosforilação da DNA pol α pela CDK2/ciclina A na fase S. (5) Durante a fase G₂, em resposta a possíveis lesões no DNA, as quinases ATM e ATR bloqueiam o ciclo conforme descrito anteriormente. Neste momento, p53 também induz a expressão da proteína 14-3-3σ, que interage com a fosfatase Cdc25 (ativadora de CDK1) e com a ciclina B, mantendo tais proteínas inativas no citoplasma. (6) As CDK1/ciclinas A,B também são mantidas inativas pelas quinases Wee1 e Myt1 e, indiretamente, pelas quinases Chk1/2 (*Checkpoint effector kinase*), que inativam Cdc25. (7) Durante a fase M, a CDK1/ciclina B fosforila proteínas do citoesqueleto, permitindo a segregação cromossomal e de organelas, sendo estes complexos posteriormente ubiquitinados e degradados. (P) Sítio fosforilado. (→: ativação; ⊥: inibição) (Adaptado de Vermeulen, Bockstaele, & Berneman, 2003).

Durante a fase G_2 ocorre a síntese de proteínas relacionadas com eventos da mitose e, principalmente, a verificação da integridade física e da fidelidade genômica. Em resposta a prováveis danos, os mecanismos de *checkpoint* retardam a progressão do ciclo celular para possibilitar o reparo do DNA antes da segregação cromossomal. A mitose é regulada, primariamente, pela CDK1 em associação com as ciclinas A, B1 e B2 (King, Jackson & Kirschner, 1994; Arellano & Moreno, 1997; Johnson & Walker, 1999). As proteínas que estes complexos CDK/ciclina fosforilam incluem proteínas do citoesqueleto e dos fusos mitóticos, controlando, dessa forma, eventos relacionados à redistribuição de organelas e ao preparo da segregação cromossomal [Figura 1.4].

O término da mitose é marcado, principalmente, pela inativação dos complexos CDK1/ciclinas B. A ação dessas enzimas impede o processo físico de divisão, gerando células com cromossomos segregados em pólos opostos e fusos mitóticos alongados. Dessa forma, a inativação de CDK1, através da degradação proteassomal da sua subunidade regulatória (ciclinas B1 e B2), é essencial para a decomposição dos fusos, citocinese e a transição para a fase G_1 subsequente (Irniger, 2002).

Em células de *Drosophila*, observou-se que o endereçamento das ciclinas B, para degradação proteassomal, se inicia por aquelas que estão nos centrossomos, e assim que o último cromossomo é alinhado nas células durante a metáfase, o processo progride ao longo dos fusos mitóticos, atingindo por último o citoplasma, denotando um processo bifásico de degradação das ciclinas B (Wakefield, Huang & Raff, 2000).

1.2. REPLICAÇÃO DO DNA CELULAR E MECANISMOS DE *CHECKPOINT*:

Para a duplicação do DNA celular, inicialmente a DNA pol α /primase se associa aos complexos de iniciação nas origens de replicação do DNA, realizando a síntese de pequenos trechos de RNA (cerca de 10 nucleotídeos), que são em seguida estendidos com a adição de 20 a 40 desoxirribonucleotídeos (Nickel *et al.*, 1992). Estes segmentos são então utilizados como *primers* pelas DNA pols δ e ϵ para o alongamento das fitas contínua e descontínua (Waga, Bauer & Stillman, 1994). A síntese descontínua do DNA se caracteriza por pequenos trechos de DNA, chamados fragmentos de Okazaki, que apresentam em média 200pb de comprimento. Em células de mamíferos, os eventos de iniciação ocorrem 4×10^4 vezes na fita contínua (aproximadamente o número de origens de replicação), enquanto tem de ser repetidos no início da síntese de cada fragmento de Okazaki (cerca de 2×10^7 vezes) (Hübscher, Maga & Spadari, 2002).

A substituição da DNA pol α pelas pols δ ou ϵ , que apresentam maior atividade catalítica, é dependente da síntese do segmento híbrido de RNA/DNA. A troca da DNA pol é catalisada por RFC (*Replication factor complex*), e inclui uma série de interações entre a DNA pol α , a DNA pol δ , o RFC, e a proteína RPA (*Replication protein A*), que reconhece DNA de fita-simples. Tanto a DNA pol α /primase quanto a DNA pol δ são perfeitamente adequadas para as suas respectivas funções: a DNA pol α /primase é capaz de iniciar a síntese *de novo*, enquanto a pol δ , através de sua interação com PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*), um fator de alongamento, possui a habilidade de sintetizar longos trechos de DNA (>1000 nucleotídeos) (Hübscher, Maga & Spadari, 2002).

Qualquer interferência com a função das DNA pols, que resulte no bloqueio das forquilhas de replicação, desencadeia mecanismos de *checkpoint* que retardam a fase S (Hübscher, Maga & Spadari, 2002). As vias de sinalização envolvidas nestes processos induzem uma série de eventos que convergem para a interrupção do ciclo celular e recrutamento de fatores que possibilitam o reparo das lesões no DNA ou, alternativamente, levam à apoptose (Fleck & Nielsen, 2004).

Através de técnicas de microscopia eletrônica, Sogo, Lopes & Foiani (2002) demonstraram que as forquilhas de replicação interrompidas, em decorrência do descompasso das atividades de DNA polimerase e helicase, contêm mais DNA de fita-simples do que as forquilhas normais e, por isso, representam parte do sinal para bloqueio do ciclo celular [Figura 1.5].

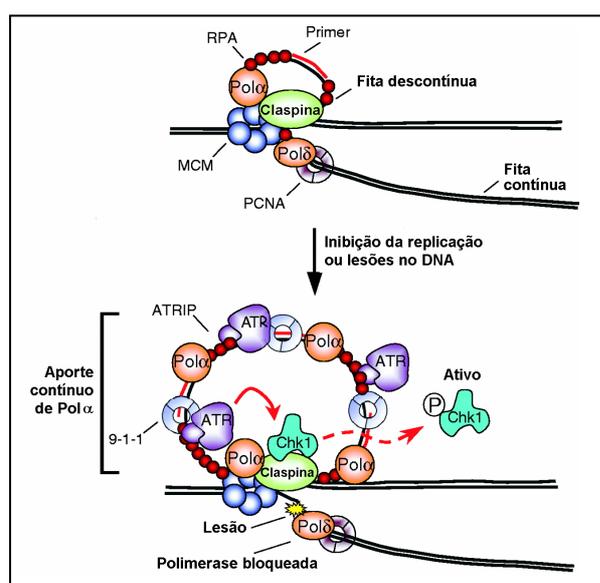


Figura 1.5. Esquema da ativação da resposta do *checkpoint* durante a replicação. Quando a DNA pol α encontra uma lesão (mostrada aqui na fita líder), esta enzima tem sua cinética reduzida, enquanto a helicase MCM (*Minichromosome maintenance*) continua separando a dupla-hélice. Isto leva ao aumento da freqüência de trechos de DNA de fita-simples nas forquilhas de replicação, e ao recrutamento de RPA (*Replication protein A*). A quinase ATR e os complexos 9-1-1 são atraídos para tais regiões, onde desencadeiam a ativação da quinase Chk1 (Adaptado de O'Connell & Cimprich, 2005).

Como resultado da interferência com a replicação, quatro processos capazes de interromper o ciclo celular são desencadeados: (i) bloqueio da ativação das origens de replicação, que requer a inibição da atividade do complexo de iniciação da replicação e/ou dos complexos CDK2/ciclina A ou E; (ii) redução da velocidade do processo de alongamento do DNA, que é mediada pelo próprio complexo de replicação ao reduzir sua atividade catalítica após encontrar uma lesão no DNA que, provavelmente, atua como um bloqueio físico para o avanço da forquilha de replicação; (iii) mecanismos de *checkpoint*, que estabilizam as forquilhas de replicação bloqueadas, caso contrário, as forquilhas se desestabilizam e o ciclo progride para a mitose apesar dos erros no genoma, e (iv) inibição da mitose, em que a transição da fase S para a fase G₂ é bloqueada em razão da fosfatase Cdc25A (responsável pela ativação dos complexos CDK2/ciclina A) ser mantida inativa (Nyberg *et al.*, 2002).

Por outro lado, um dos modelos do *checkpoint* da fase G₂ sugere que os trechos de DNA de fita-simples formados na fase S pelo bloqueio das forquilhas de replicação desencadeiam a ativação desta via de sinalização. Através de ensaios com extrato de ovos de *Xenopus spp.*, foi demonstrado que há um acúmulo de RPA na cromatina após a sua exposição a diferentes tratamentos genotóxicos, sugerindo a formação de DNA de fita-simples. Dessa forma, a RPA é capaz de sinalizar lesões durante as respostas de *checkpoint* na fase G₂, independentemente da replicação, sugerindo que este seja um sinal crucial para a ativação do *checkpoint* na fase G₂ [Figura 1.6] (O'Connell & Cimprich, 2005).

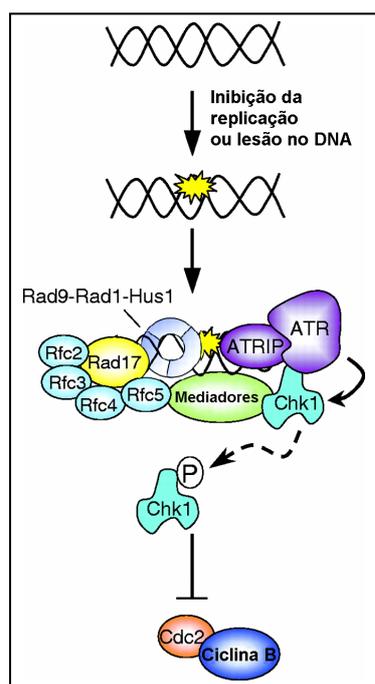


Figura 1.6. Mecanismo de *checkpoint* da fase G₂. Em resposta ao DNA danificado, ou aos agentes que bloqueiam a replicação, os complexos de *checkpoint*, que consistem de (1) Rad17 e RFC2-5, (2) Rad9, Rad1 e Hus1 (9-1-1), e (3) ATR-ATRIP, são recrutados para os sítios de lesão no DNA. A quinase ATR, em associação com os demais mediadores, ativa a quinase Chk1 (*C*heckpoint *e*ffector *k*inase), que bloqueia a ativação de Cdc2/ciclina B e, por isso, impossibilita a entrada das células na fase M (Adaptado de O'Connell & Cimprich, 2005).

Uma vez que o AZT interfere com a síntese de DNA, é provável que esta droga também interfira com a progressão do ciclo de divisão celular e, indiretamente, altere a expressão gênica e o funcionamento de diferentes processos fisiológicos. Weidner & Sommadossi (1990) demonstraram que o AZT não interfere significativamente com a síntese total de RNA, nem com a síntese de proteínas, na linhagem humana de células leucêmicas K-562. Contudo, a expressão e síntese de isoformas distintas de globinas, após sua indução por ácido butírico, foram afetadas por doses de AZT variando de 25 a 250 μ M. Em contrapartida, Heagy *et al.*, (1991) mostraram que células mononucleares de sangue periférico, ativadas com lectinas, exibem quantidades reduzidas de proteína e de RNA total após tratamento com altas doses de AZT, num perfil semelhante ao de células em G₀, denotando interferência com a síntese destes componentes. De acordo com as especulações de Weidner & Sommadossi (1990), o AZT interfere com a expressão de genes indutíveis, enquanto a transcrição de genes constitutivos não sofre alterações significativas.

Dessa forma, para avaliar o metabolismo basal de células tratadas com AZT, principalmente em consideração à síntese de mRNA e de proteínas, utilizamos os vírus da influenza A como ferramentas moleculares. A síntese dos componentes codificados pelo genoma destes vírus nas células infectadas requer a integridade de diferentes funções, tais como: síntese de mRNAs celulares, síntese de proteínas, processos de glicosilação, controle de qualidade e clivagem pós-traducional pertinentes ao complexo de Golgi, e transporte de proteínas para os diferentes compartimentos celulares.

1.3. BIOSÍNTESE DOS VÍRUS DA INFLUENZA A POR CÉLULAS INFECTADAS

Os vírus da influenza A estão classificados na família *Orthomyxoviridae* e seus virions têm o genoma composto por, no mínimo, oito diferentes segmentos de RNA (ácido ribonucléico) de polaridade negativa, recobertos, separadamente, por nucleoproteínas (NP). Cada segmento está ligado a uma RNA polimerase-RNA dependente (RpRd) composto pelas proteínas PA (proteína ácida), PB1 (proteína básica 1) e PB2 (proteína básica 2), que estão relacionadas com as atividades de amplificação e transcrição dos RNAs virais (Martin & Helenius, 1991). Essa RpRd interage, simultaneamente, com os terminais 3' e 5' do RNA genômico viral (Flint *et al.*, 2000). Essas ribonucleoproteínas (RNPs), formadas por RNA + NP + complexo pol, estão ligadas a monômeros da proteína matriz 1 (M1) e, em menor quantidade, à

proteína de exportação nuclear (NEP), que interage com a proteína M1 e, provavelmente, com outros componentes das RNPs (O’Neil, Talon & Palese, 1998). A proteína M1 também se associa aos homotrímeros de hemaglutinina (HA) e substitui o folheto interno do envelope viral (Fujiyoshi *et al.*, 1994). Isso permite a associação do genoma viral aos componentes de membrana. No envelope desses vírus também estão inseridos, em menor quantidade, homotetrâmeros das proteínas matriz 2 (M2) e neuraminidase (NA) (Martin & Helenius, 1991). A primeira constitui um canal iônico dependente de pH ácido (Henkel & Weisz, 1998), enquanto a segunda é uma enzima que hidrolisa a ligação entre o resíduo de ácido siálico e o resíduo de açúcar adjacente (galactose/galactosamina) (Liu *et al.*, 1995) [Figura 1.7].

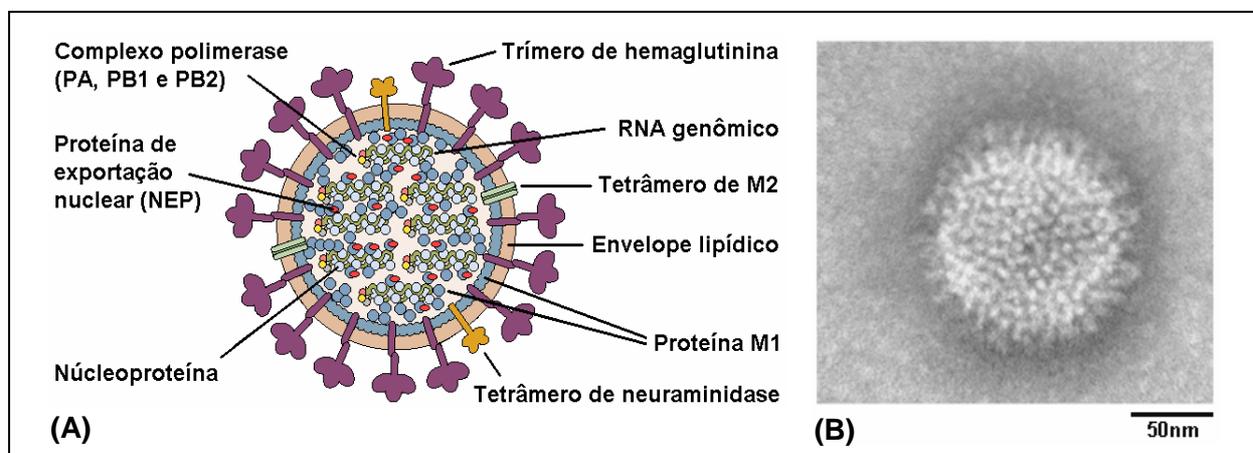


Figura 1.7. (A) Esquema estrutural (Adaptado de Flint *et al.*, 2000) e (B) Micrografia eletrônica da partícula de vírus da influenza A (Whittaker, 2001).

Com relação ao processo infeccioso, a adsorção dessas partículas virais às membranas celulares é mediada pela HA (Plotch *et al.*, 1999). Os monômeros dessa proteína são compostos de dois polipeptídeos, unidos por ligações dissulfeto (HA₁ e HA₂), gerados a partir da clivagem da proteína HA₀ (Helenius *et al.*, 1987). As espículas de HA apresentam-se em grande número de cópias no envelope viral, e a ligação destas estruturas aos resíduos de ácido siálico do glicocálice celular estabelece uma estrutura em *zipper*. Este processo gera um endossoma, sem a participação de clatrin, que possibilita a auto-internalização da partícula pela célula (Sieczkarski & Whittaker 2002; Lakadamyali, Rust & Zhuang, 2004) [Figura 1.8, etapa 1].

