



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

Luiz Henrique Campos Holanda

**ANÁLISE CONFORMACIONAL DA ENZIMA PROTEASE DO HIV-1
RELACIONADA À RESISTÊNCIA AO INIBIDOR NELFINAVIR**

Belém - Pará

2017

LUIZ HENRIQUE CAMPOS HOLANDA

**ANÁLISE CONFORMACIONAL DA ENZIMA PROTEASE DO HIV-1
RELACIONADA À RESISTÊNCIA AO INIBIDOR NELFINAVIR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof. Dra. Maísa Silva de Sousa
Co-orientador: Prof. Dr. Jerônimo Lameira Silva

Belém - Pará

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFPA

Holanda, Luiz Henrique Campos

Análise conformacional da enzima protease do HIV-1 relacionada à resistência ao inibidor nelfinavir / Luiz Henrique Campos Holanda; orientadora, Maísa Silva de Sousa co-orientador, Jerônimo Lameira Silva. — 2017.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 2017.

1. HIV - 1. 2. Protease. 3. Nelfinavir I. Sousa, Maisa Silva de, orient. II. Silva, Jerônimo Lameira, co-orientador.III. Título.

CDD - 22. ed. 616.9792

FOLHA DE APROVAÇÃO

LUIZ HENRIQUE CAMPOS HOLANDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof Dra. Maísa Silva de Sousa

Banca Avaliadora:

Prof Dra. Rita Catarina Medeiros Souza, Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Núcleo de Medicina Tropical

Prof Dra. Gleiciane Leal Moraes Pinheiro, Universidade Federal do Pará, Faculdade de Ciências Naturais, Campus Marajó.

Prof Dra. Luciana Pereira Xavier Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas.

Belém – Pará

2017

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, João Carlos Amaral Holanda e Rozana de Fátima Matos Campos, à minha orientadora Máisa Silva de Souza, meu co-orientador Jerônimo Lameira e à todos que de alguma forma contribuíram nessa pós graduação.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a toda a minha família, a professora Máisa que esteve do meu lado desde 2012 ao professor Jerônimo por todo o suporte, ao Guelber e a Gleici que me guiaram nos procedimentos metodológicos e a todos os amigos dos Laboratórios de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos e Biologia Molecular, ao programa e todos os professores de Pós graduação em Doenças Tropicais (Patologia).

RESUMO

O Vírus da imunodeficiência humana (HIV), causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), é um retrovírus que possui glicoproteínas altamente virulentas que invadem o linfócito TCD4+ através de seus receptores CCR4 e CXCR5. O ciclo biológico do HIV é mediado pelas enzimas protease, transcriptase e integrase. A HIV-1 protease é uma enzima que está presente na fase final do ciclo biológico, onde ocorre a maturação do vírus e é um importante alvo farmacológico. O objetivo principal deste projeto é verificar os efeitos das mutações D30N, I84A e M46I na enzima protease HIV-1 e na formação do complexo com o inibidor nelfinavir através de técnicas de dinâmica molecular e bioinformática. Os resultados baseados nas análises estruturais mostraram diferenças estruturais entre os sistemas estudados. O sistema 1OHR apresentou uma conformação fechada, os sistemas D30N e D30N_I84A_M46I apresentaram conformação semi-aberta e o sistema D30N_I84A apresentou conformação aberta, em que o último apresentou menor valor de energia livre e maior instabilidade nas análises de RMSD, porém a maior flutuação de resíduos de aminoácidos. As análises teóricas mostraram a importância na resistência da dupla mutação D30N_I84A e a capacidade de reestruturação conformacional da mutação M46I e capacidade catalítica.

Palavras chave: HIV, Protease, Nelfinavir, Dinâmica Molecular, Mutações

ABSTRACT

The Human Immunodeficiency Virus (HIV), which causes acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), is a retrovirus that has highly virulent glycoproteins that invade the CD4 + T lymphocyte through its CCR4 and CXCR5 receptors. The biological cycle of HIV is mediated by the protease, transcriptase and integrase enzymes. HIV-1 protease is an enzyme that is present in the final phase of the biological cycle, where virus maturation occurs, and is an important pharmacological target. The main objective of this project is to verify the effects of the D30N, I84A and M46I mutations on the HIV-1 protease enzyme and the complex formation with the nelfinavir inhibitor through molecular dynamics and bioinformatics techniques. The results based on the structural analyzes showed structural differences between the studied systems. The 1OHR system presented a closed conformation, the systems D30N and D30N_I84A_M46I presented semi-open conformation and the D30N_I84A system presented open conformation, in which the latter presented lower free energy value and greater instability in the RMSD analyzes, however the greater flotation of residues Of amino acids. The theoretical analyzes showed the importance in the resistance of the double mutation D30N_I84A and the conformational restructuring capacity of the M46I mutation and catalytic capacity.

Keywords: HIV, Protease, Nelfinavir, Molecular Dynamics, Mutation

Abreviatura e Siglas

A - Alanina

AIDS – *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)

AZT – Zidovudina

APV – Amprenavir

ASP – Aspartato

ASC – Área de Superfície Corporal

ARV – Retrovírus Associado à AIDS

CCR5 – Receptor de Quimiocina tipo 5

CPPTRAJ - *Complementary Program to PTRAJ* (Programa complementar ao PTRAJ)

CRF – Formas Recombinantes Circulantes

CXCR4 – receptor de Quimiocina tipo 4

CYP – Citocromo

D - Aspartato

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DST – Doença Sexualmente Transmissível

ENV – Envelope

F – Fenilalanina

FDA – *Food And Drug Administration*

G – Glicina

GP – Glicoproteína

GAG - *Group Specific Antigen*

GLY – Glicina

HAART - *Highly Active Antiretroviral Therapy*

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HTLV - Vírus linfotrópico Humano

HSM - Homem que faz sexo com Homem

I – Isoleucina

IC – Concentração Inibitória

ICTV – Comitê internacional de Taxonomia Viral

IDV - indinavir

IF – Inibidor de Fusão
IN – Inibidor de Integrase
IST – Infecção Sexualmente Transmissível
IP – Inibidor de Protease
ITRN's – Inibidor de Transcriptase Reversa Nucleosídeo
ITRNN's - Inibidor de Transcriptase Reversa não Nucleosídeo
K - *Kelvin*
LAV – Vírus Associado Linfadenopatia
L – Leucina
LTR – Repetição Terminal longa
LPV - Lopinavir
M - Metionina
MA – Matriz Proteica
MHC – *Major Histocompatibility Complex* (Complexo principal de histocompatibilidade)
mg – Miligrama
M8 – Hidróxido de Butilamida
mRNA – RNA Mensageiro
N - Asparagina
NEF – *Negative Factor* (Fator negativo)
nM – Nanomols
ns – Nanossegundos
PDB – *Protein Data Bank*
PIC – Complexo de Pré-Integração
PMEMD - *Particle Mesh Ewald Molecular Dynamics* (Partículas de Ewald para dinâmica molecular)
POL – Polimerase
PR – Protease
REV – *Regulator of Expression of Virion Protein* (Regulador da expressão de proteína viral)
RMN - Ressonância Magnética Nuclear
RMSD – *Root Mean Square Deviation* (Desvios quadráticos médios)

RMSF – *Root Mean Square Fluctuation* (Flutuação média quadrática)

RNA – Ácido Ribonucleico

RRE – *REV Resnponse Element* (Elemento de resposta REV)

S – Serina

SANDER - *Simulated Annealing with NMR-Derived Energy Restraints* (Anelamento Simulado com Restrições de Energia Derivadas de RMN)

SIV – Vírus da Imunodeficiência Símia

T – Treonina

TAR - *Trans-Actvation Response Element* (Elemento de resposta a Transativação)

THR – Treonina

TAT – *Transcription Transactivation* (Transativação de transcrição)

TR – Transcriptase Reversa

TRNA – RNA de Transcrição

URF – Formas Recombinantes Únicas

V – Valina

VIF - *Viral infectivity Factor* (Fator de infectividade viral)

VPR – *Viral Protein R* (Proteína Viral R)

VPU – *Viral Protein U* (Proteína viral U)

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Morfologia do HIV..... | 19 |
| Figura 2: Ciclo biológico do HIV com o envolvimento das principais proteínas..... | 22 |
| Figura 3: Virus maduro do HIV com representação de suas proteínas virais e estruturais. SU (glicoproteína de superfície), TM (Proteína da transmembrana) MA (matriz proteica), CA (proteína o capsídeo) NC (proteína do nucleocapsídeo) PR (protease), TR (transcriptase reversa) IN (integrase) <i>nef</i> (proteínas acessórias)..... | 23 |
| Figura 4: Estrutura da enzima protease do HIV-1..... | 24 |
| Figura 5: Diferença da estrutura da enzima protease do HIV em sua conformação semi-aberta sem o ligante, e sua conformação fechada, com um inibidor no sítio ativo da enzima..... | 25 |
| Figura 6: Protease do HIV-1 em complexo com um polipeptídeo..... | 26 |
| Figura 7: Ilustração do sítio catalítico da HIV-protease. As regiões S e S' reconhecem os resíduos de aminoácidos da enzima, enquanto que P e P' identificam os resíduos de aminoácidos do substrato. A parte destacada ilustra o local da clivagem do substrato ligado a enzima..... | 27 |
| Figura 8: Estrutura química dos aminoácidos aspartato e asparagina..... | 28 |
| Figura 9: Estrutura química respectivamente dos aminoácidos metionina (M) e isoleucina (I)..... | 29 |
| Figura 10: Estrutura química da Isoleucina e estrutura química da Alanina..... | 30 |
| Figura 11: Esquema entre as mutações que podem ocorrer na enzima protease do HIV-1 e o seu coeficiente em relação a resistência sobre todos os inibidores de protease, incluindo o Nelfinavir. A mutação I84A tem um destaque devido a demonstrar um grande impacto na estrutura da enzima dificultando a interação com a proteína em todos os inibidores de protease..... | 30 |
| Figura 12: Estrutura dos inibidores de protease..... | 32 |
| Figura 13: Estrutura do fármaco AZT..... | 35 |
| Figura 14: Formas recombinantes de HIV..... | 37 |
| Figura 15: Contribuições estruturais para uma determinada molécula..... | 41 |
| Figura 16: Sobreposição da estrutura da Protease do HIV-1 na sua forma..... | 45 |
| Figura 17: RMSD dos 40ns de dinâmica molecular da protease do HIV-1 em sua forma nativa sem inibidor (coloração preta) e na sua forma nativa com inibidor (coloração vermelha)..... | 46 |