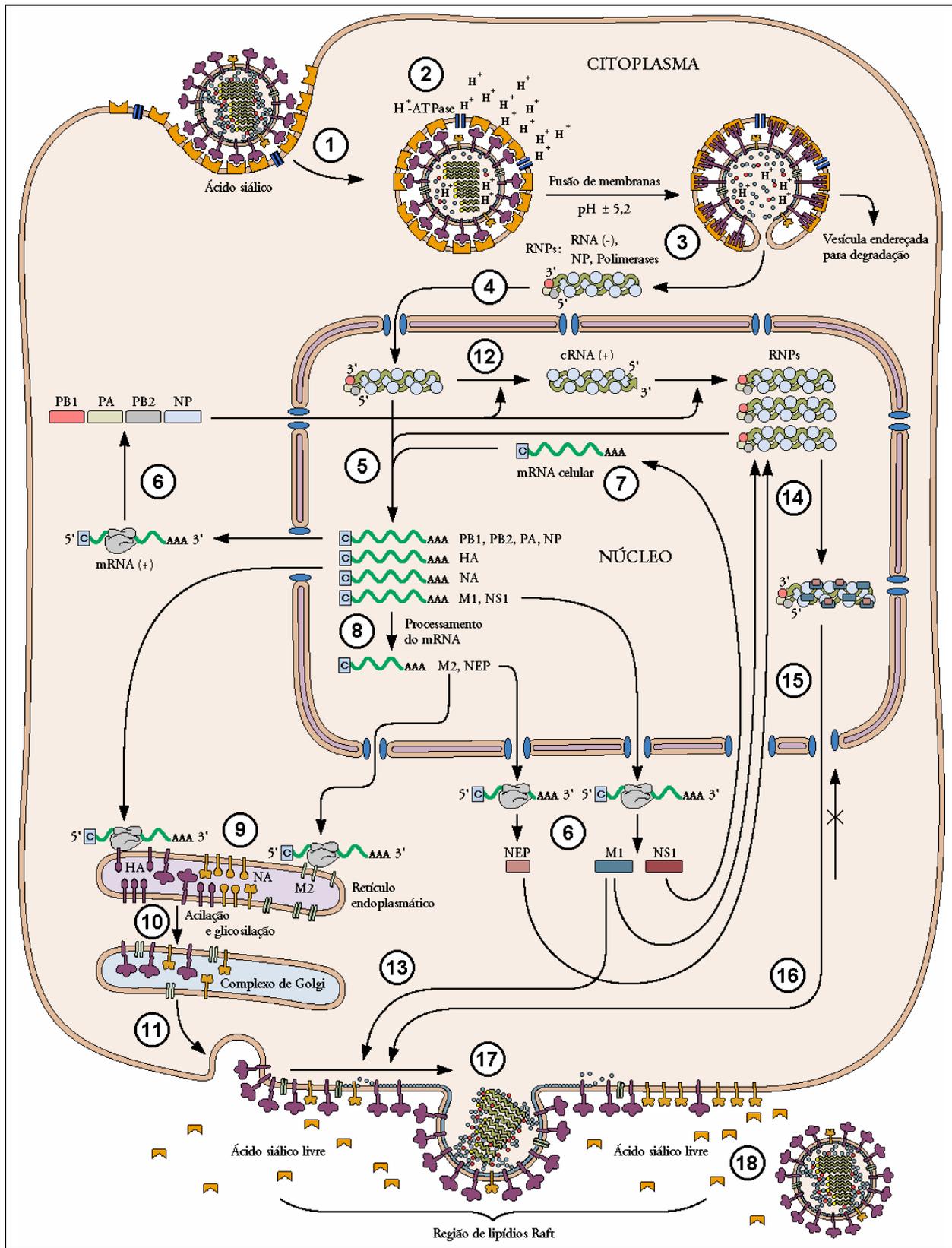


Figura 1.8. Modelo esquemático da infecção de células por vírus da influenza A (Espíndola, 2003).

O interior desse endossoma é gradualmente acidificado, por próton-ATPases celulares, durante a internalização e direcionamento desta vesícula para a região de lisossomas secundários. Esta acidificação ativa o canal formado pela proteína M2, que promove o transporte passivo de prótons para o interior da partícula viral (Henkel & Weisz, 1998). A redução de pH no interior do virion propicia a dissociação entre as proteínas M1 e as RNPs, o que constitui uma importante etapa, já que os complexos RNP-M1 não são translocados para o interior do núcleo pela falta de exposição dos sinais de localização nuclear (NLS) (Martin & Helenius, 1991) [Figura 1.8, etapa 2].

O ambiente de pH ácido ($\text{pH } 5,4 \pm 0,2$), criado no interior do endossoma, desencadeia um rearranjo conformacional, irreversível, da espícula HA, que expõe o domínio hidrofóbico amino-terminal da subunidade HA₂. A inserção desse peptídeo na membrana do endossoma possibilita a sua fusão com o envelope viral, levando à transferência das RNPs para o citoplasma (Guinea & Carrasco, 1995; Plotch *et al.*, 1999) [Figura 1.8, etapa 3]. Estas RNPs apresentam sinais carioplílicos em quatro de seus componentes (NP, PA, PB1, PB2), sendo por isso translocadas para o interior do núcleo (O'Neil *et al.*, 1995) [Figura 1.8, etapa 4].

O processo de transcrição do genoma viral tem início com a ativação da RpRd, que ocorre através da interação do terminal 5' do RNA genômico ao sítio de ligação 5' presente na subunidade PB1. Provavelmente, a fita-molde de RNA atua como um modulador alostérico, e provoca uma mudança conformacional da forma inativa da RpRd, tornando-a ativa. Isso possibilita que a subunidade PB2 se ligue ao *cap* (m⁷GpppNm) de mRNAs celulares, o que pode ocorrer antes ou depois da interação do terminal 3' do RNA genômico com o sítio de ligação 3' presente na subunidade PB1 da RpRd. Essa interação é pré-requisito para a clivagem do *cap* pela PB2 através de sua ação endonucleásica (Cianci, Tiley & Krystal, 1995) [Figura 1.8, etapa 5; Figura 1.9].

Os oligonucleotídeos resultantes da clivagem dos mRNAs celulares apresentam entre 10 e 13 bases, a partir do *cap*, e atuam como *primers* para a síntese de mRNA pela subunidade PB1 (Cianci, Tiley & Krystal, 1995) [Figura 1.10]. Por outro lado, a RpRd não cliva o *cap* de mRNAs virais por reconhecer, na extremidade 5', a seqüência 5'-AGCGAAAGCAGG-3' subsequente ao segmento proveniente de mRNA celulares [Figura 1.11]. Durante a transcrição, a fita-molde se desloca pelo interior da RpRd, enquanto o terminal 5' permanece associado à subunidade PB1 (Flint *et al.*, 2000) [Figura 1.9]. Essa associação interrompe a transcrição em um sítio compreendido entre o 15º e o 22º nucleotídeo a partir da extremidade 5' da fita-molde de RNA [Figura 1.11]. Nesse ponto, a RpRd poliadenila os mRNAs virais através de transcrições repetidas da

seqüência adjacente de 5-7 uracilas, sendo o processo finalizado após a adição de 150 a 200 adenosinas (Biswas, Boutz & Nayak, 1998; Pritlove *et al.*, 1998) [Figura 1.9].

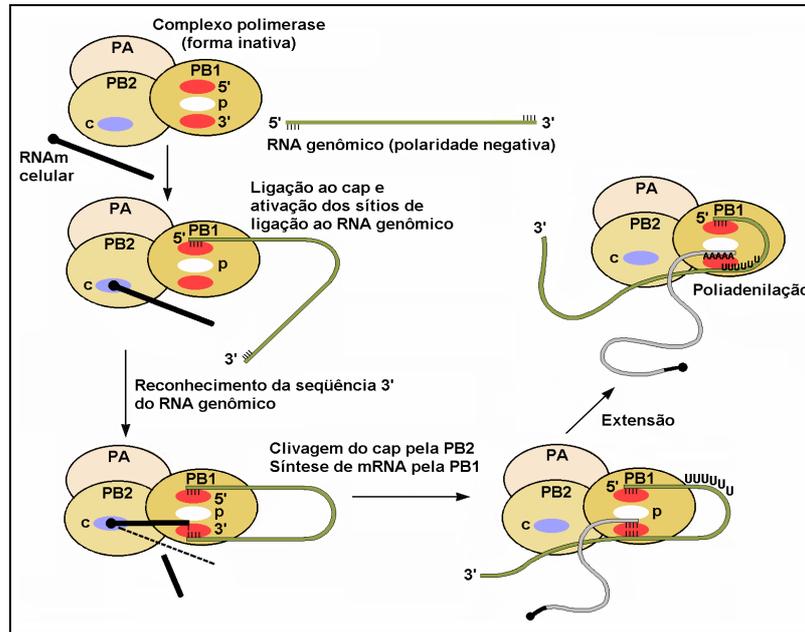


Figura 1.9. Síntese de mRNA pela polimerase dos vírus da influenza A (Adaptado de Flint *et al.*, 2000).

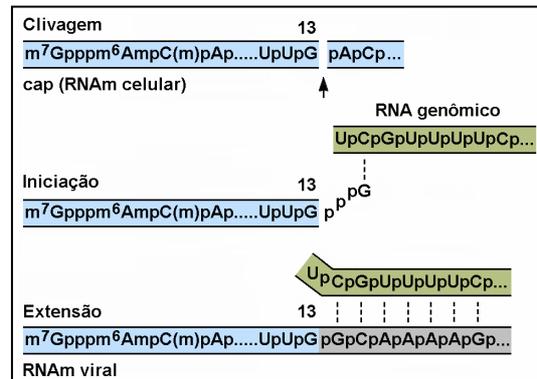


Figura 1.10. Processos de clivagem do *cap* de mRNAs celulares, de iniciação da síntese e de extensão da molécula de mRNA viral pela RNA polimerase-RNA dependente (Adaptado de Flint *et al.*, 2000).

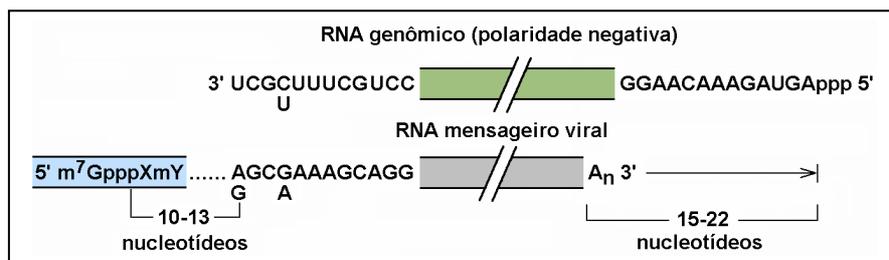


Figura 1.11. Apresentação das seqüências conservadas dos RNAs genômicos dos vírus da influenza A e seus respectivos mensageiros (Adaptado de Flint *et al.*, 2000).

A tradução dos mRNAs virais gera nove proteínas estruturais e uma não-estrutural que, de acordo com os sinais de endereçamento, são transportadas para locais específicos da célula. As proteínas estruturais NP, PA, PB1, PB2, M1, NEP e a proteína não-estrutural 1 (NS1) são sintetizadas por ribossomos livres no citoplasma e direcionadas para o núcleo, devido à presença de sinais cariofílicos em suas estruturas primárias (Flint *et al.*, 2000) [Figura 1.8, etapa 6].

A proteína NS1 regula alguns dos eventos relacionados ao processamento e à tradução de mRNAs celulares (Chen, Li & Krug, 1999; Salvatore *et al.*, 2002). Estruturalmente, essa proteína possui dois domínios funcionais: um com afinidade por RNA (Lu *et al.*, 1995) e outro que interage com proteínas nucleares, sendo por isso denominado domínio efetor (Chen, Li & Krug, 1999) [Figura 1.12].

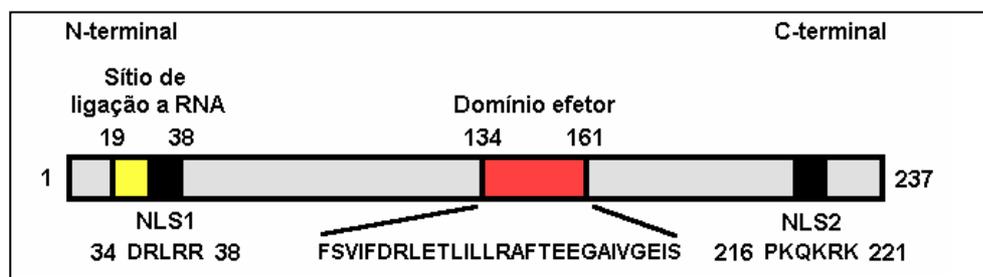


Figura 1.12. Representação da estrutura primária da proteína NS1. Detalhes das regiões onde estão posicionados o sítio de ligação aos RNAs e o domínio efetor (Adaptado de Li, Yamakita & Krug, 1998).

O domínio de ligação ao RNA pode interagir com a cauda poli(A) de mRNA, com estruturas presentes em RNA de dupla fita (RNA_{df}) e com o U6 snRNA (Lu *et al.*, 1995). Qiu, Nemeroff & Krug (1995) demonstraram que a ligação da proteína NS1 ao U6 snRNA inibe as interações desse fator com os outros componentes do complexo de *splicing*, U2 e U4 snRNA, provocando uma redução da edição de pré-mRNA.

A proteína NS1 também interfere com processos de clivagem e poliadenilação de pré-mRNAs celulares, através da interação do seu domínio efetor com a PAB II (*poli(A) binding-protein II*) e com o CPSF (*cleavage/polyadenylation specificity factor*) (Chen, Li & Krug, 1999). O CPSF é composto por quatro subunidades protéicas (160, 100, 73 e 30kDa) e faz parte do complexo de processamento do terminal 3' de pré-mRNA. A sua subunidade de 160kDa reconhece a seqüência AAUAAA, e sinaliza para outros componentes do complexo (CstF, *cleavage specificity factor*, CF I e II, *cleavage factors I e II*) que, então, realizam a clivagem do pré-mRNA. Após esse evento, a poliadenilato pol (PAP) catalisa, inicialmente, a adição de 10-12 resíduos de adenina ao terminal clivado. Entretanto, para que a extensão do poli(A) continue, é necessária a

participação da PAB II (Wahle & Keller, 1996). Dessa forma, a ligação da NS1 à subunidade de 30kDa do CPSF interfere com a clivagem de pré-mRNAs celulares. Contudo, essa inibição é apenas parcial, provavelmente, devido à proteína de 30kDa do CPSF não se mostrar essencial ao fenômeno. Porém, quando a NS1 se liga à PAB II, o grau de inibição da poliadenilação de pré-mRNAs celulares aumenta, quer seja por falta de extensão do poli(A), ou por falta de clivagem do terminal 3' [Figura 1.13]. Como consequência, ocorre o acúmulo de pré-mRNAs celulares no núcleo, aumentando a quantidade de *cap* disponível para a síntese de mRNAs virais pelos componentes da RpRd (Chen, Li & Krug, 1999) [Figura 1.8, etapa 7].

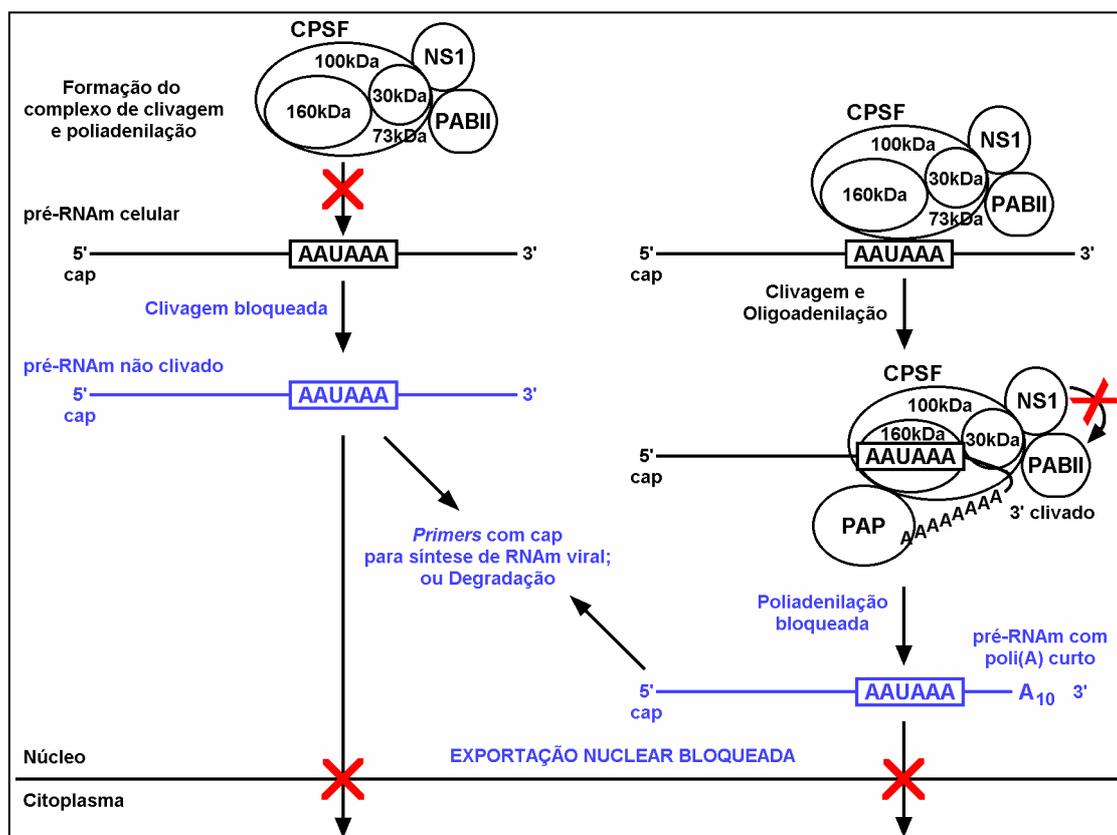


Figura 1.13. Inibição da clivagem e da poliadenilação de mRNAs celulares, quando da interação da proteína NS1 com os componentes CPSF e PAB II (Adaptado de Chen, Li & Krug, 1999).

Outra função atribuída à NS1 é a de controlar etapas pós-transcricionais relacionadas à proteína quinase ativada por RNAdf (PKR). Lu *et al.* (1995) demonstraram que, *in vitro*, quando ocorre a ligação da NS1 ao RNAdf, a ativação da PKR é bloqueada. Essa inibição também foi observada, *in vivo*, por Salvatore *et al.* (2002) ao infectarem culturas de células, deficientes ou não do sistema interferon, com amostras de vírus da influenza A, cujo segmento genômico 8 foi deletado ou truncado na região codificante restrita à proteína NS1.

Fisiologicamente, a PKR encontra-se inativa sob a forma monomérica. Quando duas ou mais moléculas inativas dessa enzima ligam-se a uma molécula de RNAdf, ocorre a ativação das mesmas por um processo de interfosforilação. Essa fosforilação provoca uma mudança conformacional no domínio catalítico da PKR, o que permite a fosforilação de outros substratos, dentre eles, a subunidade α do eIF2 (fator eucarionte de iniciação da tradução dois) que, quando fosforilada, impossibilita a reciclagem deste fator (Flint *et al.*, 2000; García-Sastre, 2001).

No processo de tradução, o eIF2 interage com uma molécula de GTP e outra de RNA transportador da metionina. A sua junção aos demais fatores de iniciação e à subunidade ribossomal 40S forma o chamado complexo de iniciação 43S. Quando esse complexo reconhece o 1º códon para a metionina, a energia resultante da quebra do GTP associado ao eIF2 promove a liberação do complexo de iniciação, possibilitando a montagem da unidade ribossomal 80S (Flint *et al.*, 2000).

A reciclagem do eIF2-GDP é realizada quando o eIF2B substitui a molécula de GDP por uma de GTP. Porém, quando a subunidade α do eIF2 está fosforilada (eIF2^P), essa troca não ocorre, pois os fatores eIF2B e eIF2^P-GDP passam a constituir um complexo estável. Como consequência, é gerada uma redução na quantidade de eIF2 renovado que, por sua vez, resulta num decréscimo do nível de síntese protéica (Flint *et al.*, 2000).

Por outro lado, a PKR ativa pode fosforilar outros componentes celulares. Quando o substrato é a subunidade β do complexo IKK (I κ B quinase), esta enzima é ativada e passa a fosforilar o I κ B (inibidor de NF- κ B), que é o responsável por manter o fator nuclear κ B (NF- κ B) no citoplasma. Depois de fosforilado o I κ B é degradado, enquanto o NF- κ B é translocado para o núcleo, onde estimula a expressão de genes, cujos promotores sejam por ele reconhecidos. Nesse grupo de genes, encontram-se aqueles que codificam para os interferons (IFN) α e β (Wang *et al.*, 2000). Embora o nível de síntese protéica nas células com PKR ativa esteja reduzido, esse bloqueio não é total. Dessa forma, a síntese de IFN e outras proteínas relacionadas com a ativação por NF- κ B ainda é possível [Figura 1.14]. Contudo, alguns desses produtos, tais como a RNase L e a 2'-5'oligoadenilato sintetase, promovem a degradação de mRNA, o que resulta numa redução ainda mais intensa da síntese protéica (García-Sastre, 2001).

Como demonstrado por Zürcher, Marión & Ortín (2000), nas células infectadas por vírus da influenza A, a PKR é mantida inativa, o que assegura a síntese protéica. Todavia, observa-se o predomínio da produção de componentes virais em detrimento daqueles codificados pela célula. Esse fenômeno deve-se à clivagem do *cap* dos pré-

mRNAs celulares, no núcleo, promovida pela RpRd viral. Dessa forma, em células infectadas, a expressão da NS1 contribui para que as proteínas codificadas pelo genoma viral sejam sintetizadas em altas concentrações.

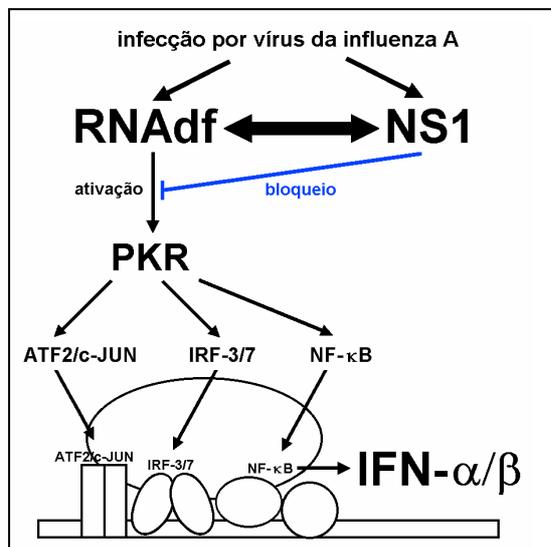


Figura 1.14. Esquema da ligação da NS1 ao RNAdf e conseqüente bloqueio da ativação da PKR. Fisiologicamente, a ação dessa quinase contribui para a ativação do NF-κB que, uma vez no núcleo, aumenta a expressão de IFN e de outros genes. Nas células infectadas por vírus da influenza A, a PKR é mantida inativa e, por conseqüente, não há ativação do NF-κB. Logo, a transcrição dos genes de IFN não é estimulada (Adaptado de Wang *et al.*, 2000).

Embora a proteína NS1 interaja com o U6 snRNA, inibindo o *splicing* de pré-mRNAs celulares (Qiu, Nemeroff & Krug, 1995), os genes virais 7 e 8, que codificam para as proteínas NS1 e M1, respectivamente, em momentos tardios da infecção, têm seus transcritos primários processados. Este processo ocorre por um mecanismo alternativo de *splicing*, que gera mRNAs para as proteínas NEP e M2 (Plotch & Krug, 1986; Valcárcel, Portela & Ortín, 1991; Shih & Krug, 1996) [Figura 1.8, etapa 8].

A síntese das proteínas HA, NA e M2 é realizada por ribossomos associados ao retículo endoplasmático, em que, co-traducionalmente, apenas os monômeros de HA e NA são adicionados de oligossacarídeos. Ainda no retículo, os componentes NA e M2 sofrem homo-tetramerização, mantida por pontes dissulfeto, enquanto os monômeros de HA formam homotrímeros através de pontes de hidrogênio [Figura 1.8, etapa 9]. Posteriormente, essas proteínas são transportadas em vesículas para o complexo de Golgi (Helenius *et al.*, 1987; Saito, Taylor & Webster, 1995; Henkel & Weisz, 1998). No compartimento *trans*-Golgi, o ambiente de pH ácido ($\text{pH } 6,17 \pm 0,02$) (Seksek, Biwersi & Verkman, 1995) provoca a abertura do canal formado pela M2. A conseqüente saída de prótons do lúmen dessa organela, para o ambiente citoplasmático, provoca um aumento do seu pH até atingir o equilíbrio iônico. Se por um lado esse fenômeno torna lento o fluxo protéico ao longo da via exocítica (Henkel & Weisz, 1998), por outro, permite que os trímeros de HA sejam transportados, através do complexo de Golgi,

sem que sofram a alteração conformacional mediada por pH ácido (Takeda *et al.*, 2002). Após acilação e maturação glicosídica (Helenius *et al.*, 1987; Saito, Taylor & Webster, 1995; Henkel & Weisz, 1998) [Figura 1.8, etapa 10], essas proteínas são transportadas através de vesículas para uma região da membrana plasmática rica em colesterol. Esses lipídios, que quando agregados estruturam-se em forma de canoa, formam a chamada região de lipídios *raft* (Barman *et al.*, 2001) [Figura 1.8, etapa 11].

No que tange à clivagem da proteína HA₀, para formação das subunidades HA₁ e HA₂, este fenômeno pode ser executado por proteases celulares presentes no compartimento *trans*-Golgi (Flint *et al.*, 2000) [Figura 1.15].

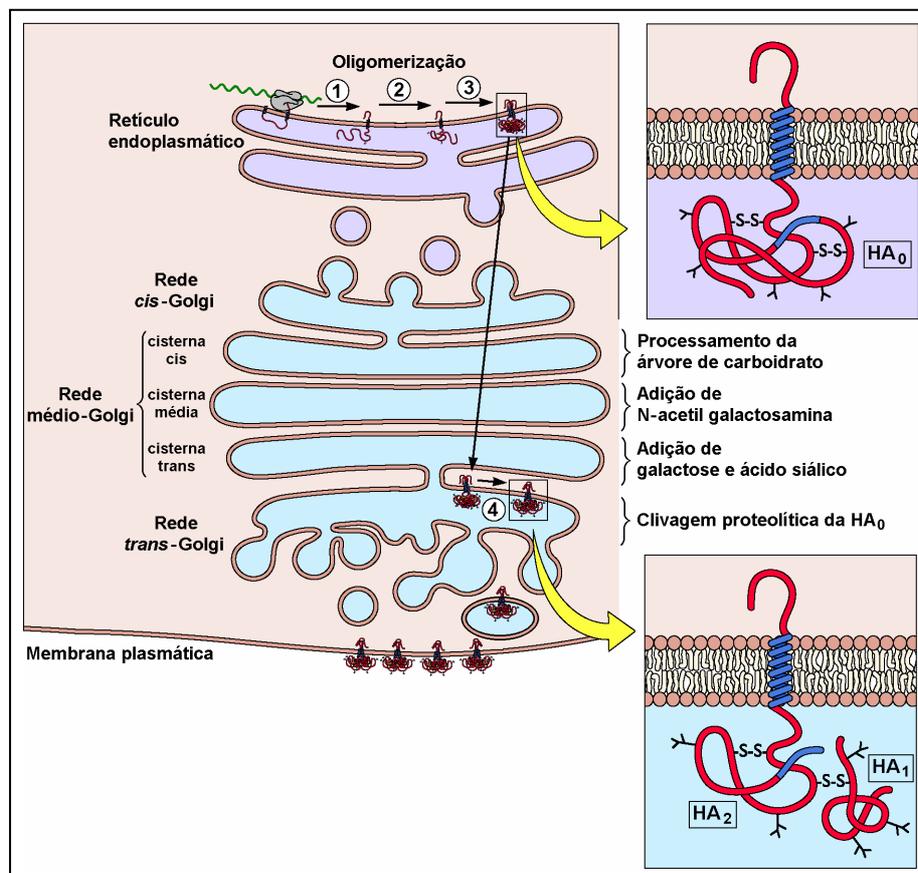


Figura 1.15. Síntese, processamento e endereçamento da proteína hemaglutinina (HA) para a membrana plasmática. (1) Clivagem do peptídeo sinal; (2) Formação das ligações dissulfeto; (3) Trimerização; (4) Clivagem proteolítica da espícula HA₀, formando as subunidades HA₁ e HA₂. Os quadros à direita mostram, em detalhes, a estrutura dos monômeros de HA antes e após a clivagem. As regiões em azul representam domínios hidrofóbicos da proteína (Adaptado de Flint *et al.*, 2000).

Nas células em que os trímeros de HA são inseridos na membrana plasmática sob a forma HA₀, a clivagem pode ser executada por proteases, do tipo tripsina, adicionadas ao meio de cultivo celular (Klenk *et al.*, 1975). Da mesma forma, quando

este fenômeno ocorre *in vivo*, nas células infectadas do trato respiratório, a clivagem das proteínas HA₀ pode ser executada por proteases normalmente secretadas pelos elementos da microbiota local (Tashiro *et al.*, 1987).

A conformação funcional dos monômeros de HA somente é adquirida após a clivagem, processo este que libera a extremidade hidrofóbica amino-terminal da subunidade HA₂ que, espontaneamente, oculta-se do ambiente hidrofílico [Figura 1.15]. Por isso, quando as espículas de HA, constituídas de moléculas clivadas, são submetidas a ambiente ácido (pH 5,4 ± 0,2), sofrem um rearranjo conformacional e expõem o peptídeo hidrofóbico da porção HA₂, que promove o processo de fusão entre as membranas viral e celular. Dessa forma, apenas partículas virais que contenham espículas de HA clivadas apresentam potencial infeccioso (Helenius *et al.*, 1987).

Nas células infectadas pelos vírus da influenza A, as proteínas NP e M1 recém-sintetizadas, inicialmente, interagem com os elementos do citoesqueleto. Após acúmulo progressivo no citoplasma, o excesso dessas proteínas é translocado para o núcleo (Avalos, Yu & Nayak, 1997). Nesse compartimento, a NP liga-se ao complexo pol, desencadeando a produção das fitas de RNA complementar (cRNA), que servirão de molde para a síntese de novas moléculas de RNA genômico [Figura 1.8, etapa 12]. A síntese de cRNA ocorre em razão da NP funcionar como helicase sobre a extremidade 5' do RNA genômico que, durante o processo de transcrição, é liberada da RpRd. Com isso, a fita-molde pode ser transcrita por completo, pois o sinal para poliadenilação é ignorado (Cianci, Tiley & Krystal, 1995; Biswas, Boutz & Nayak, 1998).

Em relação aos monômeros da proteína M1, estes são direcionados tanto para o núcleo, quanto para a membrana plasmática, sugerindo a existência de dois sinais de endereçamento diferentes, exibidos em momentos distintos do processo infeccioso. Enquanto essa proteína interage com as espículas de HA, substituindo o folheto interno da membrana plasmática [Figura 1.8, etapa 13], no núcleo ocorre a sua ligação às unidades de NP presentes nas RNP neo-formadas, constituindo uma ponte de ligação para a NEP [Figura 1.8, etapa 14]. Ao interagir com a proteína M1, a NEP expõe o seu sinal de exportação nuclear que, quando reconhecido pelas nucleoporinas, faz com que os complexos RNP-M1-NEP sejam transferidos para o citoplasma (O'Neil, Talon & Palese, 1998) [Figura 1.8, etapa 15]. Em seguida, esses complexos genômicos são transportados para a membrana plasmática, através das interações da M1 com os elementos do citoesqueleto (Avalos, Yu & Nayak, 1997) [Figura 1.8, etapa 16]. Quando atingem a região de lipídios *raft* da membrana plasmática, inicia-se o processo de montagem (Barman *et al.*, 2001) que, impulsionado

pelas interações promovidas pelas proteínas M1 (M1-M1 e M1-HA), desencadeia o brotamento das novas partículas virais (Pattnaik, Brown & Nayak, 1986; Gómez-Puertas *et al.*, 2000) [Figura 1.8, etapa 17].

Durante a infecção, a neuraminidase atuando na luz do complexo de Golgi dessialisa glicolipídeos e glicoproteínas destinadas à superfície celular, possibilitando assim que as partículas virais sejam liberadas da célula após o brotamento. Sem esta atividade sialidásica ocorre a formação de agregados virais, resultantes da ligação das partículas neo-formadas com os elementos sializados da membrana plasmática. Por isso, a ação dessa enzima é imprescindível, para a expansão da virose, pois garante a disseminação das partículas virais (Liu *et al.*, 1995) [Figura 1.8, etapa 18].

1.4. SÍNTESE DE TIMIDINA: VIAS *DE NOVO* E *SALVAGE*

Conforme descrito, anteriormente, a timidina quinase citosólica (TK1), que atua na via *salvage* de síntese da timidina, e a dihidrofolato redutase, que atua na via *de novo* de síntese deste nucleosídeo (Nelson & Cox, 2000), são expressas apenas na fase S do ciclo celular. Em contrapartida, as mitocôndrias apresentam atividade de timidina quinase durante todo o ciclo de divisão celular, sendo esta função exercida pela TK2 (Eriksson *et al.*, 2002). Entretanto, as reservas mitocondriais de dTTP provenientes da via *salvage* derivam principalmente do citosol, havendo por isso pouca contribuição da função de TK2. Por outro lado, nas células que estão fora da fase S, ou em células deficientes em TK1, todas as reservas celulares de dTTP são oriundas da mitocôndria, como consequência da fosforilação da timidina pela TK2 (Pontarin *et al.*, 2003).

Em contraste com a síntese de dTMP pela via *salvage*, em que a timidina é inicialmente fosforilada pela TK1, ou pela TK2, a síntese *de novo* dispensa a atividade destas enzimas. Na síntese *de novo*, a desaminação de dCMP produz o desoxiuridilato (dUMP), sendo esta molécula um precursor imediato de dTMP [Figura 1.16]. Contudo, as vias *de novo* e *salvage* de síntese da dTMP se convergem em etapas posteriores, sendo este nucleosídeo fosforilado até dTTP, seqüencialmente, pela timidilato quinase e pela pirimidina-nucleosídeo-difosfato quinase (Nelson & Cox, 2000).