| | |
|---|----|
| Figura 18: RMSF dos 198 resíduos de aminoácidos da protease do HIV-1 em sua forma nativa sem inibidor (em preta) e na sua forma nativa com inibidor (em vermelho)..... | 47 |
| Figura 19: Sobreposição das estruturas 1OHR (Nativa com inibidor em verde) e D30N (enzima com mutação no resíduo 30 em verde)..... | 48 |
| Figura 20 RMSD dos 40ns de dinâmica molecular da protease do HIV-1 em sua forma nativa com inibidor (em preto) e com a mutação D30N (em vermelho)..... | 49 |
| Figura 21: RMSF dos 198 resíduos de aminoácidos da protease do HIV-1 em sua forma nativa com inibidor (coloração preta) e com a mutação D30N (coloração vermelha)..... | 50 |
| Figura 22: RMSD dos 40ns de dinâmica molecular da protease do HIV-1 com a mutação D30N (em preto) e com a dupla mutação D30N_I84A (em vermelho). | |
| Figura 23: RMSF dos 198 resíduos de aminoácidos da protease do HIV-1 com a mutação D30N (coloração preta) e com a dupla mutação D30N_I84A (coloração vermelha)..... | 52 |
| Figura 24: Sobreposição da estrutura da protease do HIV-1 com a mutação D30N_I84A_M46I (em azul) e com a tripla mutação D30N_I84A_M46I (em verde). | 54 |
| Figura 25: RMSD dos 40ns de dinâmica molecular da protease do HIV-1 com a tripla mutação D30N_I84A_M46I (em preto) e com a dupla mutação D30N_I84A (em vermelho)..... | 55 |
| Figura 26: RMSF dos 198 resíduos de aminoácidos da protease do HIV-1 com a mutação D30N_I84A_M46I (em preto) e com a dupla mutação D30N_I84A (em vermelho)..... | 56 |
| Figura 27: RMSD dos 40ns de dinâmica molecular da protease do HIV-1 com a mutação D30N (em preto) e com a dupla mutação D30N_I84A (em vermelho) e a tripla mutação D30N_I84A_M46I (em verde)..... | 57 |
| Figura 28: RMSF dos 198 resíduos de aminoácidos da protease do HIV-1 com a mutação D30N (em preto), com a dupla mutação D30N_I84A (em vermelho) e a tripla mutação D30N_I84A_M46I..... | 58 |
| Figura 29: Formas apresentadas pelo Nelfinavir no final dos 40ns de dinâmica dos respectivos sistemas abordados 1OHR, D30N, D30N_I84A e D30N_I84A_M46I..... | 59 |
| Figura 30: Cavidade do sítio ativo da Protease do HIV-1 e suas principais interações com o Inibidor Nelfinavir..... | 60 |

Lista de Tabelas

Tabela 1: Mutações mais comuns em relação a significado clínico. Os aminoácidos destacados em vermelho correspondem aos maiores níveis de resistência fenotípica e/ou evidência clínica mais forte para interferir com a terapia de inibição da protease bem sucedida.....30

Tabela 2: Distância em angstroms entre os átomos dos aminoácidos que constituem a protease do HIV-1 e os átomos que constituem o Nelfinavir.....60

Tabela 3: Valores dos resultados de energia livre de cada sistema da protease do HIV-1 com o Nelfinavir.....60

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 3. REFERENCIAL TEÓRICO | 15 |
| 3.1 A SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (SIDA)..... | 15 |
| 3.2 O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)..... | 17 |
| 3.3 Ciclo replicativo do HIV | 19 |
| 3.3.1 Etapa inicial da replicação viral (<i>Early phase</i>) | 19 |
| 3.3.2 Fase tardia da replicação viral..... | 21 |
| 3.4 Protease do HIV-1 | 23 |
| 3.5. Principais mutações que conferem resistência ao Nelfinavir..... | 27 |
| 3.6 Inibidores de protease (IP) | 32 |
| 3.7 Mecanismo de ligação do inibidor | 33 |
| 3.8 Fármacos anti-HIV | 34 |
| 3.8.1 Terapia antirretroviral | 35 |
| 3.8.2 Terapia antirretroviral altamente ativa | 35 |
| 3.9 Formas recombinantes..... | 36 |
| 4. JUSTIFICATIVA | 38 |
| 5. OBJETIVOS | 39 |
| 5.1 Objetivo Geral | 39 |
| 5.2 Objetivos específicos | 39 |
| 6. METODOLOGIA | 40 |
| 10. REFERÊNCIAS | 70 |

1. INTRODUÇÃO

O Vírus da Imunodeficiência humana (HIV), o causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), é um retrovírus pelo seu material genético ser de RNA promovendo a transcrição reversa para DNA. Pertence à família *Retroviridae* e sub-família *Orthoretrovirinae* e gênero *Lentivirus* (IARC, 2012). Trata-se de um vírus esférico envolvido por uma bicamada lipídica com seu envelope constituído por glicoproteínas virais, as gp120 e gp41, no interior de seu capsídeo estão presentes o material genético de RNA, as enzimas protease, transcriptase reversa e a integrase (Freed & Martin, 2007). O Linfócito TCD4+ é o principal alvo do HIV através da ligação específica dos receptores CCR5 e CXCR4, e há uma mudança de conformação das gp120 e gp41 para liberar o peptídeo de fusão onde ocorre à entrada do vírus através da fusão da célula com o vírus liberando o seu material genético e enzimas virais (Broder & Collman, 1997).

Existem dois tipos de HIV sendo que o HIV-2 é menos virulento. Até o ano de 2011 foram identificados mais de 600.000 casos de infecção por HIV-1 no Brasil, principalmente em cidades portuárias. Estima-se que em 2025 terão aproximadamente 90 milhões de pessoas infectadas somente no continente africano e atualmente cerca de 33,5 milhões de pessoas possuem o vírus (Heeney *et al*, 2006; Aids Epidemic Update, 2013). O HIV-1 é dividido em quatro diferentes grupos, O, M, N e P dentre estes o grupo M é o mais prevalente e classificado em nove subtipos e seis sub-subtipos (Robertson *et al*, 2000; Plantier *et al*, 2009). De acordo com a sua sequência genômica o grupo M apresenta os subtipos A, B, C, D, F, G, H, J e K e os sub-subtipos A1, A2, A3, A4, F1 e F2, além dessas formas, também existem vírus híbridos denominados formas recombinantes circulantes (CRF's), em que alguns podem causar pequenas epidemias em determinadas regiões (Tebit & Arts 2011, Peeters *et al*. 2013).

O estudo do ciclo replicativo do HIV possibilitou a identificação de marcadores para auxiliar no tratamento da infecção, em que uma combinação de macromoléculas que são essenciais para a replicação e maturação do vírus, tenham sua função interrompida através de fármacos que compõe uma combinação de fármacos para ajudar no tratamento da infecção. Tais fármacos são inibidores de transcriptase

reversa, inibidores de integrase, inibidores de protease e inibidores de fusão (Brito, 2011).

A enzima protease do HIV-1 realiza a clivagem das proteínas gag e pol, que formam as proteínas estruturais do vírus (Zhengtong; Chu; Wang, 2015), e é um importante alvo farmacológico para o tratamento do HIV, após a inibição desta enzima são produzidos vírions não infectivos (Meek, *et al*, 1990).

Existem 10 inibidores de protease (Indinavir, Ritonavir, Saquinavir, Nelfinavir, Fosamprenavir, Amprenavir, Lopinavir, Atazanavir, Tipranavir e Darunavir) aprovados pela *U.S Food and Drug Administration* (FDA) (Gosh *et al*, 2011). A função destes inibidores de protease é bloquear o sítio ativo e estabilizar as ligações de hidrogênio da protease, deixando uma região com extensa mobilidade conformacional relacionada ao mecanismo de abertura e fechamento do sítio ativo (*flap*) (figura 1) em uma conformação fechada, que bloqueia o sítio catalítico da enzima onde se ligariam os substratos (os polipeptídeos gag e pol), interrompendo assim a maturação do vírus, uma etapa importante no ciclo de replicação (Gosh *et al*, 2008). Em geral, os inibidores de protease mimetizam uma reação do estado de transição proteolítico, o inibidor interage com o sítio ativo da protease através de interações hidrofóbicas (Wu *et al.*, 2008).

Deste modo, técnicas computacionais tem emergido como uma grande área a contribuir para as áreas experimentais por fornecer informações relevantes referentes aos sistemas modelados *in silico*, porém a baixo custo. Permitindo o cálculo de propriedades termodinâmicas, determinação de estruturas de sistemas biomoléculares, levando ao planejamento, desenvolvimento e melhoramento de fármacos promovidos pelo avanço da tecnologia, criando *softwares* com um menor tempo de processamento de dados (Bultinck *et al*, 2003) A partir destes princípios foram analisadas as conformações adotadas pela protease do HIV-1 complexada ao Nelfinavir em seu estado nativo (sem mutação), com mutação simples (D30N), dupla mutação (D30N, I84A), e tripla mutação (D30N, I84A, M46I).

Mesmo com o avanço da tecnologia, ainda há um grande impasse no tratamento devido ao surgimento de cepas resistentes aos fármacos (Cunico; Gomes; Vellasco Junior, 2008) devido a este fato é importante verificar a ação de diferentes mutações enzimáticas que alteram a forma da enzima e que afetam diretamente a atividade do inibidor e assim afetando o tratamento do indivíduo com a infecção.