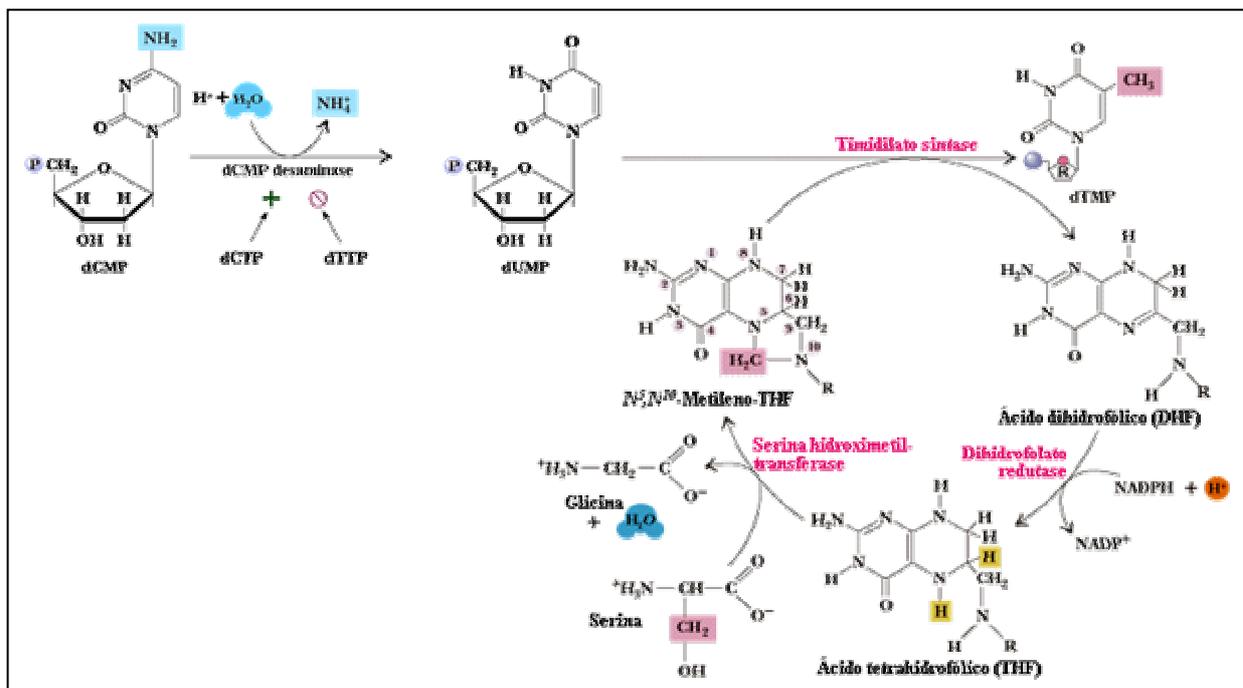


Figura 1.16. Síntese da timidina através da via *de novo*. Após a desaminação de dCMP, pela dCMP desaminase, produzindo dUMP, a timidilato sintase transfere um radical metila ($-\text{CH}_3$) do $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -metileno-tetrahidrofolato para a uracila, convertendo o dUMP em dTMP. O ácido dihidrofólico (DHF) produzido nesta reação é convertido em ácido tetrahidrofólico (THF), pela enzima dihidrofolato redutase, sendo posteriormente adicionado de um grupamento $-\text{CH}_2$, proveniente de um resíduo de serina, numa reação catalisada pela serina hidroximetil-transferase, obtendo-se dessa forma o $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -metileno-THF (Adaptado de Garrett & Grisham, 1999).

De acordo com os resultados de Szondy & Newsholme (1990), pequenas doses de diferentes nucleobases, nucleosídeos e nucleotídeos (1 a $10\mu\text{M}$), principalmente de purinas, são capazes de aumentar a incorporação de timidina em linfócitos estimulados com fitohemaglutinina. Uma vez que a incorporação de timidina pode sofrer influência da composição do meio de cultura, já que é um processo estimulado por derivados de nucleotídeos, é provável que este processo também ocorra com o seu análogo AZT.

2. HIPÓTESE:

Uma vez que o AZT é um análogo nucleosídico da timidina, espera-se que, **SE** a incorporação de timidina no DNA pode ser estimulada por nucleobases, nucleosídeos e nucleotídeos, e que o AZT interfere com a síntese e reparo de DNA em eucariontes, **ENTÃO**, pode-se supor que a incorporação de AZT também é modulada de acordo com a composição do meio de cultura utilizado, e que esta droga é capaz de retardar o processo de divisão de células eucarióticas, retendo-as nos estágios de síntese de DNA (fase S), e de conferência da integridade genômica (fase G₂).

3. OBJETIVOS:

- Avaliar o efeito da 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT) na proliferação de células Vero;
- Analisar a influência da composição do meio de cultura, principalmente da presença de derivados nucleotídicos, sobre o efeito do AZT na proliferação de células Vero;
- Analisar as alterações no perfil do ciclo celular em culturas de células Vero tratadas com AZT;
- Avaliar a integridade metabólica das células tratadas com AZT, quanto ao potencial de biossíntese dos componentes necessários à produção dos vírus da influenza A.

4. MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1. Cultivo de células Vero:

As culturas de células Vero (linhagem de rim de macaco verde africano) utilizadas nos ensaios foram previamente diferenciadas. Para efeito de adaptação, uma das culturas foi mantida em meio mínimo essencial (MEM) com sais de Earle e a outra em meio 199 por, pelo menos, três passagens antes da utilização nos ensaios. Ambos os meios foram adicionados de 5% de soro fetal bovino (SFB) (v/v), 4mM de NaHCO₃ e 100UI/ml de penicilina. Após três dias de incubação a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, as células foram dispersas com solução de tripsina a 0,25% e EDTA a 0,1% e expandidas na proporção de 1:4 (ATCC, 2005). Contudo, um dia antes dos ensaios, o meio das culturas foi renovado, sendo adicionado de apenas 2% de SFB. A formulação dos meios está descrita na Tabela 4.1, conforme os catálogos de seus fabricantes.

TABELA 4.1: Formulação dos meios para cultivo celular - 199 e MEM.

COMPONENTES	MEIO 199	MEM
Sais inorgânicos:	(mg/L)	(mg/L)
CaCl ₂	200,00	200,00
Fe(NO ₃) ₃ • 9H ₂ O	0,72	–
KCl	400,00	400,00
MgSO ₄	98,00	98,00
NaCl	6800,00	6800,00
NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	140,00	140,00
Outros componentes:		
*Adenosina-5-fosfato	0,20	–
*Adenosina-5-trifosfato	1,00	–
*Desoxirribose	0,50	–
*Guanina • HCl	0,30	–
*Hipoxantina • Na	0,40	–
*Ribose	0,50	–
*Sulfato de adenina	10,00	–
*Timina	0,30	–
*Uracila	0,30	–
*Xantina • Na	0,34	–
Acetato de sódio	50,00	–
Colesterol	0,20	–
D-glicose	1000,00	1000,00
Glutationa (reduzida)	0,05	–
Tween 80™	20,00	–
Vermelho de fenol	20,00	10,00
Aminoácidos:		
L-Ácido aspártico	30,00	–
L-Ácido glutâmico	75,00	–
L-Alanina	25,00	–
L-Arginina • HCl	70,00	126,00
L-Cisteína HCl • H ₂ O	0,10	–
L-Cistina • 2HCl	26,00	31,00
L-Fenilalanina	25,00	32,00
Glicina	50,00	–
L-Glutamina	100,00	292,00
L-Hidroxiprolina	10,00	–
L-Histidina HCl • H ₂ O	22,00	42,00
L-Isoleucina	40,00	52,00
L-Leucina	60,00	52,00
L-Lisina • HCl	70,00	73,00
L-Metionina	15,00	15,00
L-Prolina	40,00	–
L-Serina	25,00	–
L-Tirosina • 2Na • 2H ₂ O	58,00	52,00
L-Treonina	30,00	48,00
L-Triptofano	10,00	10,00
L-Valina	25,00	46,00
Vitaminas:		
Ácido ascórbico	0,05	–
Ácido fólico	0,01	1,00
Ácido para-aminobenzóico	0,05	–
Biotina	0,01	–
Calciferol	0,10	–
Cloreto de Colina	0,50	1,00
D-Ca Pantotenato	0,01	1,00
Fosfato de α-Tocoferol	0,01	–
i-Inositol	0,05	2,00
Menadiona	0,01	–
Niacina	0,025	–
Niacinamida	0,025	1,00
Piridoxal HCl	0,025	1,00
Piridoxina HCl	0,025	–
Riboflavina	0,01	0,10
Tiamina HCl	0,01	1,00
Vitamina A (Acetato)	0,14	–

Retirado do catálogo de 2004 da Gibco-Invitrogen. * Derivados nucleotídicos.

4.2. Preparo da solução-estoque de AZT:

A amostra de AZT (PM = 267,24) utilizada nos ensaios foi gentilmente cedida pela Dra. Núbia Boechat (Farmanguinhos/Fiocruz, RJ, Brasil), sendo preparada uma solução-estoque a 40mM em solução salina tamponada de Hanks (HBSS) (Hanks & Wallace, 1949).

4.3. Purificação de vírus da influenza A (X31 - H3N2):

A amostra de vírus da influenza A (X31) (Kilbourne, 1969) foi inoculada em ovos embrionados de galinha de acordo com Espíndola (2003). Após 48h de incubação a 37°C, foram efetuadas as etapas de coleta do líquido alantóico, adição de Tris/EDTA (para a concentração final de 2mM e 1mM, respectivamente - pH 8,4), clarificação (7000 × g por 30 min.) e sedimentação por centrifugação (80.000 × g por 90 min.). A amostra concentrada de partículas virais foi submetida ao processo de purificação por ultracentrifugação (100.000 × g por 2h) em gradiente linear de densidade (1,081 - 1,286g/ml), preparado com sacarose em Tris/EDTA (2mM / 1mM, pH 8,2). A fração contendo as partículas virais foi coletada, alíquotada e estocada a -80°C.

4.4. Determinação do título infeccioso da amostra purificada de vírus A/X31 em dose infecciosa para 50% das culturas de células inoculadas (CCID₅₀):

Monocamadas de culturas de células Vero, em placas de 96 cavidades, foram lavadas para retirada dos resíduos de SFB, antes da inoculação com a preparação viral. Diluições seriadas da amostra purificada de vírus A/X31, variando de 10⁻² até 10⁻¹¹, preparadas em MEM e em meio 199, sem SFB, foram inoculadas num volume de 0,1ml nos cultivos celulares em oito cavidades, cada. Após 1h de incubação a 37°C, o inóculo foi retirado e substituído por igual volume de meio de cultura acrescido de 1µg/ml de tripsina (Sigma, Cat. No. T-7309). Como controles, culturas não infectadas foram mantidas em meio com ou sem tripsina. Após 48h de incubação, em estufa a 37°C com 5% de CO₂, a infecção das culturas de células foi pesquisada pela detecção de partículas hemaglutinantes nos sobrenadantes coletados (Oh, Mccaffery & Eichelberger, 2000). Para tal, foram realizadas réplicas das placas, conforme esquema da Figura 4.1, transferindo-se 25µl do sobrenadante de cada cavidade para placas de microtitulação com fundo em "U". Em cada cavidade foram adicionados 25µl de PBS

com gelatina a 0,1% (pH 7,4) contendo 10^6 hemácias humanas. As placas foram incubadas a 4°C até formação de botões nas cavidades de controle (hemácias + PBS pH 7,4 com gelatina a 0,1%). Na leitura, as cavidades que resultaram na formação de botões foram consideradas negativas, enquanto as que apresentaram a formação de uma rede de hemácias foram consideradas positivas (Espíndola, 2003). De acordo com os resultados positivos e negativos, a CCID₅₀ foi calculada pelo método descrito por Reed & Muench (1938).



Figura 4.1. Modelo esquemático da técnica de CCID₅₀ modificada. (1) Após 48h de incubação, 25µl do sobrenadante de cada cavidade da placa com culturas de células Vero, inoculadas com diluições da amostra de vírus da influenza A/X31, foram transferidos para placas de microtitulação com fundo em “U”, construindo com isso uma réplica. Em todas as cavidades, foram adicionados 25µl de uma suspensão de hemácias (10^6 hemácias/25µl), sendo posteriormente a placa incubada a 4°C. **(2)** Quando as hemácias das cavidades de controle formaram botões, foi realizada a leitura do teste. Nas cavidades, da placa original, em que ocorreu infecção, as células produziram partículas virais, que podem ser reveladas pelo fenômeno de hemaglutinação. Por outro lado, nas culturas não infectadas não houve produção de partículas virais, o que pode ser evidenciado pela ausência de hemaglutinação, ocorrendo por isso a formação de botões. De acordo com os resultados positivos (hemaglutinação) e negativos (botões) foi calculado o título infeccioso em CCID₅₀ pelo método descrito por Reed & Muench (1938).

4.5. Cinética de inibição da proliferação de células Vero pelo AZT, avaliada pela técnica de contagem ao microscópio:

Culturas de células Vero em placas de 24 cavidades foram iniciadas com inóculo de 1ml contendo 10^5 células, utilizando MEM ou meio 199, contendo 0, 50, 100, 200 e 400µM de AZT, e acrescidos de 2% de SFB. As placas foram mantidas por 24, 48 e 72h a 37°C com 5% de CO₂. Após os períodos de incubação, as monocamadas foram lavadas suavemente com HBSS, e as células que permaneceram aderidas foram dispersas por tripsinização (tripsina a 0,25% e EDTA a 0,1% em HBSS), que foi acompanhada por observação ao microscópio invertido e interrompida antes do total

descolamento das células. A densidade celular nos experimentos em triplicatas foi definida por contagem em câmara de Neubauer (Freshney, 1987). As CI_{50} de AZT para as células Vero, nos diferentes meios de cultura, foram definidas de acordo com a redução em 50% do número de células presentes na população-controle após 72h de incubação.

4.6. Determinação da concentração de AZT capaz de inibir a proliferação de células Vero em 50 % (CI_{50}), através da técnica de MTT:

Culturas de células Vero em placas de 96 cavidades foram iniciadas com inóculo de 0,2ml contendo 2×10^4 células, utilizando MEM ou meio 199, contendo 0, 50, 100, 200 e 400 μ M de AZT, e acrescidos de 2% de SFB. As placas foram mantidas a 37°C com 5% de CO₂ por 24, 48 e 72h. Após os períodos de incubação, as placas foram adicionadas de 20 μ l de uma solução de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-y1)-2,5-difenil tetrazólio] a 5mg/ml em PBS e incubadas por 3h, ao abrigo da luz, em estufa a 37°C com 5% CO₂ (Mosmann, 1983). Posteriormente, os sobrenadantes foram descartados, e os cristais de formazana presentes na monocamada celular dissolvidos com DMSO (Dimetilsulfóxido), aplicando-se 100 μ l por cavidade, sendo a tonalidade dos produtos resultantes analisada em espectrofotômetro sob um comprimento de onda de 490nm. Esses resultados foram comparados frente a uma curva-padrão representativa da densidade ótica (D.O.) em função de diferentes quantidades de células viáveis, sendo assim determinada a densidade populacional nos testes. As CI_{50} de AZT para as células Vero, nos diferentes meios de cultura, foram definidas de acordo com a redução de 50% do número de células presentes na população-controle após 72h de incubação.

4.7. Determinação da influência do AZT sobre as fases do ciclo celular por citometria de fluxo:

Culturas de células Vero em garrafas de 25cm² foram iniciadas com inóculo de 8ml contendo 8×10^5 células, utilizando MEM ou meio 199, contendo 0, 50, 100, 200 e 400 μ M de AZT, e acrescidos de 2% de SFB. As placas foram mantidas a 37°C com 5% de CO₂ por 24, 48 e 72h. Após a incubação, o sobrenadante das culturas de células foi removido e as monocamadas tratadas com 3ml de uma solução de EDTA a 0,15% em HBSS até descolamento da parede da garrafa, sendo este processo acompanhado por

observação em microscópio invertido. Após a transferência para tubos de ensaio, as células foram sedimentadas por centrifugação a $1000 \times g$ por cinco minutos, sendo o sobrenadante descartado. Posteriormente, as células foram tratadas com uma solução de 0,04% de Triton X-100, $10\mu\text{g/ml}$ de brometo de etídio (Sigma, Cat. No. E-8751) e $0,2\text{mg/ml}$ de RNase A (Sigma, Cat. No. R-4875) em HBSS para permeabilização da membrana plasmática e marcação do DNA. Após incubação à temperatura ambiente por, pelo menos, 15 minutos, a análise da quantidade de DNA nas células foi realizada com o programa CellQuest (BD Biosciences) pela aquisição de até 5.000 eventos em um citômetro de fluxo (Becton & Dickinson, CA, USA).

A definição das células em apoptose e nas fases G_0/G_1 , S e G_2/M do ciclo celular foi baseada na intensidade da fluorescência emitida pelo brometo de etídio associado ao DNA. Células em G_0/G_1 se localizam num pico inicial no gráfico, representando células diplóides. Por outro lado, células em G_2/M , que possuem DNA totalmente replicado (tetraplóides), formam um segundo pico. Células na fase S são aquelas que estão sintetizando DNA, sendo evidenciadas pelo aumento linear da intensidade da fluorescência, constituindo assim uma área intermediária entre os picos formados pelas células nas fases G_0/G_1 e G_2/M (Van Dilla *et al.*, 1969; Crissman *et al.*, 1985). Por outro lado, células apoptóticas, que apresentam fragmentação do DNA, são hipodiplóides, localizando-se antes do pico formado pelas células em G_0/G_1 (Nicoletti *et al.*, 1991). A determinação do percentual de células hipodiplóides e nas diferentes fases do ciclo celular, nos gráficos obtidos, de acordo com cada uma das quatro áreas anteriormente descritas, foi calculada com o programa computacional WinMDI 2.8 (disponível em <http://facs.scripps.edu>).

4.8. Determinação do grau de infecção por vírus da influenza A (X31) em culturas de células Vero tratadas com AZT:

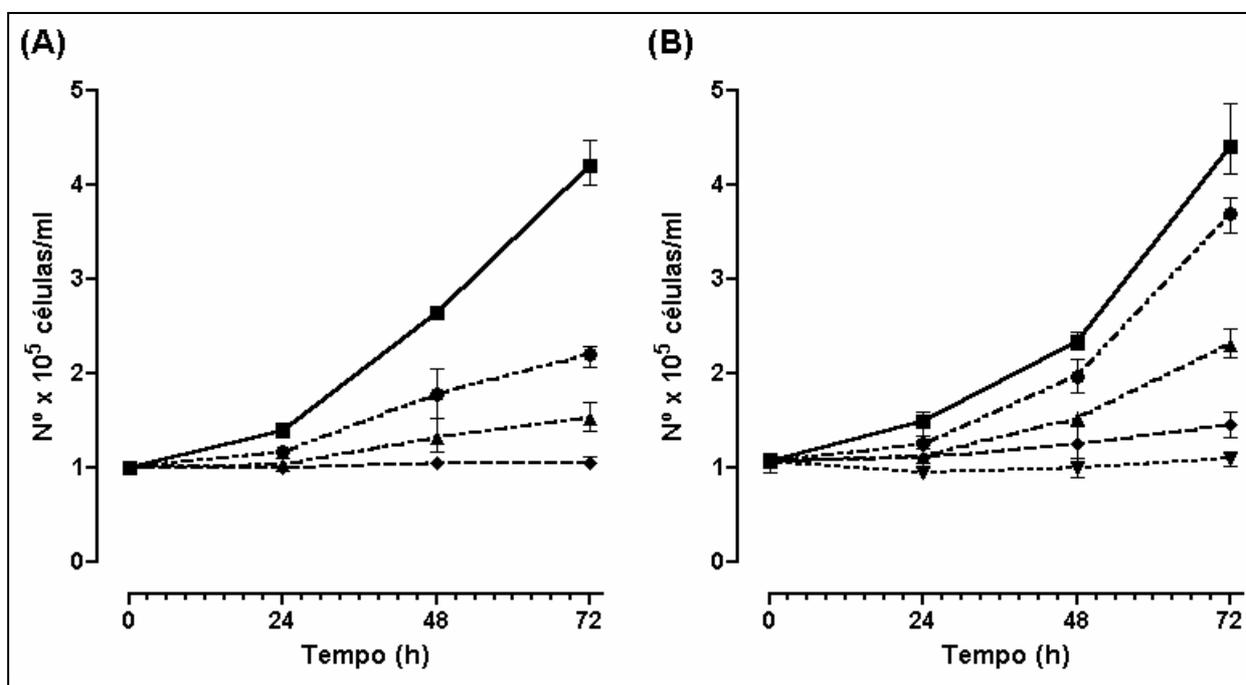
Culturas de células Vero em placas de 96 cavidades foram iniciadas com inóculo de $0,1\text{ml}$ contendo 2×10^4 células, utilizando MEM ou meio 199, contendo 0, 50, 100, 200 e $400\mu\text{M}$ de AZT, e acrescidos de 2% SFB, sendo as placas mantidas a 37°C com 5% de CO_2 por 24h. Após este primeiro período de incubação, as culturas foram lavadas com HBSS, para retirada dos resíduos de SFB antes da inoculação com a preparação viral. As etapas de infecção e de revelação das cavidades infectadas após 48h de incubação, e o cálculo do título infeccioso foram procedidos conforme descrito no item 4.4 do capítulo de Materiais e Métodos.

5. RESULTADOS:

5.1. AZT inibe a proliferação de células Vero:

A cinética de inibição da proliferação de células Vero pelo AZT foi avaliada utilizando-se culturas não tratadas (controles) e expostas a diferentes doses desta droga (50, 100, 200, e 400 μ M), sob condições favorecedoras da proliferação (adição de 2% de SFB). Cultivos celulares mantidos com MEM e meio 199 completaram, pelo menos, dois ciclos de divisão após 72h de incubação. Por outro lado, a presença de AZT retardou o processo de divisão celular. Em altas doses (200 ou 400 μ M), reduziu drasticamente a proliferação, conforme pode ser observado na Figura 5.1. Os índices de proliferação após 72h de incubação, referentes ao experimento da Figura 5.1, estão descritos na Tabela 5.1.

Figura 5.1: Cinética de inibição da proliferação de células Vero pelo AZT, avaliada pela técnica de contagem ao microscópio.



Culturas de células Vero (10⁵ células/ml) não tratadas (■) ou tratadas com 50 (●), 100 (▲), 200 (◆) e 400 μ M (▼) de AZT em meio 199 (A), e em MEM (B), na presença de 2% de SFB, foram incubadas por 24, 48 e 72h. A população celular nas triplicatas foi definida por contagem em Câmara de Neubauer. Os resultados obtidos em cada experimento, separadamente, foram estatisticamente significantes ($p < 0,01$).

Tabela 5.1

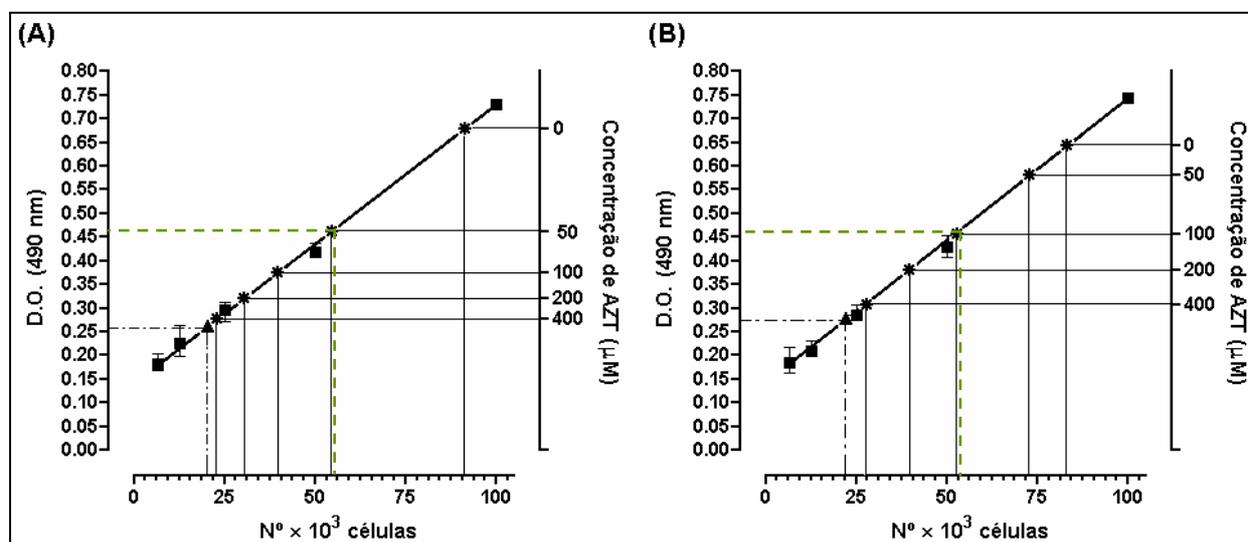
Efeito do AZT sobre a proliferação de células Vero após 72h de incubação (contagem).

Taxa de proliferação (%)	Concentração de AZT(μ M)				
	Controle (0)	50	100	200	400
Meio 199	105 \pm 2,1	57,3 \pm 2,8	25,9 \pm 1,9	2,6 \pm 0,7	2,1 \pm 0,9
MEM ^a	104 \pm 1,8	87,0 \pm 4,4	54,4 \pm 3,5	18,5 \pm 1,6	0,7 \pm 0,5

^a MEM, Meio mínimo essencial.

De acordo com os resultados obtidos com a quantificação de células viáveis pela técnica de MTT, foi possível calcular a CI_{50} de AZT para células Vero incubadas em meio 199 e em MEM. A D.O. referente a 50% do número de células nos controles após 72h de incubação foi calculada de acordo com a fórmula: $[(D.O. \text{ controle } 72h) - (D.O. \text{ controle } 0h)] \div 2$. Não foram necessários outros cálculos para a definição da CI_{50} , pois os valores obtidos coincidiram com aqueles referentes às culturas incubadas com 50 μ M de AZT em meio 199 e com 100 μ M de AZT em MEM (Figura 5.2).

Figura 5.2: CI_{50} de AZT para células Vero em meio 199 e em MEM (técnica de MTT).



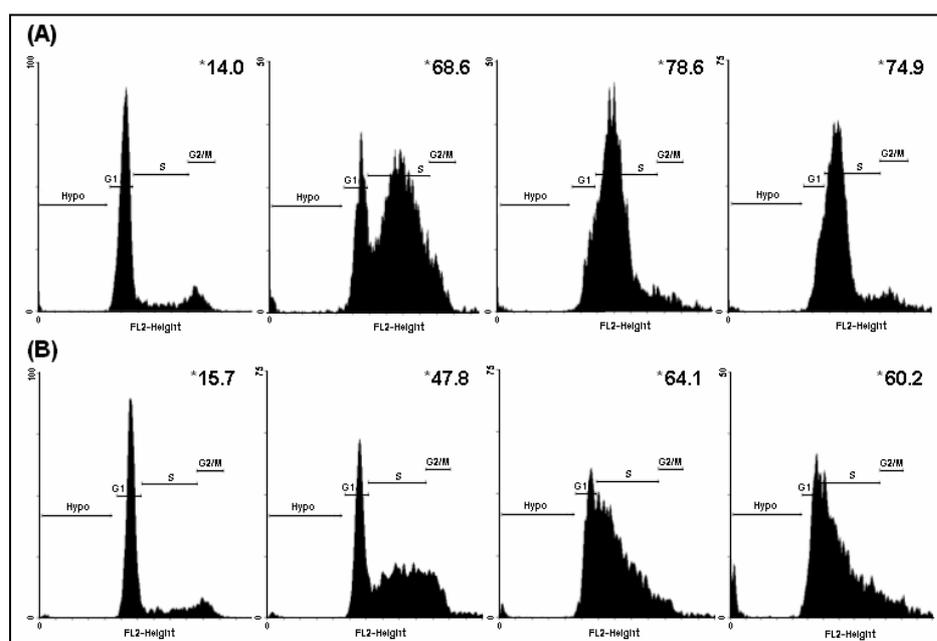
Células Vero [2×10^4 células/0,2ml (\blacktriangle)] foram plaqueadas com 0, 50, 100, 200 e 400 μ M ($*$) de AZT em meio 199 (A) e em MEM (B), ambos suplementados com 2% de SFB, e incubadas por 72h. Após os períodos de incubação, o teste MTT foi realizado de acordo com Mossman (1983), com as seguintes modificações: dissolução do produto da reação (formazana) com DMSO, e leitura da densidade ótica (D.O.) em um comprimento de onda de 490nm. A CI_{50} (Linha verde tracejada) foi estabelecida com o auxílio de uma curva-padrão construída com os valores da D.O. obtida no teste MTT, utilizando quantidades de células previamente conhecidas (\blacksquare). Os resultados obtidos em cada experimento, separadamente, foram estatisticamente significantes ($p < 0,01$).

5.2. Bloqueio do ciclo mitótico de células Vero na fase S pelo AZT:

A análise por citometria de fluxo foi utilizada para avaliar as mudanças ocorridas no perfil do ciclo mitótico de culturas de células Vero na presença de AZT. Para tal, foram usadas culturas não tratadas (controles), ou expostas por 24, 48 e 72h a diferentes concentrações de AZT em meio 199 (50, 100 e 200 μ M), e em MEM (100, 200 e 400 μ M). A distribuição das células nas fases G₀/G₁, S e G₂/M foi baseada na intensidade da fluorescência emitida pelo brometo de etídio intercalado no DNA.

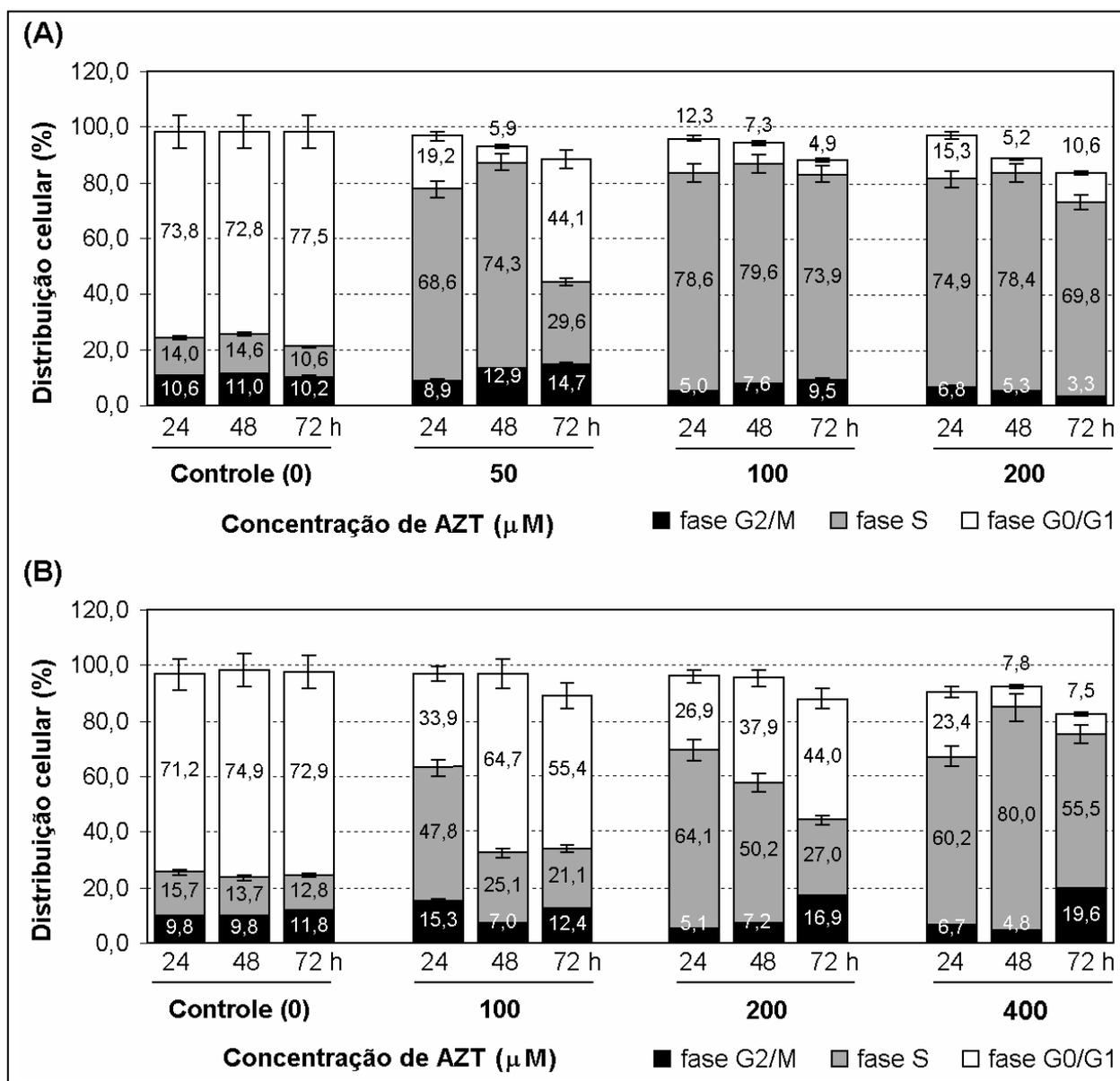
Na Figura 5.3, estão apresentados os gráficos representativos dos perfis de ciclo celular. O pico inicial (esquerda) representa células em G₀/G₁, a área intermediária abrange as células na fase S e o pico final (direita) representa células em G₂/M. Células hipodiplóides, que apresentam DNA fragmentado e, por isso, são consideradas em apoptose (Nicoletti *et al.*, 1991), localizam-se antes do pico de células em G₀/G₁. Altas concentrações de AZT (200 μ M em meio 199 e 400 μ M em MEM) eram capazes de aumentar, respectivamente, de 3,8 a 5,4 vezes o percentual de células Vero na fase S após 24h de incubação (Figura 5.4). O bloqueio do ciclo celular na fase S foi ainda maior após 48h de incubação, em média de 5,6 vezes (de 14,6 \pm 0,4% para 78,4 \pm 5,0% no meio 199 e de 13,7 \pm 0,4% para 80,0 \pm 5,6% em MEM) (Figura 5.4).

Figura 5.3: Perfis do ciclo celular de culturas de células Vero tratadas com AZT.



Culturas de células Vero (10⁵ células/ml) foram expostas por 24h a: **(A)** 0, 50, 100 e 200 μ M de AZT em meio 199; e **(B)** 0, 100, 200 e 400 μ M de AZT em MEM. O percentual de células na fase S, para cada grupo, é mostrada no canto direito superior dos gráficos.

Figura 5.4: Distribuição celular nas fases do ciclo mitótico, após tratamento com AZT.



Células Vero em garrafas de 25cm² (10⁵ células/ml) foram expostas por 24, 48 e 72h a: **(A)** 0, 50, 100 e 200µM de AZT em meio 199; e **(B)** 0, 100, 200 e 400µM de AZT em MEM. A análise do ciclo celular foi realizada por citometria de fluxo, e a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi calculada pelo programa WinMDI2.8. Os resultados obtidos em cada experimento, separadamente, foram estatisticamente significantes (p<0,01).