Portanto a elucidação destes efeitos deve ser determinada para se determinar uma melhora no tratamento antirretroviral.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 A SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (SIDA)

O primeiro retrovírus descoberto por Gallo *et al*, (1980), foi denominado Vírus Linfotrópico de Células T Humanas 1 (HTLV 1) e o Vírus Linfotrópico de Células T Humanas 2 (HTLV 2), posteriormente em 1983 Barre-Sinoussi *et al*, isolou um retrovírus denominado LAV (Vírus associado a linfadenopatia). Em 1984 Gallo *et al*, identificaram um novo vírus em pacientes com *Pneumocystis jiroveci*, que por ora foi denominado de HTLV 3. No mesmo ano Levy *et al*, isolou um retrovírus de pacientes com AIDS que foi denominado ARV (retrovírus associado à AIDS). No ano de 1985, análises genéticas mostraram que os três eram muito semelhantes e pertenciam a mesma família, e a partir disto o ICTV (Comitê Internacional de Taxonomia Viral) classificou os agentes como vírus da imunodeficiência humana HIV. No ano de 2008, Barre-Sinoussi e Montagnier ganharam o prêmio Nobel pela descoberta do Vírus.

No ano de 1978, surgiram sintomas em HSM (Homem que faz sexo com Homem) que viviam nos Estados Unidos e na Suécia, de uma doença que até então era desconhecida e que futuramente viria a ser chamada de AIDS (do inglês - *Acquired Immunodeficiency Syndrome*). Descoberto no início da década de 1980 durante o acompanhamento clínico de um paciente com pneumonia causada pelo agente, na época conhecido como *Pneumocystis carinii*, hoje tratado por *Pneumocystis jiroveci* e nos Estados Unidos através do isolamento de um vírus denominado HIV (Vírus da imunodeficiência Humana) através de células de um paciente terminal com linfadenopatia generalizada (Harms; Feldmeier, 2002; Lee *et al*, 2009).

A partir deste acontecimento, mais precisamente no ano de 1984 iniciaram-se pesquisas com o objetivo de isolar o vírus de pacientes assintomáticos, em que os indivíduos que possuíam o vírus, mas não manifestavam sintomas, ficavam apenas conhecidos como portadores do vírus, porém tratados com as mesmas orientações para que não viessem a acometer outros indivíduos a partir de então. Verificou-se que o HIV pertence à família *Retroviridae* e, classificado como retrovírus, apresenta como

características genômicas um RNA de duas fitas simples, fato que representa a principal característica do vírus, a transcrição reversa do seu material genético, sintetizando DNA através do RNA, utilizando a enzima transcriptase reversa.

Há um vírus denominado vírus da imunodeficiência símia (SIV), que acomete o sistema imunológico de macacos. O HIV 1 é derivado de uma cepa de SIV que infecta chimpanzés da subespécie *Pan troglodytes*, enquanto que o HIV-2 é derivado de uma cepa de SIV que infecta chimpanzés da subespécie *Sooty mangabey* (Papathanasopoulos *et al*, 2003). Portanto, acredita-se que esse vírus chegou ao organismo dos seres humanos através do contato com o sangue destes macacos pelo contato com carne, sangue e até mesmo mordida dos animais infectados, visto que os homens que tinham contatos com esses chimpanzés eram caçadores. Estudos realizados comprovaram a grande semelhança entre o HIV e o SIV devido a fatores como similaridade genômica, filogenia, prevalência e transmissão dos vírus e seus hospedeiros, e o surgimento dos vírus, já que suas origens derivam da mesma região e possuem relação a transmissão entre espécies (Hahn *et al*, 2000; Marx *et al*, 2004).

Após este acontecido o vírus conseguiu se adaptar e tornou-se transmissível entre a espécie humana através de fluidos corporais, como sangue, leite materno, sêmen e secreção vaginal, o que torna transmissão essa que se torna maior devido aos costumes e culturas de cada região do mundo tratando-se de forma comportamental (Hill; Rosenbloom; Nowak, 2012).

Saldanha, Andrade e Beck, 2009, introduziram um conceito importante para a sociedade, de que uma pessoa infectada pelo HIV não determina que essa pessoa tenha AIDS, contudo não determina a partir de que ponto uma pessoa pode ser considerada aidética. Por outro lado, mas seguindo a mesma linha de pensamento, o Departamento de DST (Doenças sexualmente transmissíveis) AIDS e Hepatites Virais do Ministério da Saúde determina a AIDS como um estágio mais avançado da infecção pelo HIV, devido a drástica redução de células com receptores CD4 como macrófagos e principalmente linfócitos T CD4+, fazendo com o que o sistema imunológico já não exerça sua função, tornando o indivíduo mais suscetível a doenças oportunistas e outros tipos de doença, em que analisando todo o contexto do paciente, este pode ir a óbito (Brito *et al*, 2000).

Portanto a AIDS é considerada a infecção sexualmente transmissível (IST) que deve ser considerada um problema de saúde pública, e com a característica principal de ser uma doença que não tem cura onde a maioria das pessoas infectadas vive no continente africano e em países emergentes (Cunico; Gomes; Vellasco; Junior, 2008).

3.2 O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

O HIV é um vírus pertencente à família *Retroviridae*, subfamília *Lentivirinae*, gênero *Lentivirus*, é classificado como retrovírus pelo fato de transcrever RNA em DNA através da enzima transcriptase reversa, podendo assim inserir seu genoma no genoma do hospedeiro (Frankel; Young, 1998; Vaishnav; Wongstall, 1991). É um vírus com o tamanho de 80 a 100 nm de diâmetro constituído por um envelope bilipídico e um complexo glicoproteico trimérico de formato esférico e um capsídeo de formato cilíndrico, abrigando no seu interior seu material genético (figura 1) e duas fitas simples de RNA agrupados de forma linear, que são totalmente integradas as enzimas protease, integrase e transcriptase reversa (Cunico; Gomes; Vellasco; Junior, 2008).

O material genético do vírus é responsável pela codificação de proteínas importantes para a constituição viral, como as proteínas regulatórias *tat* (*transcription transactivator*) e a proteína *rev* (*regulator of expression of virion proteins*), além das proteínas acessórias *vpr* (*viral protein R*), *vpu* (*viral protein U*), *nef* (*negative fator*) e *vif* (*viral infectivity fator*) que também auxiliam na transcrição viral e conseqüentemente no mecanismo patogênico, que seria a inserção do genoma do vírus no genoma do hospedeiro (Freed, 2002).

Onze genes são importantes para a replicação do vírus, síntese de proteínas estruturais e reguladoras. O gene *env* codifica proteínas responsáveis pela síntese do envelope do vírus, a gp160 que é quebrada gerando a gp120 e gp41 (figura 2). O gene *gag* (*group-specific antigen*) codifica proteínas da região central do vírus, as proteínas p55 que é quebrada em p24 e p17. O gene *pol* (*polymerase*) codifica as enzimas p11, p32 e p51 que atuam na replicação do vírus. O gene *tat* atua na ativação de sinais recebidos pela célula infectada e faz a transferência para o genoma do vírus. O gene *ver* regula a expressão de proteínas reguladoras e proteínas virais, deixando-as em proporção. O gene *nef* regula negativamente a síntese de proteínas virais. O gene *vif* é relacionado ao grau de virulência. Na repetição terminal longa (RTL), estão situados

vários genes que codificam proteínas reguladoras do ciclo replicativo; gene *vpu* codifica a proteína vpu que degrada novos receptores CD4 formados pela célula infectada diminuindo a formação de proteínas MHC (*major histocompatibility complex*) de classe I na superfície da célula, impedindo, assim, que o sistema imunológico faça o reconhecimento de células que contém linfócitos T citotóxicos.

Além de o genoma viral ser constituído de três regiões importantes, a região *gag* responsável pela síntese do capsídeo viral e que codifica as proteínas estruturais internas; região *pol* que significa poliproteína, que codifica as enzimas, protease, integrase e transcriptase reversa; e a região *env* que codifica as glicoproteínas do envoltório do vírus para a sua entrada na célula, que são glicoproteínas de superfície (gp 120) que interagem com glicoproteínas transmembranares (gp 41) que também fazem parte do envelope viral. Além disso, o HIV precisa infectar uma célula, devido a sua incapacidade de autorreplicação além de outras estruturas provenientes da célula do hospedeiro, durante a entrada do vírus, que são utilizadas para a formação do vírus como proteínas, antígenos do MHC, ubiquitina e actina (Arthur *et al*, 1992). Essas proteínas são importantes para a constituição da matriz viral, que é constituída por proteínas da matriz viral, chamada de p17, do capsídeo viral p24, do nucleocapsídeo p7 envolvendo as cópias do genoma do vírus além da proteína p6 (Freed, 2002).

Atualmente existem dois tipos de HIV, os tipos 1 e 2, são vírus com pouca similaridade genética, apenas 40%, devido ao alto grau de mutagenicidade do subtipo 1 e devido ao fato do subtipo 2 ser encontrado quase que exclusivamente no continente Africano, enquanto que o subtipo 1, responsável por causar a epidemia mundial, é mais virulento, apresentando maior taxa de mutagenicidade e por evoluir a AIDS de forma mais rápida (Ferreira; Riffel; Sant'ana, 2010).