Como consequência do bloqueio de células Vero na fase S, ocorreu uma diminuição da proporção de células na fase G₁. Células em G₀/G₁, que possuem cromossomos não-duplicados (diploides), representaram até 73,8 ± 1,2% das células nas culturas mantidas com meio 199 adicionado apenas de 2% SFB, e foram reduzidas até 15,3 ± 0,4% em culturas tratadas com 200µM de AZT por 24h (Figura 5.4A). Além

disso, o mesmo fenômeno foi observado em culturas de células Vero incubadas com MEM. Neste caso, cerca de $71,2 \pm 1,2\%$ das células nos controles estavam na fase G_0/G_1 e foram reduzidas para $23,4 \pm 2,1\%$, nas culturas incubadas com $400\mu\text{M}$ de AZT (Figura 5.4B). Além do bloqueio das células na fase S, também foi observada uma pequena redução na quantidade de células no compartimento G_2/M , nas culturas tratadas com AZT. Células em G_2/M representaram $10,6 \pm 0,2\%$ e $9,8 \pm 0,2\%$ nos controles incubados com meio 199 e MEM, respectivamente. Esta participação foi reduzida para $6,8 \pm 0,2\%$ e para $6,7 \pm 0,6\%$ após tratamento com AZT a $200\mu\text{M}$ em meio 199 (Figura 5.4A) e a $400\mu\text{M}$ em MEM (Figura 5.4B), respectivamente. Além disso, a depleção de células nas fases G_0/G_1 e G_2/M aumentou com o tempo de incubação. Após 48h de tratamento, $5,2 \pm 0,3\%$ das células estavam na fase G_0/G_1 e $5,3 \pm 0,3\%$ na fase G_2/M em culturas tratadas com $200\mu\text{M}$ de AZT em meio 199, enquanto em MEM, estes compartimentos representaram $7,8 \pm 0,5\%$ e $4,8 \pm 0,3\%$, respectivamente (Figuras 5.4).

A presença de AZT também modificou, drasticamente, os perfis do ciclo celular estabelecidos pela citometria de fluxo. Enquanto os controles exibiam uma distribuição homogênea ao longo da fase S, em culturas tratadas com AZT a $200\mu\text{M}$ em meio 199 e a $400\mu\text{M}$ em MEM as células foram bloqueadas, em sua maioria, no início da fase S (Figura 5.3).

O bloqueio do ciclo celular na fase S pelo AZT regrediu naturalmente após 72h de incubação com a droga. Foi observado um aumento da porcentagem de células nas fases G_0/G_1 e G_2/M em contrapartida com a redução de células na fase S. O percentual de células na fase G_0/G_1 nas culturas tratadas com $50\mu\text{M}$ de AZT em meio 199 aumentou de $19,2 \pm 0,6\%$ em 24h de incubação para $44,1 \pm 6,0\%$ em 72h, enquanto células na fase S decresceram de $68,6 \pm 2,2\%$ para $29,6 \pm 4,0\%$. Quando atentamos para a fase G_2/M (Figura 5.4A), o aumento observado foi de 65% sob as mesmas condições (de $8,9 \pm 0,3\%$ para $14,7 \pm 2,0\%$). A partir de $100\mu\text{M}$ de AZT em meio 199, a redução do número de células nas fases G_0/G_1 e G_2/M manteve-se estável, revelando que a maioria das células da população permaneceu retida na fase S, mesmo após 72h de incubação (Figura 5.4A), fenômeno que foi acompanhado de um aumento da porcentagem de células em apoptose (Tabela 5.2).

O mesmo fenômeno foi observado nos cultivos celulares mantidos com MEM, porém sob doses maiores de AZT. Utilizando $100\mu\text{M}$ de AZT, o percentual de células em G_2/M foi ligeiramente alterado, enquanto o número de células em G_0/G_1 aumentou

de $33,9 \pm 1,9\%$, em 24h de incubação, para $55,4 \pm 3,9\%$, após 72h. Por outro lado, a porcentagem de células na fase S diminuiu de $47,8 \pm 2,7\%$, após 24h de tratamento, para $21,1 \pm 1,4\%$ em 72h. Utilizando $200\mu\text{M}$ de AZT, $26,9 \pm 1,0\%$ das células estavam na fase G_0/G_1 e $5,1 \pm 0,2\%$ na fase G_2/M , após 24h de incubação, e estes percentuais foram elevados para $44,0 \pm 4,5\%$ e $16,9 \pm 1,7\%$, após 72h, respectivamente. Como conseqüência, a porcentagem de células na fase S decresceu de $64,1 \pm 2,4\%$, como encontrado nas primeiras 24h de incubação, para $27,0 \pm 2,8\%$, após 72 h. Além disso, com $400\mu\text{M}$ de AZT em MEM, embora o percentual de células na fase G_0/G_1 tenha sido ainda mais reduzido após 72h de incubação, o percentual de células aprisionadas na fase S não aumentou. Ao contrário, decaiu em virtude da cota de células que evoluíram para apoptose (Tabela 5.2), e ao aumento do número de células em G_2/M .

Tabela 5.2

Avaliação da apoptose em células Vero tratadas com AZT.

Células hipodiplóides (%) ^a	Concentração de AZT (μM)				
	Controle (0)	50	100	200	400
Meio 199:					
24h	$1,6 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,2$	$3,8 \pm 0,4$	$2,8 \pm 0,2$	<i>N.R.</i>
48h	$1,6 \pm 0,3$	$6,6 \pm 0,4$	$5,5 \pm 0,4$	$5,9 \pm 0,4$	<i>N.R.</i>
72h	$1,7 \pm 0,2$	$9,9 \pm 1,4$	$9,8 \pm 2,1$	$14,6 \pm 2,1$	<i>N.R.</i>
MEM:					
24h	$1,6 \pm 0,2$	<i>N.R.</i> ^b	$2,8 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,2$	$9,0 \pm 0,8$
48h	$1,5 \pm 0,2$	<i>N.R.</i>	$3,2 \pm 0,2$	$4,6 \pm 0,3$	$6,9 \pm 0,7$
72h	$1,8 \pm 0,3$	<i>N.R.</i>	$5,8 \pm 0,3$	$10,1 \pm 1,0$	$14,7 \pm 2,2$

^a A análise do ciclo celular foi realizada pela citometria de fluxo.

^b *N.R.*, não realizado.

5.3. Células Vero retidas na fase S pelo AZT são metabolicamente competentes para a produção de partículas de vírus da influenza A:

Culturas de células Vero tratadas com 50, 100, 200 ou $400\mu\text{M}$ de AZT por 24h, em meio 199 e MEM, e por isso predominantemente bloqueadas na fase S (Figura 5.3), foram inoculadas com diluições seriadas (10^{-2} até 10^{-11}) de uma amostra purificada de vírus da influenza A/X31, e posteriormente incubadas por mais 48h. Embora este bloqueio do ciclo celular tenha sido revertido em culturas expostas às CI_{50} definidas para células Vero, nas culturas tratadas com $200\mu\text{M}$ de AZT em meio 199, e $400\mu\text{M}$ em

MEM, a maioria das células permaneceu na fase S até à conclusão do ensaio (Figura 5.3). Contudo, não foram observadas diferenças significativas nos títulos infecciosos definidos em culturas tratadas e não-tratadas com AZT (Tabela 5.3), o que denota a viabilidade metabólica para, pelo menos, a síntese e o endereçamento de todos os componentes dos vírus da influenza A.

Tabela 5.3

Infecção de culturas de células Vero tratadas com AZT por vírus da influenza A

Concentração de AZT (μM)	Título em CCID ₅₀ ($\log_{10}/0,1\text{ml}$) ^a	
	MEM ^b	Meio 199
Controle (0)	6,250 \pm 0,125	6,625 \pm 0,125
400	6,625 \pm 0,125	<i>N.R.</i>
200	6,125 \pm 0,125	6,500 \pm 0,125
100	<i>N.R.</i> ^c	6,625 \pm 0,125
50	6,125 \pm 0,125	6,625 \pm 0,125

^a CCID₅₀ foi realizado com meio de cultivo celular adicionado de 1 $\mu\text{g/ml}$ de tripsina.

^b MEM, meio mínimo essencial.

^c *N.R.*, não realizado.

6. DISCUSSÃO:

A molécula de AZT, para ser ativa como droga inibidora do processo de alongamento das fitas de DNA, requer sua gradual conversão para AZT-TP através da ação das enzimas celulares timidina quinase, timidilato quinase e pirimidina-nucleosídeo difosfato quinase (Barry *et al.*, 1996). Em sua forma trifosforilada, o AZT compete com a dTTP e pode ser utilizado por DNA pols, estando entre estas tanto as transcriptases reversas (Richman, 2001), quanto as DNA pols celulares (Nickel *et al.*, 1992), e mitocondriais (Lim & Copeland, 2001).

As DNA pols são enzimas que contêm na sua estrutura dois domínios catalíticos distintos. Um deles é responsável pela atividade de DNA pol e o outro pela atividade de 3'→5'-exonuclease (Steitz, 1999). A atividade funcional comum a todas as DNA pols é favorecer o ataque nucleofílico da 3'-OH do último nucleotídeo da cadeia crescente de DNA ao 5'- α fósforo do dNTP a ser adicionado. Após a incorporação do dNTP ao DNA, a DNA pol pode adicionar outro nucleotídeo ou removê-lo caso não seja correspondente à fita-molde (Nelson & Cox, 2000).

A análise da atividade das DNA pols celulares α , δ e ϵ na presença de AZT-TP revelou que este análogo de nucleotídeo é incorporado ao DNA a uma taxa menor do que a dTTP, e que o AZT incorporado pode ser removido do DNA pela atividade de 3'→5'-exonuclease destas DNA pols (Nickel *et al.*, 1992). Entretanto, o AZT monofosfato (AZT-MP), que é acumulado em altas concentrações no interior das células (cerca de 900pmol/10⁶ células), segundo Furman *et al.* (1986), dificulta a excisão do AZT incorporado às cadeias de DNA. O fato de não ser excluído contribui para o efeito citotóxico dessa droga (Bridges, Faraj & Sommadossi, 1993; Harrington, Reardon & Spector, 1993). A alta concentração de AZT-MP no citosol não altera os níveis das formas di e tri-fosfatada, que são mantidos, predominantemente, em baixas concentrações (cerca de 2 a 5pmol/10⁶ células) (Furman *et al.*, 1986; Fridland, Connelly & Ashmun, 1990). Este fato sugere que o AZT-MP é constantemente convertido até AZT-TP de acordo com a sua incorporação às cadeias de DNA que estão sendo alongadas. A molécula de AZT não possui o grupamento -OH necessário para permitir a extensão do DNA, e pode ser usada como um terminador do alongamento da fita (Viora *et al.*, 1997; Olivero *et al.*, 2005).

Dessa forma, é plausível supor que a presença desta molécula seja capaz de contribuir para o bloqueio da divisão celular devido à interferência com o processo de replicação do DNA. De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, a utilização de doses crescentes de AZT retardou o tempo médio do processo de divisão de células Vero. Como pode ser visto, as concentrações de 200 e 400 μ M desta droga em meio 199 e em MEM, respectivamente, praticamente bloquearam a proliferação celular, verificada pela técnica de contagem direta das células (Figura 5.1). Estes resultados puderam ser corroborados por uma segunda técnica de quantificação celular, tendo sido utilizada a técnica de redução das moléculas de MTT pela NADH desidrogenase mitocondrial (Mosmann, 1983; Huet *et al.*, 1992). Por qualquer uma das técnicas foi possível confirmar que as taxas de inibição da proliferação de células Vero pelo AZT diferiram de acordo com o meio de cultura aplicado [Tabela 5.1]. Como parâmetros para esta comparação foram calculadas as CI₅₀ de AZT, que foram correspondentes às doses de 50 μ M em meio 199 e 100 μ M em MEM [Figura 5.2].

Embora o AZT interfira na síntese de DNA, e em processos do metabolismo mitocondrial, tais como o ciclo de Krebs e a cadeia respiratória, nas células musculares e hepáticas humanas, foi demonstrado que o tratamento com AZT não altera a expressão e atividade das enzimas codificadas pelo genoma mitocondrial (Benbrik *et al.*, 1997; Pan-Zhou *et al.*, 2000). Embora as células Vero sejam derivadas de rim de

macaco, os resultados obtidos com a técnica de MTT sugerem que, tal como nas células musculares e hepáticas, a atividade oxidativa das mitocôndrias das células renais continua operante.

De acordo com as CI_{50} de AZT calculadas para as células Vero em meio 199 e em MEM, que foram de $50\mu\text{M}$ e $100\mu\text{M}$, respectivamente [Figura 5.2], pode-se concluir que a sensibilidade das células ao efeito do AZT foi pelo menos duas vezes maior nas células em meio 199 do que em MEM. Uma explicação para este fenômeno pode ser atribuído ao grau de comprometimento de cada uma das vias para síntese de dNTPs (vias *de novo* e *salvage*) envolvidas na formação de dTTP, durante o período de alongamento das fitas de DNA.

Na via *salvage*, a timidina é inicialmente fosforilada pela timidina quinase (TK). Por outro lado, a via *de novo* tem o desoxiuridilato (dUMP) como um precursor imediato da síntese de dTMP (Nelson & Cox, 2000) e, por isso, dispensa a atividade de TK.

As células cultivadas em meio sem precursores de nucleotídeos sintetizam suas reservas de timidina pela via *de novo* e, portanto, é de se esperar que apresentem baixos níveis de atividade de TK citosólica (TK1), pois esta enzima atua apenas na via *salvage* para síntese da timidina. A expressão da TK1 é regulada pelo ciclo celular, sendo detectada num momento tardio da fase G_1 , aumentando consideravelmente durante a fase S, coincidindo com o início da replicação do DNA. Contudo, a atividade de TK1 declina durante a fase G_2 e desaparece ao longo da mitose (Ke & Chang, 2004; Welin *et al.*, 2004).

Para a avaliação do efeito do AZT sobre a proliferação celular foram utilizadas culturas de células Vero mantidas com meio 199, que contém diferentes derivados nucleotídicos, e com MEM, no qual não constam nucleosídeos, nucleotídeos ou bases nitrogenadas. Além disso, a composição de ambos os meios também difere qualitativa e quantitativamente com relação às vitaminas e aminoácidos (Tabela 4.1). Contudo, os componentes naturais capazes de interferir com a incorporação da timidina e, paralelamente, com a do seu análogo AZT, são nucleobases e nucleosídeos (Szondy & Newsholme, 1990). Os dados descritos por Szondy & Newsholme (1990) corroboram a variação das respostas encontradas com as células Vero frente às moléculas de AZT, de acordo com o meio de cultura utilizado, uma vez que estes autores mostraram que a taxa de incorporação de $[^3\text{H}]$ -timidina é maior quando em concomitância com nucleobases ou nucleosídeos.

Outra hipótese que pode estar relacionada com esta variação é que uma concentração maior de moléculas de AZT foi necessária para competir com as reservas

de dTTP sintetizadas pela via *de novo* nas células cultivadas em MEM do que em células que também utilizavam a via *salvage* (meio 199).

Os resultados do estudo sobre os diferentes estágios do ciclo celular, efetuados pela técnica de citometria de fluxo, corroboram aqueles que foram obtidos nos ensaios de proliferação. Neles pôde ser verificado que o AZT, em doses de 200 μ M em meio 199 e 400 μ M em MEM, aumentou em média 5,6 vezes a porcentagem de células Vero na fase S [Figura 5.4]. Este índice demonstra que a presença de AZT retarda a progressão do ciclo celular e aprisiona as células na fase S. Além disso, a inibição da proliferação, com estas mesmas concentrações de AZT, foi tão intensa que manteve a maioria da população celular no início da fase S, como pode ser observado nas curvas de ciclo celular apresentadas na Figura 5.3. O acúmulo de células na fase S se fez em concomitância com uma drástica depleção na fase G₀/G₁ e de um pequeno decréscimo na quantidade de células em G₂/M [Figura 5.4]. De acordo com os resultados mostrados na Figura 5.4, o grau de retenção das células Vero na fase S do ciclo celular, quando em meio 199 ou em MEM, foi correspondente aos resultados obtidos nos ensaios de proliferação. Ao analisar o quadro de proliferação, verifica-se que 68,6 \pm 2,2% das células em culturas tratadas com AZT a 50 μ M em meio 199 encontravam-se na fase S, após 24h de incubação. Um índice semelhante de retenção das células, na fase S, em culturas incubadas com MEM, foi encontrado nas culturas tratadas com 200 μ M de AZT (64,1 \pm 2,4%), como pode ser verificado na Figura 5.4.

Contudo, o bloqueio das células na fase S do ciclo de divisão promovido pela presença de AZT regrediu naturalmente. Em culturas de células tratadas com doses de AZT que inibem apenas parcialmente a proliferação celular (CI₅₀), foi observado um aumento na porcentagem de células nas fases G₀/G₁ e G₂/M, após 48h de incubação em MEM, e somente após 72h em meio 199, aumento este acompanhado de redução na quantidade de células na fase S [Figura 5.4]. Provavelmente, células que concluíram a fase S e alcançaram a fase G₂/M também foram bloqueadas, uma vez que neste último estágio podem ter sido ativados os mecanismos de *checkpoint*. A replicação de DNA é supervisionada durante a fase S, para garantir o êxito deste evento, e ainda é monitorada ao longo de todo o ciclo celular, para evitar que cromossomos defeituosos sejam transmitidos para as novas células. Além de bloquear o ciclo de divisão na presença de DNA danificado, estes mecanismos de *checkpoint* também favorecem a sinalização para processos de reparo do DNA (Nyberg *et al.*, 2002).