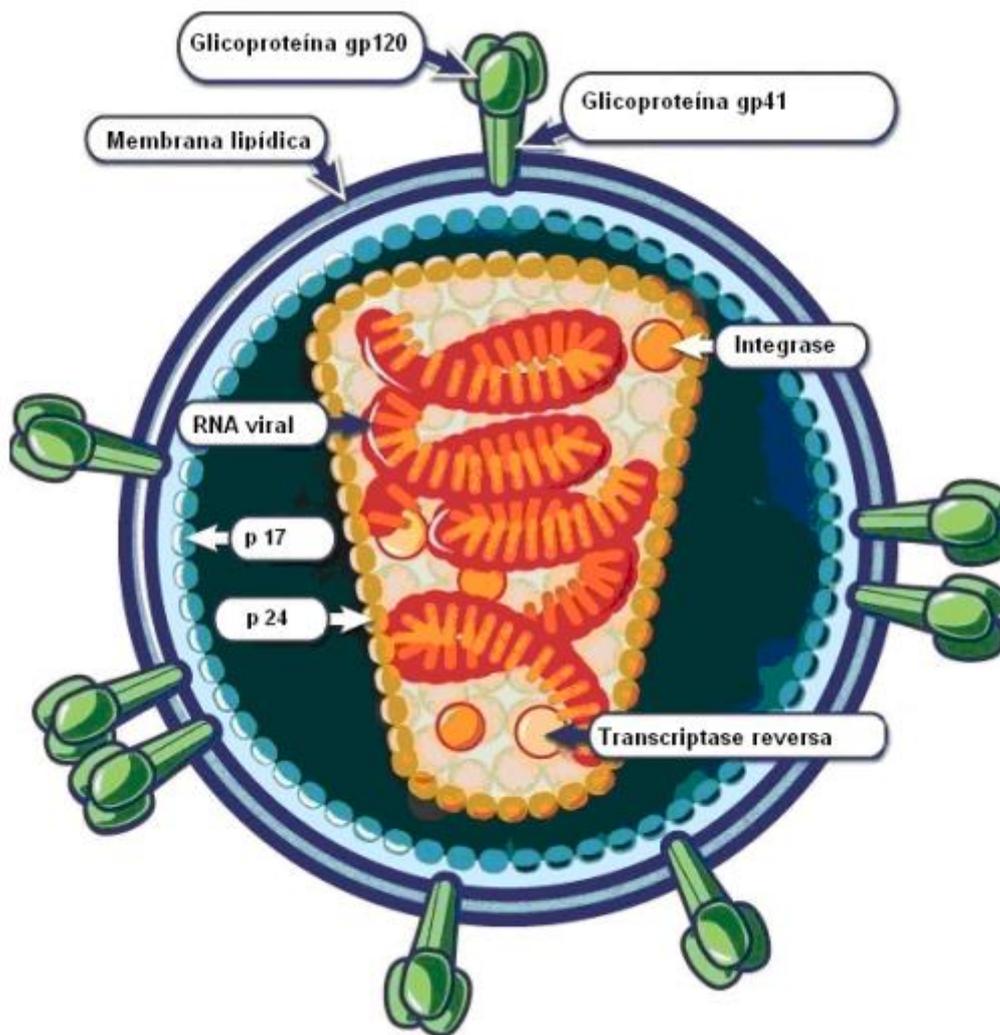


Figura 1: Morfologia do HIV

Fonte: NIAID, 2009

3.3 Ciclo replicativo do HIV

3.3.1 Etapa inicial da replicação viral (*Early phase*)

A replicação do HIV (figura 2) se inicia no momento de adesão do vírus a célula, a partir de ligações específicas do HIV com células que contenham receptores CD4, ocorrendo uma ligação específica entre a gp120 do provírus e o domínio amino-terminal da partícula de CD4 formando uma unidade funcional trimérica, promovendo assim a ligação entre partículas do vírus e a célula. Cada uma dessas unidades é composta por três moléculas da gp120 (superfície do vírion) que são associadas a três moléculas de gp41 na superfície da célula. Para que ocorra a fusão do vírus com a célula, é necessário co-receptores de quimiocina que são as proteínas CCR5 e CXCR4, ocorrendo a fusão do vírus entre a membrana da célula e a região *env* está

localizada na região conservada de domínios da gp120. A formação destas unidades altera a forma de proteínas do envelope, no caso a gp41, expondo o peptídeo de fusão que é uma região hidrofóbica permitindo assim a fusão entre o envelope viral e a célula infectada (Greene & Peterlin, 2003; Nazari & Joshi, 2008; Freed, 2002).

A fusão da membrana viral com a célula leva a um processo chamado desnudamento que é a liberação do conteúdo proviral no interior da célula, ou seja, o capsídeo proviral é inserido no citoplasma celular ocorrendo a liberação do genoma viral e ativando as enzimas protease (PR), transcriptase reversa (TR) e integrase (IN). Após a ativação dessas enzimas, o RNA viral é transcrito para DNA pela enzima TR utilizando um tRNA (RNA de transcrição) celular ou viral como primer, formando primeiramente um híbrido RNA/DNA, cada fita de RNA é transcrita em uma fita negativa de DNA (cDNA) esse processo leva entre 6 a 48 horas (Kim *et al*, 2012). Além da TR atuar como uma ribonuclease H degradando o RNA viral também atua na síntese do DNA em sua forma positiva, resultando em uma fita dupla de DNA (Wigg, 2002).

Após a liberação do genoma as enzimas TR, PR e IN são ativadas, com a formação do complexo núcleo proteico juntamente com o DNA formado e as proteínas IN e PR, o DNA é transportado para o núcleo com auxílio da enzima vpr. Já no núcleo da célula, a IN catalisa a integração do DNA viral com o genoma do hospedeiro permitindo ao HIV produzir novas partículas virais processo que leva aproximadamente 5 horas (Murray; Keller & Cooper, 2011). Após a transcrição e tradução as poliproteínas virais formadas são clivadas pela enzima protease participando na maturação da partícula viral incluindo as enzimas para um novo processo infectivo (Jouvenet; Bieniasz & Simon, 2008).

Após esta etapa o DNA viral pode permanecer no citoplasma em forma circular (forma não ativa) ou migrar para o núcleo da célula (forma ativa). Na forma ativa o DNA viral se une com as proteínas IN, MA (matriz proteica), TR e vpr formando o complexo de pré-integração (PIC), com papel fundamental da enzima IN realizando o processamento da extremidade 3' em que são removidos dois nucleotídeos das fitas do DNA proviral, passo fundamental para a entrada do DNA proviral no núcleo celular, propiciando o contato do DNA viral com o DNA do hospedeiro (Figura 3). A enzima IN realiza uma clivagem no DNA do hospedeiro unindo a extremidade 3' do DNA viral

com a extremidade 5' do DNA do hospedeiro, etapa conhecida como transferência de cadeia de DNA (*DNA strand transfer*) (Reinke *et al*, 2001).

3.3.2 Fase tardia da replicação viral

Após a ativação da célula hospedeira (dependente de ligações dos fatores de transcrições celulares à LTR 5' proviral) e posterior a transcrição pela RNA polimerase II, ocorre a síntese de mRNA (RNA mensageiro) dando início a fase final da replicação do vírus, em que são geradas duas classes, um RNA genômico em que não ocorre *splicing*, útil para a adesão do material genético do vírus maduro, em que geralmente essas moléculas ficam retidas no núcleo, onde podem sofrer mais processamento ou serem degradadas, e dois RNA's com processamento *splicing* utilizados para a síntese das poliproteínas tat, ver e nef, com a proteína tat se ligando na região *TAR* (*trans-activation response element*) dos RNA's produzidos recrutando proteínas celulares que atuam na fosforilação da RNA polimerase II favorecendo o alongamento de novos mRNA (Brigati *et al*, 2003). Uma única cadeia longa de mRNA que não tenha sofrido processamento e com a característica de ser idêntico ao RNA viral é necessário para a síntese e empacotamento da proteína gag e da poliproteína pol em que são traduzidas em ribossomos livres. Então a proteína Rev atua no controle do transporte e formação dos transcritos processados (*vif*, *vpr*, *vpu* e *env*) através da sequência RRE (*rev response element*) (Malim, 1998; Lever, 2005; Bai, *et al*, 2014). A síntese da gp160, a poliproteína precursora das proteínas do envelope acontece no retículo endoplasmático rugoso usando mRNA processado utilizando o código do gene *env*. Após a tradução, a gp160 sofre modificação no retículo endoplasmático e clivagem no complexo golgiense tornando-se apta para a formação do complexo glicoproteína trimérica (gp41-gp120) e então este complexo é transportado para a membrana da célula onde atua na montagem do vírus (Freed & Martin, 1995; Wigg, 2002).

As moléculas gp160 e CD4 são produzidas no retículo endoplasmático e uma ligação prematura da molécula de CD4 a gp160 pode inibir o seu deslocamento para a membrana da célula infectada (Hoxie *et al*, 1986). A proteína vpu faz a remoção do receptor de CD4 no retículo endoplasmático, com mecanismo de ação parecido (Deora & Ratner, 2001; Arora & Fredericksen, 2002). Receptores CD4 presentes na

membrana são degradados através da via endossomal, devido à ligação da proteína nef ao receptor celular (Aiken, 2015)

Aglomerados de poliproteínas gag e pol interagem com duas moléculas de mRNA não processado e migram do citoplasma para regiões de acúmulo de glicoproteínas do complexo gp41+gp120. O domínio das poliproteínas gag e pol se direcionam para a membrana celular interagindo com a gp41, então o vírus é liberado da célula através do brotamento (Janeway *et al*, 2002).

A maturação do vírus ocorre a partir da ativação da protease viral, que cliva as poliproteínas gag e pol, em que ocorre um rearranjo dando origem a uma partícula infecciosa (Melo, 2011).

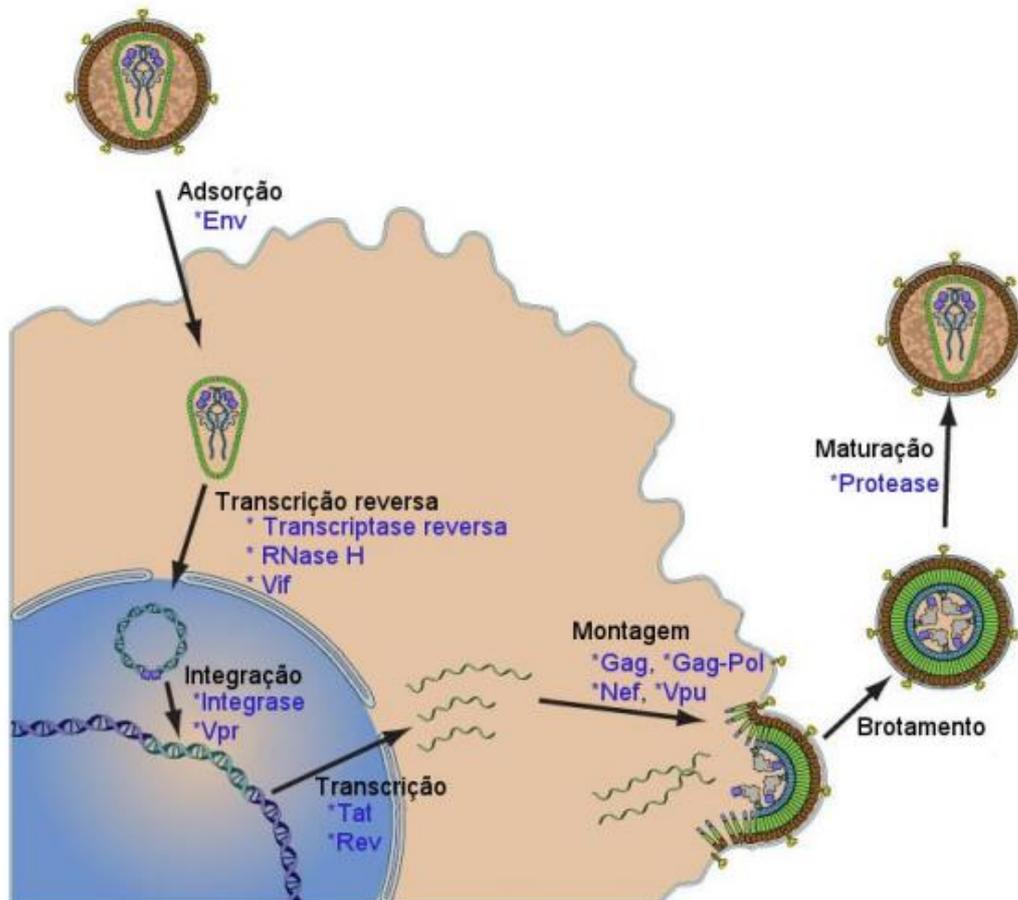


Figura 2: Ciclo biológico do HIV com o envolvimento das principais proteínas

Fonte: Adaptado de Swiss Institute Bioinformatic.

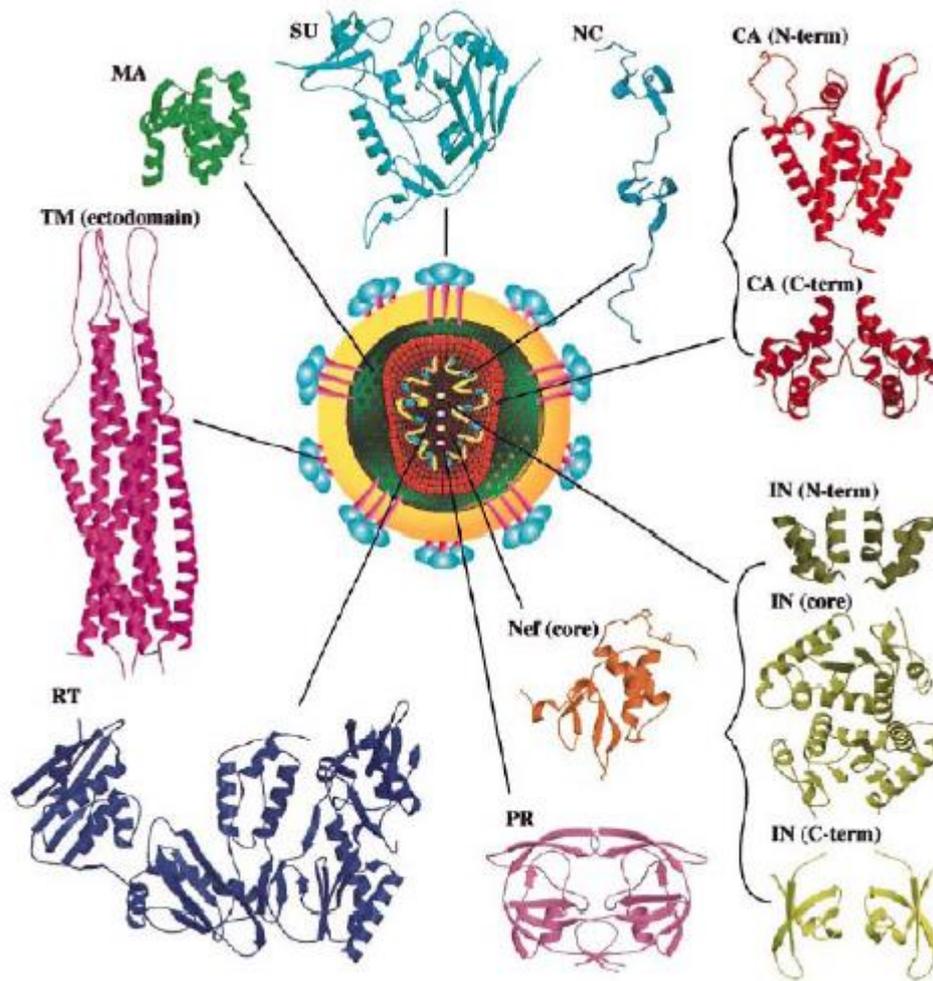


Figura 3: Vírus maduro do HIV com representação de suas proteínas virais e estruturais. SU (glicoproteína de superfície), TM (Proteína da transmembrana) MA (matriz proteica), CA (proteína o capsídeo) NC (proteína do nucleocapsídeo) PR (protease), TR (transcriptase reversa), IN (integrase), nef (proteínas acessórias).

Fonte: Adaptado de Summer & Turner, 1999

3.4 Protease do HIV-1

As proteases retrovirais (figura 4) são da classe das proteases aspárticas apresentando resíduos deste aminoácido no seu sítio catalítico que é altamente conservado (Babine, 1997). As proteases retrovirais possuem 130 aminoácidos apresentando pouca homologia com outras sequências gênicas (Meek, 1992). A protease do HIV-1 possui 99 aminoácidos produzindo uma tríade catalítica Asp-Thr-Gly para o sítio ativo e a partir da sua estrutura podem ser produzidas proteases não virais (Homak; Simmerling, 2007). As regiões amino e carboxi possuem monômeros

que dão a estabilidade da estrutura dimérica da enzima apresentando a forma de folhas beta (Meek, 1992). Esta enzima é considerada o maior alvo para a terapia anti-HIV devido ao fato de estar diretamente ligada a clivagem de polipeptídeos que darão origem a proteínas virais funcionais. Para isso foram desenvolvidos inibidores de protease, que bloqueiam a ação de clivagem da enzima, porém a eficácia do fármaco é ofuscada pelas recorrentes mutações do vírus, fazendo com o que a protease seja resistente a esses inibidores, através de substituição de aminoácidos na cavidade de ligação ao substrato e interferindo na ligação do inibidor com a enzima (Antunes *et al*, 2014).

Estudos heterólogos da expressão da *E. coli* foram fundamentais para a formação da estrutura da protease nativa (figura 6) pelo *Merck Research Laboratories* e *Biberck College* a partir da síntese total pela *National Cancer Institute* (NCI) Frederick (Navia *et al*, 1989; Wlodawer & Vondrseck, 1998). Pelo fato desta enzima proporcionar a maturação do HIV, ela se torna um importante alvo farmacológico para o tratamento da AIDS através de inibidores de protease (Batista, 2005).

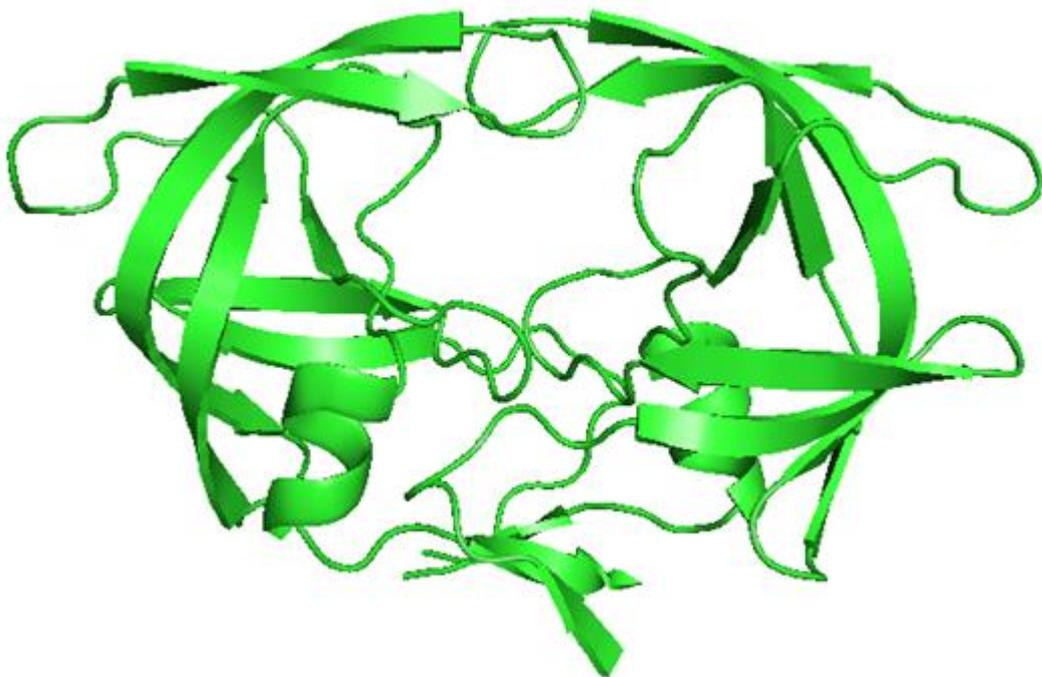


Figura 4: Estrutura da enzima protease do HIV-1

Fonte: Holanda, 2017

O sítio ativo das proteases de retrovírus de uma forma geral é constituído de 7 subsítios divididos nas duas cadeias da protease (A e B) do ponto de clivagem, que no caso seria o subsítio de clivagem, os subsítios S1 e S1'. O mecanismo de hidrólise da protease envolve a hidroxila da cadeia lateral do Asp 25. Formado por dois resíduos de aspartato, o substrato proteico é reconhecido devido a uma sequência característica de 5 a 6 resíduos hidrofóbicos (Tozser *et al*, 2000).

A região *flap* (alça) (figura 5), localizada entre os resíduos 43-58 com as subdivisões 43-50 e 51-58, é responsável pela flexibilidade da enzima e contém as regiões beta. Está localizada acima do sítio ativo da enzima, que quando está aberta, permite a entrada do substrato para ser clivado e quando complexada ao substrato, se fecha sobre ela, que é um fator importante para o discernimento do estudo de resistência sobre a avaliação da funcionalidade da enzima complexada ao seu respectivo inibidor (Collins *et al*, 2005; Batista, 2005).