Por outro lado, células que completaram o processo de mitose e passaram para a fase G₁, provavelmente, tiveram a progressão desta fase reduzida ou deslocaram-se

para o estado G_0 . A justificativa para estes achados foi baseada nos resultados de Sommadossi *et al.* (1989) e Fridland, Connelly & Ashmun (1990), que mostraram que AZT contribui para a redução do nível das reservas de dTTP e dCTP em até cerca de 70-80% do normal. As populações de células com níveis reduzidos de dNTPs mantêm-se, reversivelmente, bloqueadas na fase G_1 através de respostas de *checkpoint* mediadas pelo fator p53, fenômeno este observado mesmo em ausência de danos no DNA (Linke *et al.*, 1996).

A análise do ciclo celular através da citometria de fluxo revelou um aumento crescente no percentual de células apoptóticas, em função do tempo de incubação e da concentração de AZT [Tabela 5.2]. Considerando as células das culturas de controle, apenas 1,5 a $1,8 \pm 0,2\%$ podem ser consideradas hipodiplóides, ou seja, em apoptose. Após 72h de incubação, a porcentagem destas células nas culturas mantidas com meio 199 e tratadas com 50, 100 e $200\mu\text{M}$ de AZT aumentou para $9,9 \pm 1,4\%$, $9,8 \pm 2,1\%$, e $14,6 \pm 2,1\%$, respectivamente [Tabela 5.2]. Quando o mesmo fenômeno foi examinado nas culturas incubadas em MEM, verificou-se que, após o tratamento com 100, 200 e $400\mu\text{M}$ de AZT, o percentual de células hipodiplóides subiu para $5,8 \pm 0,3\%$, $10,1 \pm 1,0\%$, e $14,7 \pm 2,2\%$, respectivamente [Tabela 5.2].

Os resultados apresentados neste trabalho estão de acordo com os dados obtidos por Olivero *et al.* (2005), pela análise de microarranjos de DNA (*Microarray*) de células HeLa (Adenocarcinoma uterino) tratadas com AZT, que avaliaram a expressão de importantes genes envolvidos no controle do ciclo celular. O gene mais expresso foi o *DNA damage inducible transcript 3*, cujo produto inibe a síntese protéica, levando ao bloqueio do ciclo celular pela ativação de mecanismos de *checkpoint* das fases G_1 e G_2 , ou induzindo a apoptose. Outro gene regulado positivamente, foi o da ciclina D, que promove eventos iniciais do ciclo celular, sendo responsável pela transição de G_0/G_1 para a fase S [Figura 6.1] (Johnson & Walker, 1999). Além disso, os inibidores de CDK, *p18* e *p57*, responsáveis pela inibição dos complexos CDK/ciclina D, também tiveram sua expressão reduzida, evento este que, presumivelmente, contribui para um aumento da atividade dos complexos CDK/ciclinas D.

Olivero *et al.*, (2005) mostraram que a expressão das ciclinas E e A, que regulam a transição de G_1/S e S/G_2 , respectivamente (Vermeulen, Bockstaele, & Berneman, 2003), também foi reduzida. Este fenômeno retarda a entrada e a progressão através da fase S [Figura 6.1]. A redução na expressão do gene *p21* também foi observada no teste de *Microarray* e, por isso, a progressão do ciclo celular, mesmo na presença de danos no DNA, pode ser facilitada. A expressão de *p21* é controlada pelo fator de

transcrição p53 que é estabilizado e ativado em resposta às interferências com a replicação do DNA. A proteína p21 bloqueia a evolução do ciclo celular ao inativar os complexos CDK/ciclina, o que por sua vez inibe a síntese de DNA. Neste processo, as funções exercidas por p53 e pelos mecanismos de reparo, que se mantêm funcionais, são de crucial importância (Johnson & Walker, 1999; Vermeulen, Bockstaele, & Berneman, 2003). Além da ativação de *checkpoint* dependente da ação do fator p53, as células nas fases S e G₂ apresentam outras vias para exercício do *checkpoint*, que independem de p53. O modelo descrito por O'Connell & Cimprich (2005) sugere que o DNA de fita-simples gerado nas alças de replicação bloqueadas, quando recoberto pela proteína RPA, leva à ativação do *checkpoint* de G₂ através da ativação da quinase Chk1 pela quinase ATR. Uma vez ativada, a Chk1 bloqueia a ativação de CDK1/ciclina B e, dessa forma, impossibilita que as células entrem em mitose [Figura 6.1].

Este somatório de dados completa os resultados apresentados neste trabalho, pois sugerem que, embora o mecanismo de *checkpoint* controlado por p21 esteja suprimido nas células tratadas com AZT (Olivero *et al.*, 2005), as vias de *checkpoint* da fase G₂ ainda seriam capazes de bloquear o ciclo de divisão celular ou, pelo menos, tornar lenta a proliferação das células. Este fenômeno foi observado nas culturas de células Vero tratadas com altas doses de AZT, em que uma pequena parte da população de células foi retida na fase G₂/M [Figura 5.4].

Na literatura há descrições de que AZT e ddC (2',3'-didesoxicitidina) quando utilizados separadamente, ou em combinação, modulam algumas funções do sistema imune de murinos e humanos. A injeção destes análogos de nucleosídeos é seguida por uma inibição da resposta proliferativa de células mononucleares de sangue periférico, induzida por IL-2, antígenos e mitógenos, que se mostra diretamente proporcional à concentração utilizada da droga (Viora *et al.*, 1994a e 1994b). Além disso, Viora *et al.* (1997) demonstraram que o bloqueio de linfócitos T na fase S pela associação AZT + ddC, ambos na concentração de 10µM, é dependente do tempo de incubação. Entretanto, não há alteração significativa na porcentagem de células na fase G₂/M, e apenas uma leve depleção de células na fase G₁, em relação aos controles. Por outro lado, quando AZT foi utilizado a apenas 10µM, não foram percebidas alterações significativas no índice de proliferação e na progressão da divisão destas células linfóides. Todavia, esta inibição repercutiu somente numa leve extensão da fase S nos linfócitos tratados. Sob estes aspectos, os resultados apresentados neste trabalho mostraram que o tratamento das culturas de células Vero com 200µM de AZT em meio 199, e com 400µM em MEM, reduziu o número de células na fase G₁, que se

acumularam no início da fase S, provavelmente, pela inibição da síntese de DNA e, conseqüentemente, pela ativação dos mecanismos de *checkpoint*, para reparo dos defeitos decorrentes da incorporação de AZT.

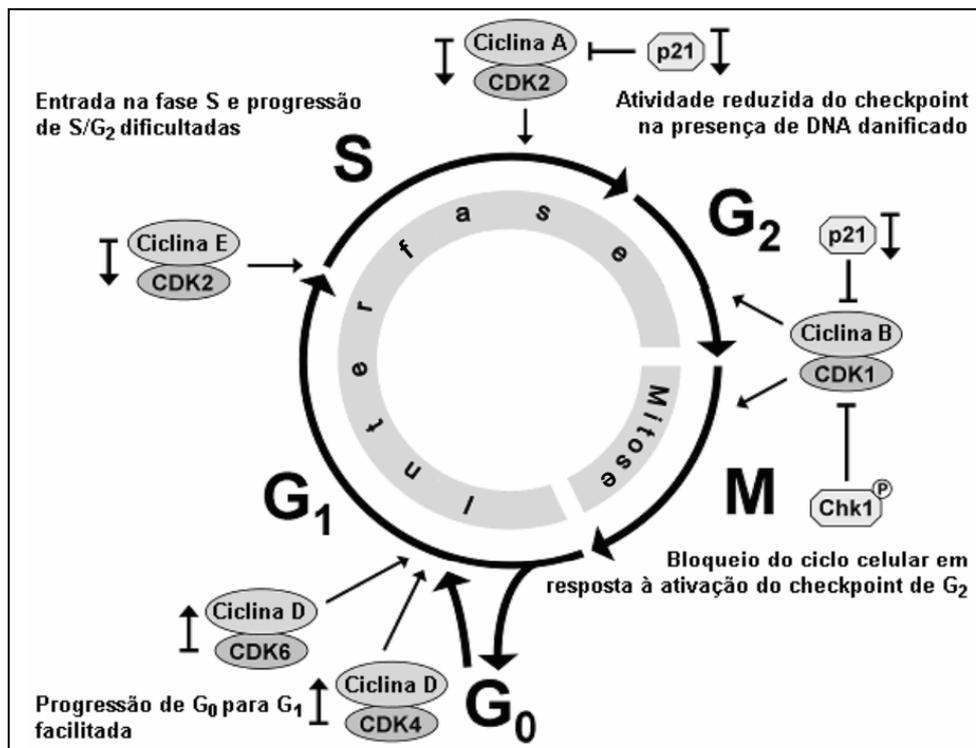


Figura 6.1. Regulação do ciclo celular. O esquema mostrado abrange, de modo simplificado, alguns dos eventos da regulação da divisão celular. Nesta figura estão resumidos os resultados apresentados por Olivero *et. al* (2005), e podem ser vistos os estágios das ações exercidas pelos complexos CDK/ciclina. Aumento (↑) ou redução (↓) da expressão. (⊥) Inibição.

A incorporação do AZT ao DNA celular interfere com diferentes processos metabólicos, que resultam em efeitos adversos para a célula. Weidner & Sommadossi (1990) demonstraram que o AZT não interfere significativamente com a síntese total de RNA, enquanto Heagy *et al.* (1991) mostraram que células tratadas com altas doses de AZT exibem quantidades reduzidas de proteína e de RNA, num perfil semelhante ao de células em G₀. De acordo com as especulações de Weidner & Sommadossi (1990), o AZT interfere com a expressão de genes indutíveis, enquanto a transcrição de genes constitutivos, que estão relacionados com a manutenção do metabolismo basal, não sofre alterações significativas.

A produção de partículas de vírus da influenza A (família *Orthomyxoviridae*) requer a participação de diferentes elementos celulares, conforme pode ser constatado pela observação do modelo esquemático de biossíntese dos componentes dos vírus da

influenza A [Figura 1.8]. Por isso, é essencial a viabilidade de funções distintas, tais como: endocitose, síntese protéica no retículo endoplasmático, glicosilação de proteínas no complexo de Golgi, e endereçamento e transporte de proteínas para diferentes compartimentos celulares. A transcrição do genoma dos vírus da influenza A também depende da disponibilidade de mRNAs celulares, cujo 5'-cap é clivado pela RNA polimerase RNA-dependente associada aos RNAs genômicos virais. Os oligonucleotídeos resultantes são utilizados com *primers* para a síntese de mRNAs virais (Cianci, Tiley & Krystal, 1995). Dessa forma, os vírus da influenza A foram utilizados como ferramentas para avaliar o metabolismo basal das células Vero tratadas com AZT, principalmente em consideração à transcrição de mRNA e à síntese e o endereçamento de proteínas.

Em contraste com efeitos adversos na síntese de DNA, de RNA, e de proteínas em linfócitos e células da medula óssea provocados pelo AZT, as células Vero foram capazes de produzir partículas dos vírus da influenza A na presença desta droga, como mostrado na Tabela 5.3. Mais especificamente, estes resultados também sugerem que estas células foram capazes de produzir partículas virais infecciosas, pois nas maiores diluições da amostra viral utilizada, em que o inóculo é pequeno, poucas células da cultura são inicialmente infectadas. Conforme aumenta o número de células infectadas, através de múltiplos ciclos de infecção, também ocorre o aumento da massa viral, que pode ser, então, detectada no sobrenadante destas culturas por hemaglutinação. Uma vez que as culturas de células Vero tratadas com AZT, na presença de tripsina, suportaram múltiplos ciclos de infecção, pressupõe-se que estas células foram capazes de produzir virions e, por isso, todos os componentes dos vírus da influenza A.

Dessa forma, foi concluído que os processos metabólicos citados anteriormente, que são essenciais para a produção de partículas deste tipo viral, mantiveram-se funcionais nas células tratadas com AZT.

De uma forma geral, os resultados apresentados e discutidos nesta dissertação indicam que o AZT interfere com o ciclo de divisão de células Vero apenas em doses maiores que as concentrações plasmáticas atingidas em pacientes sob tratamento. Por outro lado, as variações nas cinéticas de inibição da proliferação definidas com culturas mantidas em meio 199 e em MEM possibilitou a conclusão de que a sensibilidade das células Vero ao AZT é modulada pela composição do meio em que são cultivadas. Dessa forma, torna-se interessante avaliar se a utilização de meios contendo derivados de nucleotídeos aumentaria a sensibilidade dos ensaios em que culturas de células eucarióticas são utilizadas para avaliar a atividade bioquímica exercida pelo AZT.

7. REFERÊNCIAS:

- ARELLANO, M., MORENO, S., 1997. Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 559-573.
- ATCC (American Type Culture Collection), 2005. Disponível em <http://www.atcc.org>.
- AVALOS, R.T., YU, Z., NAYAK, D.P., 1997. Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal elements in influenza virus-infected cells. *J. Virol.* 71 (4), 2947-2958.
- BARMAN, S., ALI, A., HUI, E.K.-W., ADHIKARY, L., NAYAK, D.P., 2001. Transport of viral proteins to the apical membranes and interaction of matrix protein with glycoproteins in the assembly of influenza viruses. *Virus Res.* 77, 61-69.
- BARRY, M.G.; KHOO, S.H.; VEAL, G.J.; HOGGARD, P.G.; GIBBONS, S.E.; WILKINS, E.G.L; WILLIAMS, O.; BRECKENRIDGE, A.M., BACK, D.J., 1996. The effect of zidovudine dose on the formation of intracellular phosphorylated metabolites. *AIDS* 10, 1361-1367.
- BENBRIK, E., CHARIOT, P., BONAUAUD, S., AMMI-SAID, M., FRISDAL, E., REY, C., GHERARDI, R., BARLOVATZ-MEIMON, G., 1997. Cellular and mitochondrial toxicity of zidovudine (AZT), didanosine (ddl) and zalcitabine (ddC) on cultured human muscle cells. *J. Neurol. Sci.* 149 (1), 19-25.
- BISWAS, S.K., BOUTZ, P.L., NAYAK, D.P., 1998. Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *J. Virol.* 72 (7), 5493-5501.
- BRIDGES, E.G., FARAJ, A., SOMMADOSSI, J.P., 1993. Inhibition of mammalian DNA polymerase-associated 3' to 5' exonuclease activity by 5'-monophosphates of 3'-azido-3'-deoxythymine and 3'-amino-3'-deoxythymidine. *Biochem. Pharmacol.* 45 (8), 1571-1576.
- CASIDAY, R., FREY, R., 2001. Drug Strategies to Target HIV: Enzyme Kinetics and Enzyme Inhibitors. URL: <http://www.chemistry.wustl.edu/~edudev/LabTutorials/HIV/DrugStrategies.html>
- CHEN, Z., LI, Y., KRUG, R.M., 1999. Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *EMBO J.* 18 (8), 2273-2283.

- CIANCI, C., TILEY, L., KRYSTAL, M., 1995. Differential activation of influenza virus polymerase via template RNA binding. *J. Virol.* 69 (7), 3995-3999.
- CRISMAN, H.A., DARZYNKIEWICZ, Z., TOBEY, R.A., STEINKAMP, J.A., 1985. Correlated measurements of DNA, RNA, and protein in individual cells by flow cytometry. *Science* 228, 1321-1324.
- DALAKAS, M.C., ILLA, I., PEZESHKPOUR, G.H., LAUKAITIS, J.P., COHEN, B., GRIFFIN, J.L., 1990. Mitochondrial myopathy caused by long-term zidovudine therapy. *N. Engl. J. Med.* 322 (16), 1098-1105.
- ERIKSSON, S., MUNCH-PETERSEN, B., JOHANSSON, K., EKLUND, H., 2002. Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1327-1346.
- ESPÍNDOLA, O.M. 2003. Interação vírus da influenza A – macrófagos murinos: análise da indução de TNF-alfa. Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes/UFRJ para obtenção do grau de bacharel em Microbiologia e Imunologia.
- EVANS, T., ROSENTHAL, E.T., YOUNGBLOM, J., DISTEL, D., HUNT, T., 1983. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33, 389-396.
- FLECK, O., NIELSEN, O., 2004. DNA repair. *J. Cell Sci.* 117, 515-517.
- FLINT, S.J., ENQUIST, L.W., KRUG, R.M., RACANIELLO, V.R., SKALKA, A.M., 2000. Principles of virology: molecular biology, pathogenesis, and control. 1ª edição. Ed. ASM Press, Washington D.C., Estados Unidos.
- FRESHNEY, R.I., 1987. Quantitation and Experimental design. In: Culture of animal cells - a manual of basic technique. 2ª edição. Wiley-Liss, New York, Estados Unidos. pp. 227-244.
- FRIDLAND, A., CONNELLY, M.C., ASHMUN, R., 1990. Relationship of deoxynucleotide changes to inhibition of DNA synthesis induced by the antiretroviral agent 3'-azido-3'-deoxythymidine and release of its monophosphate by human lymphoid cells (CCRF-CEM). *Mol. Pharmacol.* 37 (5), 665-670.