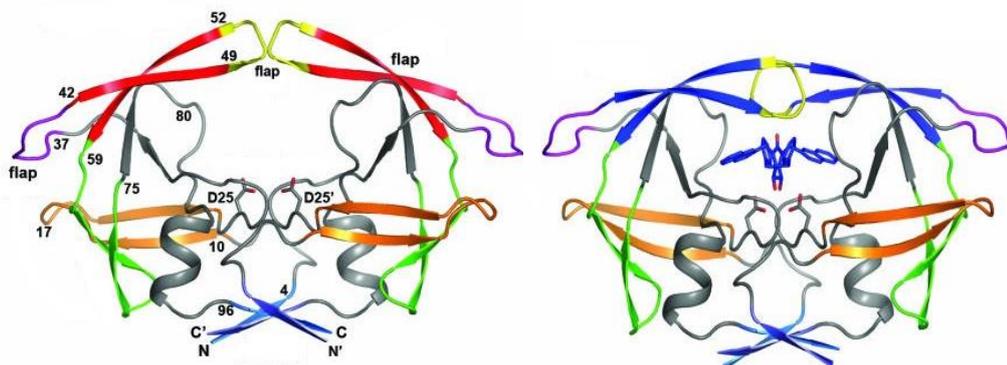


Figura 5: Diferença da estrutura da enzima protease do HIV em sua conformação semi-aberta sem o ligante, e sua conformação fechada, com um inibidor no sítio ativo da enzima.

Fonte: Hornak, *et al*, 2010.

Com simetria do tipo C2 (duas cadeias homólogas) e por ser um homodímero, a protease contém apenas um sítio catalítico constituído por uma tríade catalítica formada pelos aminoácidos aspartato-treonina-glicina, que é uma característica das aspartil proteases. As cadeias A e A' (formadas por 99 resíduos de aminoácidos) que juntas formam um dímero, não estão ligadas covalentemente, contém uma alfa-hélice do resíduo 87-93 e nove folhas do tipo beta. Com a abertura dos *flaps* o substrato fica alojado numa cavidade, cercadas de *loop* (Figura 6). Então, para ocorrer a clivagem

das poliproteínas do HIV (gag e pol) dois resíduos de aspartatos (ASP 25-ASP 25') ligam-se a uma molécula de água, promovendo a hidrólise dos substratos, fenômeno realizado após o vírus produzir longas cadeias polipeptídicas não funcionais formando vírus imaturos (figura 7).

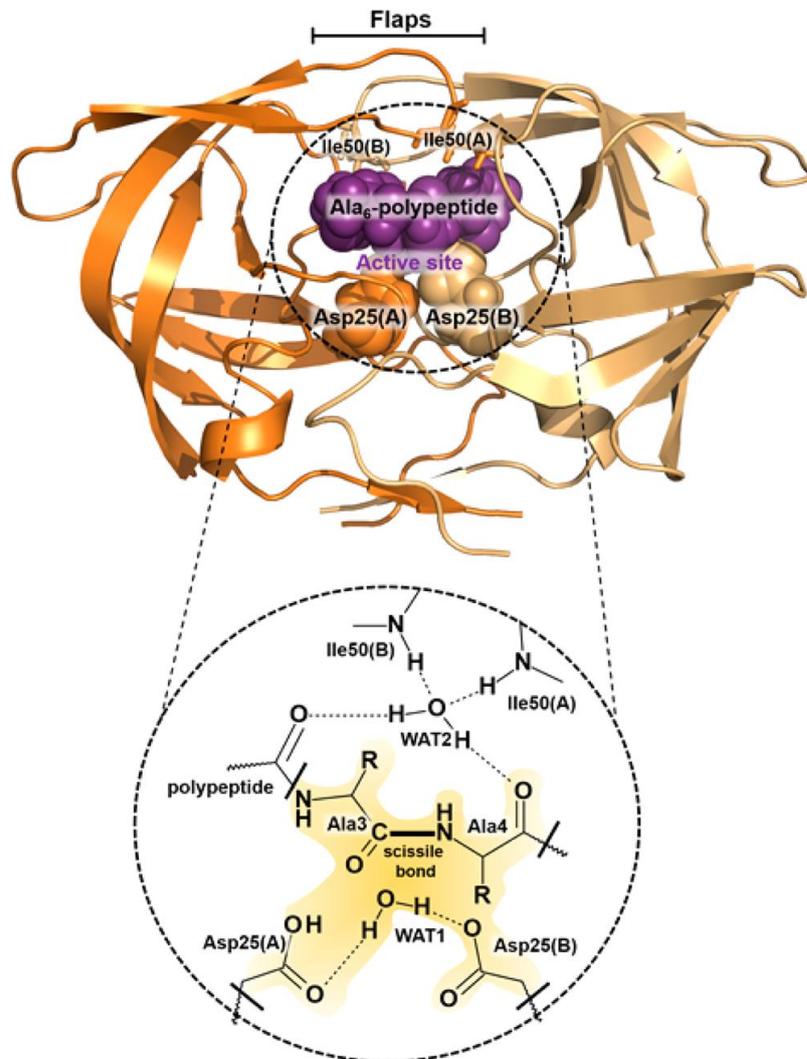
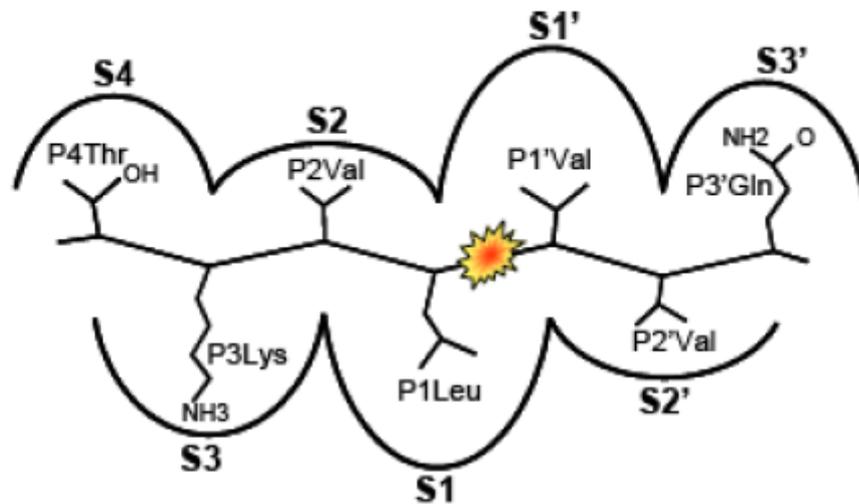


Figura 6: Protease do HIV-1 em complexo com um polipeptídeo

Fonte: Agnieszka Krzemińska, Vicent Moliner, and Katarzyna Świderek, 2016.

Após a clivagem dessas poliproteínas pela HIV- protease essas cadeias tornam-se funcionais, promovendo a formação de proteínas maduras, processo que pode ocorrer desde a formação do vírion até a sua liberação no plasma. Essa proteólise que ocorre nos subsítios da cavidade (figura 7) promove a formação de vírions maduros e infectivos, uma interrupção desta etapa tem como resultados a formação de partículas virais imaturas, ou seja, não infectivas (Henderson, *et al*, 1988; Crawford & Goff, 1985; Batista, 2005).



S4 – Asp29, Asp30, Met46, Ile47, Gly48, Leu76

S3 – Arg8', Leu23', Asp29, Gly48, Gly49, Ile50, Thr80', Pro81', Val82'

S2 – Ala28, Asp29, Asp30, Val32, Ile47, Gly49, Ile50, Leu76, Ile84

S1 – Arg8', Leu23', Asp25', Asp25, Gly27, Gly49, Ile50, Thr80', Val82', Ile84'

S1' - Arg8', Leu23', Asp25', Asp25, Gly27, Gly49, Ile50, Thr80', Val82', Ile84'

S2' - Ala28', Asp29', Asp30', Val32', Ile47', Gly4'9, Ile50', Leu7'6, Ile81'

S3' - – Arg8, Leu23, Asp29', Gly48', Gly49', Ile50', Thr80, Pro81, Val82

Figura 7: Ilustração do sítio catalítico da HIV-protease. As regiões S e S' reconhecem os resíduos de aminoácidos da enzima, enquanto que P e P' identificam os resíduos de aminoácidos do substrato. A parte destacada ilustra o local da clivagem do substrato ligado a enzima.

Fonte: Adaptado de Tozser *et al*, 2000

3.5. Principais mutações que conferem resistência ao Nelfinavir.

A mutação que leva a substituição dos aminoácidos D30N (figura 8) é considerada a principal mutação que confere uma perda significativa da susceptibilidade da protease ao Nelfinavir (Johnson *et al*, 2009). Essa mutação é exclusivamente adquirida após o tratamento com Nelfinavir e não tem grandes efeitos compensatórios para outros inibidores de protease. Por outro lado, um estudo realizado por Rhee *et al*, 2006, mostrou por meio de ferramentas de bioinformática que a mutação D30N aumentou a susceptibilidade aos fármacos Amprenavir (APV), Lopinavir (LPV), Saquinavir (SQV) e Indinavir (IDV). Porém o impacto clínico ainda não foi confirmado.

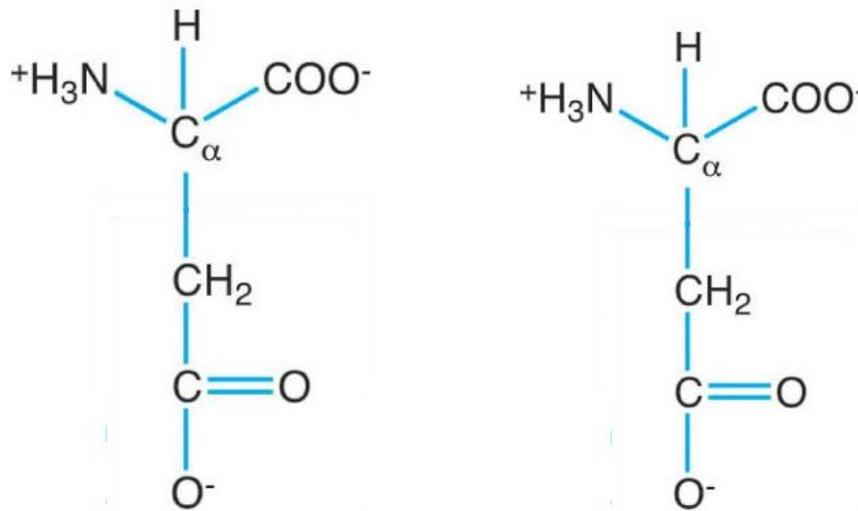


Figura 8: Estrutura química dos aminoácidos aspartato e asparagina.

Fonte: Laguna *et al*, "Bioquímica de Laguna", 2012.

A mutação que leva a substituição dos aminoácidos M46I (figura 9) é considerada uma mutação compensatória aumentando a atividade da protease que é diminuída por mutações do sítio ativo da enzima, aumenta a eficiência catalítica e reduz a susceptibilidade para o Nelfinavir (Piana, Carloni & Rothlisberger, 2002). As mutações compensatórias geralmente se localizam longe do sítio ativo e não envolvem resíduos carregados. Além disso, a mutação M46I induz um deslocamento da reação intermediária para o sítio ativo (Schock & Garsky, 1996; Henderson, *et al*, 2012). Isso demonstra que relativamente pequenas alterações locais na estrutura da proteína podem levar a alterações das propriedades dinâmicas, que são intimamente relacionadas com a atividade enzimática (Piana, Carloni & Rothlisberger, 2002). Tanto a mudança induzida na flexibilidade do substrato e do composto intermédio conformação podem ser responsáveis pela diferença em catálise da enzima (Mammano *et al*. 2000; Youngand Kuritzkes 2001).

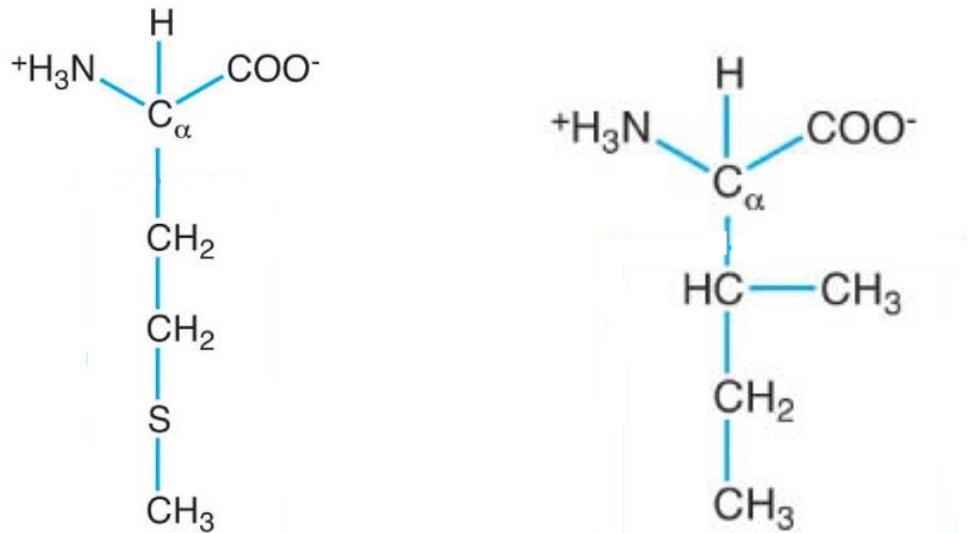


Figura 9: Estrutura química respectivamente dos aminoácidos metionina (M) e isoleucina (I).

Fonte: Laguna *et al*, "Bioquímica de Laguna", 2012.

A mutação que leva as substituições dos aminoácidos I84A (figura 10) é uma rara mutação não polimórfica que confere alta resistência cruzada a todos os inibidores de protease com exceção ao Tipranavir. Porém, no estudo de Rhee *et al* (2010), a mutação I84A assim como outras, não foram significativamente associadas de forma independente com a diminuição da susceptibilidade a um ou mais inibidores de protease. No entanto esta mutação é associada ao maior efeito de redução de susceptibilidade dos inibidores de protease, e foi associada à redução de susceptibilidade de oito inibidores de protease com um coeficiente de redução de susceptibilidade ao Nelfinavir maior que a mutação D30N (Figura 11). Há outras mutações que também auxiliam na resistência ao Nelfinavir como mostrado no quadro 1.

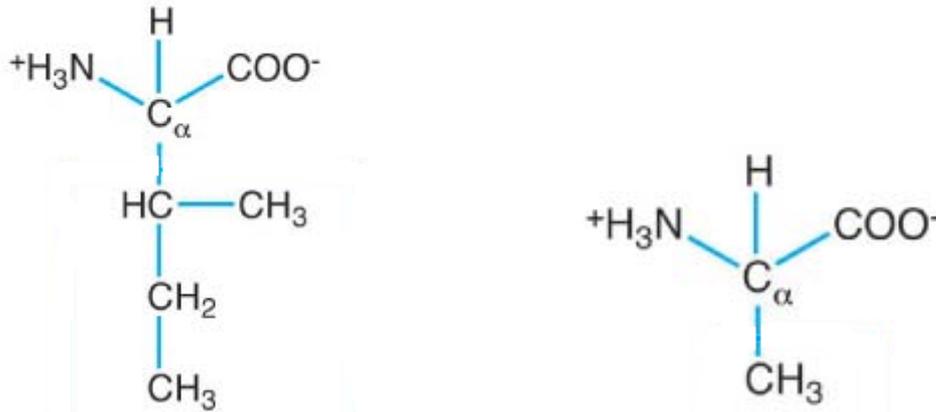
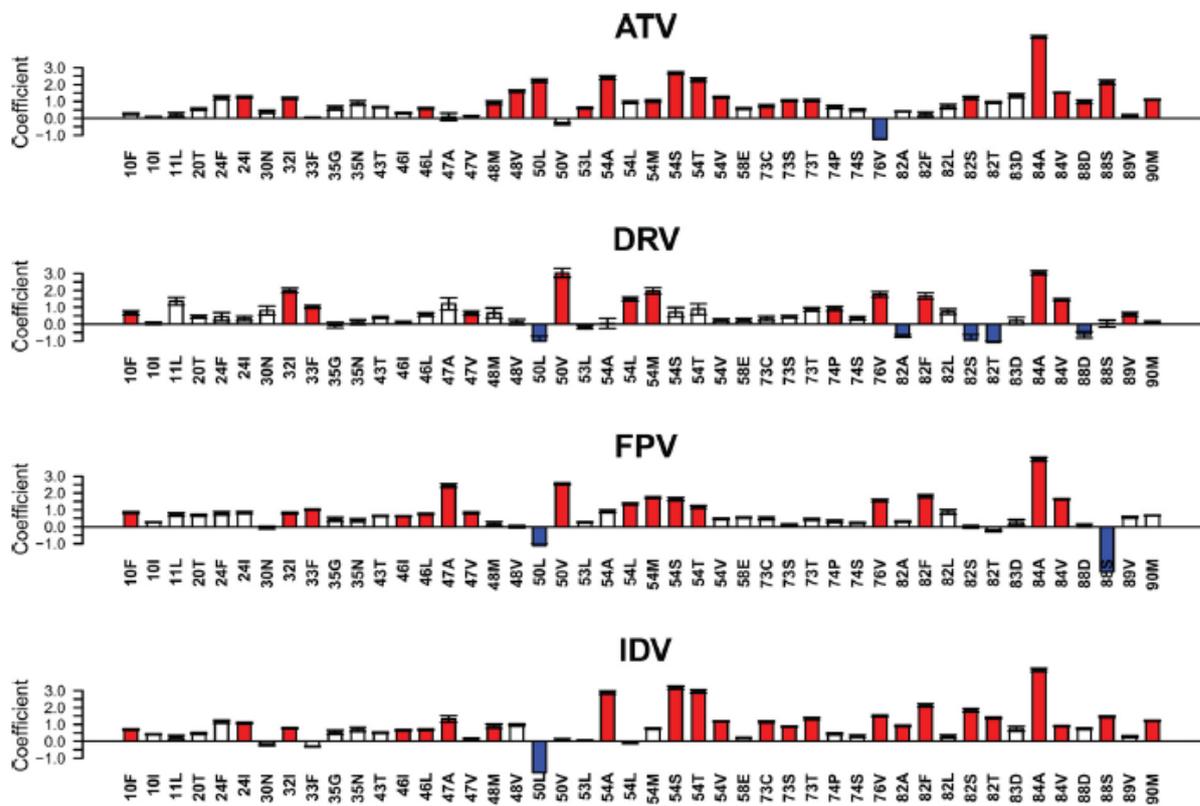


Figura 10: Estrutura química da Isoleucina e estrutura química da Alanina.

Fonte: Laguna *et al*, "Bioquímica de Laguna", 2012.