- FUJIYOSHI, Y., KUME, N.P., SAKATA, K., SATO, S.B., 1994. Fine structure of influenza A virus observed by electron cryo-microscopy. *EMBO J.* 13 (2), 318-326.
- FURMAN, P.A., FYFE, J.A., ST CLAIR, M.H., WEINHOLD, K., RIDEOUT, J.L., FREEMAN, G.A., LEHRMAN, S.N., BOLOGNESI, D. P., BRODER, S. MITSUYA, H., 1986. Phosphorilation 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.
- GARCÍA-SASTRE, A., 2001. Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses. *Virology* 279, 375-384.
- GARRET, R.H., GRISHAM, C.M., 1999. The synthesis and degradation of nucleotides. In: *Biochemistry*, 2^a ed., Saunders College Publishing. Estados Unidos. pp. 829-926.
- GÓMEZ-PUERTAS, P., ALBO, C., PÉREZ-PASTRANA, E., VIVO, A., PORTELA, A., 2000. Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J. Virol.* 74 (24), 11538-11547.
- GUINEA, R., CARRASCO, L., 1995. Requirement for vacuolar proton-atpase activity during entry of influenza virus into cells. *J. Virol.* 69 (4), 2306-2312.
- HANKS, J.H., WALLACE, R.E., 1949. Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 71, 196-200.
- HARRINGTON, J.A., REARDON, J.E., SPECTOR, T., 1993. 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) monophosphate: an inhibitor of exonucleolytic repair of AZT-terminated DNA. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 918-920.
- HEAGY, W., CRUMPACKER, C., LOPEZ, P.A., FINBERG, R.W., 1991. Inhibition of immune functions by antiviral drugs. *J. Clin. Invest.* 87, 1916-1924.
- HELENIUS, A., COPELAND, C.S., BOULAY, F., DOMS, R.W., 1987. Intracellular transport of influenza hemagglutinin: role of trimerization and conformational alterations. *Chem. Scrip.* 27B, 229-236.
- HENKEL, J.R., WEISZ, O.A., 1998. Influenza virus M2 protein slows traffic along the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 273 (11), 6518-6524.
- HITOMI, M., STACEY, D.W., 2001. Ras-dependent cell cycle commitment during G2 phase. *FEBS Lett.* 490, 123-131.

- HORWITZ, J.P., CHUA, J., NOEL, M., 1964. Nucleosides .5. monomesylates of 1-[2]-deoxy-beta-D-lyxofuranosyl) thymidine. *J. Org. Chem.* 29 (7), 2076.
- HÜBSCHER, U., MAGA, G., SPADARI, S., 2002. Eukaryotic DNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 133-163.
- HUET, O., PETIT, J.M., RATINAUD, M.H., JULIEN, R., 1992. NADH-dependent dehydrogenase activity estimation by flow cytometric analysis of 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Cytometry* 13 (5), 532-539.
- IRNIGER, S., 2002. Cyclin destruction in mitosis: a crucial task of Cdc20. *FEBS Lett.* 532, 7-11.
- JOHNSON, D.G., SCHNEIDER-BROUSSARD, R., 1998. Role of E2F in cell cycle control and cancer. *Front. Biosci.* 3, 447-458.
- JOHNSON, D.G., WALKER, C.L., 1999. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 295-312.
- KE, P.Y., CHANG, Z.F., 2004. Mitotic degradation of human thymidine kinase 1 is dependent on the anaphase-promoting complex/cyclosome-cdh1-mediated pathway. *Mol. Cell. Biol.* 24, 514-526.
- KILBOURNE, E.D., 1969. Future influenza vaccines and the use of genetic recombinants. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 41, 643-45.
- KING, R.W., JACKSON, P.K., KIRSCHNER, M.W., 1994. Mitosis in transition. *Cell* 79, 563-571.
- KLENK, H.D., ROTT, R., ORLICH, M., BLODORN, J., 1975. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology* 68 (2), 426-39.
- LAKADAMYALI, M., RUST, M.J., ZHUANG, X., 2004. Endocytosis of influenza viruses. *Microb. Infect.* 6, 929-936.
- LANGTRY, H.D., CAMPOLI-RICHARDS, D.M., 1989. Zidovudine: a review on its pharmacodynamics and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs* 37, 408-450.

- LAVIE, A., SCHLICHTING, I., VETTER, I.R., KONRAD, M., REINSTEIN, J., GOODY, R.S., 1997. The bottleneck in AZT activation. *Nat. Med.* 3 (8), 922-924.
- LI, Y., YAMAKITA, Y., KRUG, R.M., 1998. Regulation of a nuclear export signal by an adjacent inhibitory sequence: the effector domain of the influenza virus NS1 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4864-4869.
- LIM, S.E., COPELAND, W.C., 2001. Differential incorporation and removal of antiviral deoxynucleotides by human DNA polymerase γ . *J. Biol. Chem.* 276 (26), 23616-23623.
- LIN, T.-S., PRUSSOFF, W.H., 1978. Synthesis and biological activity of several amino analogues of thymidine. *J. Med. Chem.* 21 (1), 109-112.
- LINKE, S.P., CLARKIN, C.K., LEONARDO, A.D., TSOU, A., WAHL, G.M., 1996. A reversible, p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. *Genes Dev.* 10, 934-947.
- LIU, C., EICHELBERGER, M.C., COMPANS, R.W., AIR, G.M., 1995. Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. *J. Virol.* 69 (2), 1099-1106.
- LU, Y., WAMBACH, M., KATZE, M.G., KRUG, R.M., 1995. Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. *Virology* 214, 222-228.
- MARTIN, K., HELENIUS, A., 1991. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* 67, 117-130.
- MEYER, P.R., MATSUURA, S.E., MIAN, A.M., SO, A.G., WALTER, A.S., 1999. A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Mol. Cell* 4, 35-43.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004. Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV - 2004. Secretaria de Vigilância Sanitária em Saúde – Programa Nacional de DST e AIDS. URL: http://www.aids.gov.br/final/biblioteca/adulto_2004/consenso.doc.

- MITSUYA, H., WEINHOLD, K.J., FURMAN, P.A., St. CLAIR, M.H., LEHRMAN, N.S., GALLO, R.C., BOLOGNESI, D., BARRY, D.W., BRODER, S., 1985. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): 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.
- MOSMANN, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65, 55-63.
- NAEGER, L.K., MARGOT, N.A., MILLER, M.D., 2002. ATP-dependent removal of nucleoside reverse transcriptase inhibitors by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (7), 2179-2184.
- NELSON, D.L., COX, M.M., 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3ª edição. Worth Publishers, New York, Estados Unidos.
- NICKEL, W., AUSTERMANN, S., BIALEK, G., GROSSE, F., 1992. Interactions of azidothymidine triphosphate with the cellular DNA polymerases α , δ , ϵ and with DNA primase. *J. Biol. Chem.* 267 (2), 848-854.
- NICOLETTI, I., MIGLIORATI, G., PAGLIACCI, M.C., GRIGNANI, F., RICCARDI, C., 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Meth.* 139 (2), 271-279.
- NURSE, P., BISSETT, Y., 1981. Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature* 292, 558-560.
- NYBERG, K.A., MICHELSON, R.J., PUTNAM, C.W., WEINERT, T.A., 2002. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu. Rev. Genet.* 36, 617-656.
- O'CONNELL, M.J., CIMPRICH, K.A., 2005. G2 damage checkpoints: what is the turn-on? *J. Cell Sci.* 118, 1-6.
- O'NEIL, R.E., JASKUNAS, R., BLOBEL, G., PALESE, P., MOROIANU, J., 1995. Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *J. Biol. Chem.* 270, 22701-22704.
- O'NEIL, R.E., TALON, J., PALESE, P., 1998. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J.* 17, 288-296.

- OH, S., MCCAFFERY, J.M., EICHELBERGER, M.C., 2000. Dose-dependent changes in influenza virus-infected dendritic cells result in increased allogeneic T-cell proliferation at low, but not high, doses of virus. *J Virol.* 74 (12), 5460-5469.
- OHTSUBO, M., THEODORAS, A.M., SCHUMACHER, J., ROBERTS, J.M., PAGANO, M., 1995. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2612-2624.
- OLIVERO, O.A., TEJERA, A.M., FERNANDEZ, J.J., TAYLOR, B.J., DAS, S., DIVI, R.L., POIRIER, M.C., 2005. Zidovudine induces S-phase arrest and cell cycle gene expression changes in human cells. *Mutagenesis* 20 (2), 139-146.
- OSTERMANN, N., LAVIE, A., PADIYAR, S., BRUNDIERS, R., VEIT, T., REINSTEIN, J., GOODY, R.S., KONRAD, M., SCHLICHTING, I., 2000. Potentiating AZT activation: structures of wild-type and mutant human thymidilate quinase suggest reasons for the mutants' improved kinetics with the HIV prodrug metabolite AZTMP. *J. Mol. Biol.* 304 (1), 43-53.
- PAN-ZHOU, X.R., CUI, L., ZHOU, X.J., SOMMADOSSI, J.P., DARLEY-USMAR, V.M., 2000. Differential effects of antiretroviral nucleoside analogs on mitochondrial function in HepG2 cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 (3), 496-503.
- PATTNAIK, A.K., BROWN, D.J., NAYAK, D.P., 1986. Formation of influenza virus particles lacking hemagglutinin on the viral envelope. *J. Virol.* 60 (3), 994-1001.
- PLOTCH, S.J., KRUG, R.M., 1986. In vitro splicing of influenza viral NS1 mRNA and NS1-beta-globin chimeras: possible mechanisms for the control of viral mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (15), 5444-5448.
- PLOTCH, S.J., O'HARA, B., MORIN, J., PALANT, O., LAROCQUE, J., BLOOM, J.D., LANG JR., S.A., DIGRANDI, M.J., BRADLEY, M., NILAKANTAN, R., GLUZMAN, Y., 1999. Inhibition of influenza A virus replication by compounds interfering with the fusogenic function of the viral hemagglutinin. *J. Virol.* 73 (1), 140-151.
- PONTARIN, G., GALLINARO, L., FERRARO, P., REICHARD, P., BIANCHI, V., 2003. Origins of mitochondrial thymidine triphosphate: dynamic relations to cytosolic pools. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 100 (21), 12159-12164.

- PRITLOVE, D.C., POON, L.M., FODOR, E., SHARPS, J., BROWNLEE, G.G., 1998. Polyadenylation of influenza virus mRNA transcribed in vitro from model virion RNA templates: requirement for 5' conserved sequences. *J. Virol.* 72 (2), 1280-1286.
- QIU, Y., NEMEROFF, M., KRUG, R.M., 1995. The influenza virus NS1 protein binds to a specific region in human U6 snRNA and inhibits U6-U2 and U6-U4 snRNA interactions during splicing. *RNA* 1, 304-316.
- REED, L.J., MUENCH, H., 1938. A simple method of estimating 50 per cent end point. *Am. J. Hyg.* 27, (39), 493-497.
- RICHMAN, D.D., 2001. HIV chemotherapy. *Nature* 410 (6831), 995-1001.
- ROBERTS, J.D., BEBENEK, K., KUNKEL, T.A., 1988. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 242, 1171-1173.
- ROSENTHAL, E.T., HUNT, T., RUDERMAN, J.V., 1980. Selective translation of mRNA controls: the pattern of protein synthesis during early development of the surf clam, *Spisula solidissima*. *Cell* 20, 487-494.
- ROWE, T.C., WEISSING, V., LAWRENCE, J.W., 2001. Mitochondrial DNA metabolism targeting drugs. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 49 (1-2), 175-187.
- SAITO, T., TAYLOR, G., WEBSTER, R.G., 1995. Steps in maturation of influenza A virus neuraminidase. *J. Virol.* 69 (8), 5011-5017.
- SALVATORE, M., BASLER, C.F., PARISIEN, J.-P., HORVATH, C.M., BOURMAKINA, S., ZHENG, H., MUSTER, T., PALESE, P., GARCÍA-SASTRE, A., 2002. Effects of influenza A virus NS1 protein on protein expression: the NS1 protein enhances translation and is not required for shutoff of host protein synthesis. *J. Virol.* 76 (3), 1206-1212.
- SEKSEK, O., BIWERSI, J., VERKMAN, A.S., 1995. Direct measurement of trans-golgi pH in living cells and regulation by second messengers. *J. Biol. Chem.* 270 (10), 4967-4970.
- SHIH, S.-R., KRUG, R.M., 1996. Novel exploitation of a nuclear function by influenza virus: the cellular SF2/ASF splicing factor controls the amount of the essential viral M2 ion channel protein in infected cells. *EMBO J.* 15 (19), 5415-5427.

- SIECZKARSKI, S.B., WHITTAKER, G.R., 2002. Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* 76 (20), 10455-10464.
- SOGO, J.M., LOPES, M., FOIANI, M., 2002. Fork reversal and ssDNA accumulation of stalled replication forks owing to checkpoints defects. *Science* 297, 599-602.
- SOMMADOSSI, J.-P., CARLISLE, R., 1987. Toxicity of 3'-azido-3'-deoxythymidine and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine for normal human hematopoietic progenitor cells in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31 (3), 452-454.
- SOMMADOSSI, J.P., CARLISLE, R., ZHOU, Z., 1989. Cellular pharmacology of 3'-azido-3'-deoxythymidine with evidence of incorporation into DNA of human bone marrow cells. *Mol. Pharmacol.* 36 (1), 9-14.
- SOUZA, M.V.N., ALMEIDA, M.V., 2002. Drogas anti-VIH: passado, presente e perspectivas futuras. *Quim. Nova*, 26 (3): 366-372.
- STEITZ, T.A., 1999. DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *J. Biol. Chem.* 274 (25), 17395-17398.
- SZONDY, Z., NEWSHOLME, E.A., 1990. The effect of various concentrations of nucleobases, nucleosides or glutamine on the incorporation of [³H]thymidine into DNA in rat mesenteric-lymph-node lymphocytes stimulated by phytohaemagglutinin. *Biochem. J.* 270, 437-440.
- TAKEDA, M., PEKOSZ, A., SHUCK, K., PINTO, L.H., LAMB, R.A., 2002. Influenza A virus M2 ion channel activity is essential for efficient replication in tissue culture. *J. Virol.* 76 (3), 1391-1399.
- TASHIRO, M., CIBOROWSKI, P., REINACHER, M., PULVERER, G., KLENK, H.-D., ROTT, R., 1987. Synergistic role of staphylococcal proteases in the induction of influenza virus pathogenicity. *Virology* 157, 421-430.
- VALCÁRCEL, J., PORTELA, A., ORTÍN, J., 1991. Regulated M1 mRNA splicing in influenza virus-infected cells. *J. Gen. Virol.* 72, 1301-1308.
- VAN DILLA, M.A., TRUJILLO, T.T., MULLANEY, P.F., COULTER, J.R., 1969. Cell microfluorometry: a method for rapid fluorescence measurement. *Science* 163, 1213-1214.

- VERMEULEN, K., BOCKSTAELE, D.R., BERNEMAN, Z.N., 2003. The cell cycle: a review of deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 36, 131-149.
- VIORA, M., CAMPONESCHI, B., D'AMBROSIO, A., DI CARLO, S., BACOSI, A., ZUCCARO, P., PACIFICI, R., 1994a. Zidovudine effects on murine and human immune responses. *Immunol. Infec. Dis.* 4, 47-53.
- VIORA, M., CAMPONESCHI, B., D'AMBROSIO, A., DI CARLO, S., BACOSI, A., ZUCCARO, P., PACIFICI, R., 1994b. Modulatory effects of ddC and AZT/ddC combination on murine and human immune responses. *Cell. Pharmacol.* 1, 263-268.
- VIORA, M., DI GENOVA, G., RIVABENE, R., MALORNI, W., FATTOROSSO, A., 1997. Interference with cell cycle progression and induction of apoptosis by dideoxynucleoside analogs. *Int. J. Immunopharmac.* 19 (6), 311-321.
- WAGA, S., BAUER, G., STILLMAN, B., 1994. Reconstitution of complete SV40 DNA replication with purified replication factors. *J. Biol. Chem.* 269, 10923-10934.
- WAHLE, E., KELLER, W., 1996. The biochemistry of polyadenylation. *Trends Biochem. Sci.* 21, 247-250.
- WAKEFIELD, J.G., HUANG, J.Y., RAFF, J.W., 2000. Centrosomes have a role in regulating the destruction of cyclin B in early *Drosophila* embryos. *Curr. Biol.* 10, 1139-1149.
- WANG, X., LI, M., ZHENG, H., MUSTER, T., PALESE, P., BEG, A.A., GARCÍA-SASTRE, A., 2000. Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF- κ B and induction of alpha/beta interferon. *J. Virol.* 74 (3), 11566-11573.
- WEIDNER, D.A., SOMMADOSSI, J.-P., 1990. 3'-Azido-3'-deoxythymidine inhibits globin gene transcription in butyric acid-induced K-562 human leukemia cells. *Mol. Pharmacol.* 38, 797-804.
- WELIN, M., KOSINSKA, U., MIKKELSEN, N.-E., CARNROT, C., ZHU, C., WANG, L., ERIKSSON, S., MUNCH-PETERSEN, B., EKLUND, H., 2004. Structures of thymidine kinase 1 of human and mycoplasmic origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (52), 17970-17975.
- WHITTAKER, G.R., 2001. Intracellular trafficking of influenza virus: clinical implications for molecular medicine. Disponível em <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>.

ZÜRCHER, T., MARIÓN, R.M., ORTÍN, J., 2000. Protein synthesis shut-off induced by influenza virus infection is independent of PKR activity. *J. Virol.* 74, 8781-8784.