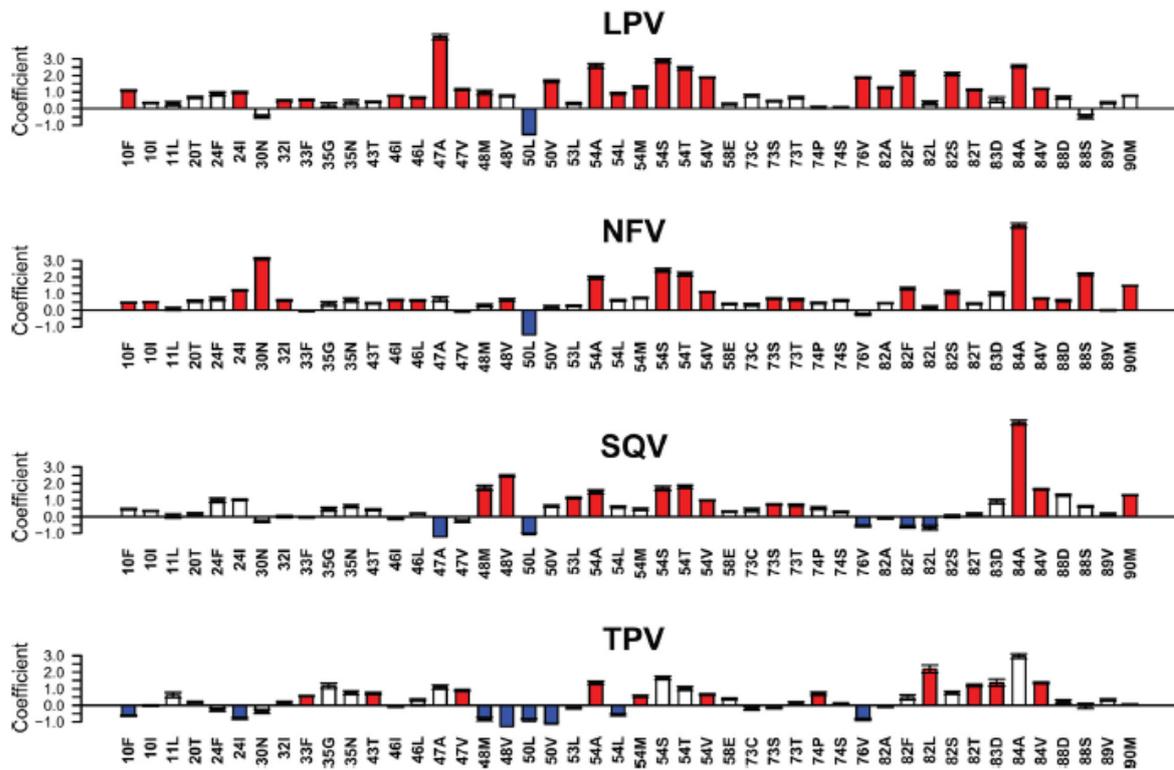


Figura 11: A figura representa um esquema entre as mutações que podem ocorrer na enzima protease do HIV-1 e o seu coeficiente em relação a resistência sobre todos os inibidores de protease, incluindo o Nelfinavir. A mutação I84A tem um destaque devido a demonstrar um grande impacto na estrutura da enzima dificultando a interação com a proteína em todos os inibidores de protease.

Fonte: Rhee, *et al*, 2010.

| Resíduo | 30 | 33 | 46 | 47 | 48 | 54 | 82 | 84 | 88 | 90 |
|---------------------|----|----|-----|----|-----|-----------|---------|----|-----|----|
| Protease conservada | D | L | M | I | G | I | V | I | L | L |
| Nelfinavir | N | F | I/L | V | V/M | V/T/A/L/M | A/F/T/S | V | D/S | M |

Tabela 1: Mutações mais comuns em relação a significado clínico. Os aminoácidos destacados em vermelho correspondem aos maiores níveis de resistência fenotípica e/ou evidência clínica mais forte para interferir com a terapia de inibição da protease bem sucedida.

Fonte: Adaptado de HIV Drug Resistance Database 2014.

3.6 Inibidores de protease (IP)

Os inibidores de protease se ligam irreversivelmente ao sítio ativo da protease inibindo a clivagem das poliproteínas. O primeiro inibidor de protease do HIV-1 foi a Pepstatina, um inibidor de pepsina, que também é uma protease aspártica. Existem dez inibidores de protease aprovados pela FDA (*food and drug administration*), Nelfinavir (figura 12), Darunavir, Lopinavir, Saquinavir, Amprenavir, Fosamprenavir, Ritonavir, Atazanavir, Tipranavir e Indinavir. Os mais usados no Brasil são nelfinavir, indinavir, Saquinavir e Ritonavir. O Ritonavir é associado com outros inibidores de protease, devido este diminuir a metabolização das outras drogas, aumentando o nível basal de droga e assim, a eficiência (Martins, 2007; Peng *et al*, 1989; Oliveros, 2005).

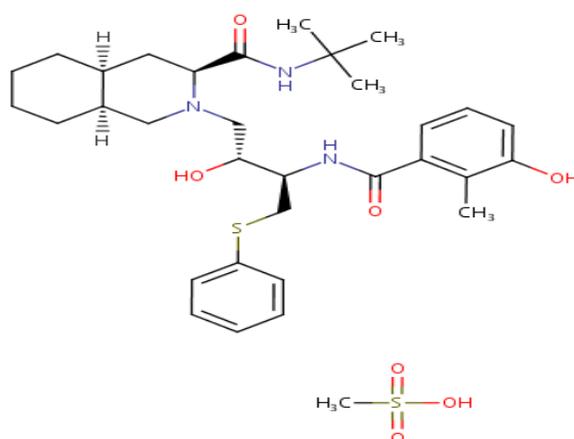


Figura 12: Estrutura do Nelfinavir

Fonte: <https://aidsinfo.nih.gov>

Com o surgimento constante de mutações, pró-fármacos são desenvolvidos para esses fins além de usar uma dose menor melhorando o resultado, e por um lado são eficazes em relação a efeitos colaterais, devido a estes colaterais serem derivados de uma grande quantidade da droga fora do sítio ativo da enzima, assim como a grande quantidade também causam estes efeitos. Para melhorar a farmacocinética, solubilidade e diminuir os efeitos colaterais é recomendado o uso de pró-fármaco. Um exemplo de pró-fármaco é o fosamprenavir, e estudos mostram que uma conjugação de um resíduo valina para o inibidor de protease através de uma ligação éster hidrolisável melhora a absorção celular e diminui o efluxo (NCI, 2015).

O Nelfinavir é um inibidor não peptídico da protease que age contra o HIV tipos 1 e 2, a IC95 (*inhibitory concentration 95%*) média para o HIV-1 em estudos *in*

vitro é 59 nM. A mutação D30N (substituição de aspartato por asparagina) é a principal mutação contra este fármaco, conferindo uma redução a sensibilidade de até 7 vezes. Outras mutações como na região 90, conferem resistência cruzada. Além destas, há mutações consideradas secundárias que estão associadas a resistência adicional ao Nelfinavir (Bardsley & Plosker, 2000).

É um inibidor de protease bem tolerado, seguro e eficaz, além de ser altamente recomendado para o tratamento em mulheres grávidas (Registry Coordinating Center, 2003); (Brown *et al*, 2006)

A absorção do Nelfinavir é muito sensível a alimentos e concentrações elevadas são alcançadas com refeições ricas em gordura. A dose utilizada atualmente é baseada no protocolo de administração 1250 mg do fármaco, 2 vezes , ao dia. A associação da dieta rica em gordura com a absorção do fármaco é de extrema importância, já que o Nelfinavir é o único IP que não sofre melhoramento da farmacocinética quando administrado juntamente com o Ritonavir. Os CYP2C19, 3A4 e 2D6 fazem o metabolismo oxidativo do Nelfinavir, que dá origem ao metabólito hidróxi-*t*-butilamida (M8) único metabólito ativo conhecido de todos os IP (Bardsley & Plosker, 2000).

O efeito adverso mais importante do Nelfinavir consiste em diarreia pelo aumento das respostas secretoras intestinais de cloreto dependente de cálcio, apesar de bem tolerado ele também é associado à intolerância à glicose e aumento de colesterol e triglicérido (Rufo *et al*, 2004). Outras formas de contraceptivos além de orais devem ser levadas em conta, devido ao Nelfinavir induzir enzimas hepáticas metabolizarem alguns fármacos reduzindo a ASC (área de superfície corporal) do etinilestradiol em 47% e norentidrona em 18%. Outra interação importante é a da zidovudina (AZT) em que o Nelfinavir diminui a ASC em 35% (Flexner 1998). É um fármaco bem tolerado, porém pouco usual devido a importância de como administrá-lo já que não é associado ao Ritonavir e depende de outros fatores para uma maior eficiência da sua absorção. É utilizado por criança e homens (Bardsley & Plosker, 2000).

3.7 Mecanismo de ligação do inibidor

Grande parte dos inibidores de protease foram desenvolvidos para mimetizar o estado de transição do substrato. O grupo hidroxil do inibidor interage com o grupo

carboxil dos resíduos Aspartato 25 Aspartato 25' do sitio ativo da protease, através de ligações de hidrogênio. Os resíduos da protease que fazem contato com o inibidor são bem conservados que são os aminoácidos glicina 27, aspartato 29, aspartato 30, e glicina 48, porém o acúmulo de mutações, originada de troca de aminoácidos, acaba alterando a estrutura da protease do HIV causando uma falha no tratamento.

O maior propósito no desenvolvimento de inibidores de protease é modificá-los afim de garantir a eficácia no tratamento diante das mutações que surgem, no entanto, os novos inibidores permanecem com a estrutura primária dos inibidores mais antigos em que alguns se mostram eficientes e outros não (Zhengtong; Chu & Wang *et al*, 2015).

3.8 Fármacos anti-HIV

Desde a descoberta do HIV, 26 fármacos anti-HIV foram aprovados pela *food and drug administration* (FDA). Baseado no tratamento global, aproximadamente 85% das pessoas recebem um tratamento antirretroviral baseado pelos critérios da OMS de 2013 para a receberem a terapia (UNAIDS, 2015). O mecanismo de estudos de elaboração para a fabricação de fármacos anti-HIV deu-se na década de 1950, devido a estudos do ciclo replicativo do vírus, em que um análogo nucleosídeo poderia bloquear a síntese de DNA desse vírus. Então foram produzidos análogos nucleosídeos na tentativa de inibir uma duplicação de uma célula tumoral. Horwitz *et al*, sintetizaram em 1964 o AZT (3'-azido-2'-didesoxitimidina) (figura 13) que pertence à classe de inibidores de transcriptase reversa análogos a nucleosídeos (ITRNs) resultando em atividade anti-tumoral, mas apenas em 1970 apresentou atividade antiviral e em 1985 tornou-se a primeira droga anti-HIV e começou a ser comercializado em 1987 após a sua aprovação no FDA (*food and drug administration*) (Moura, 2014). E a partir da estrutura do AZT, vários outros fármacos começaram a ser sintetizados outras classes de medicamentos. Devido a mecanismos de resistência que o vírus começara a produzir, então foram desenvolvidos inibidores de TR não nucleosídeos (ITRNNs) e posteriormente produzidos inibidores de PR (IPs), inibidores de IN (INI) inibidores de fusão (IF) e inibidores de CCR5, visando a inibição da replicação do vírus (De Souza & Almeida, 2003).

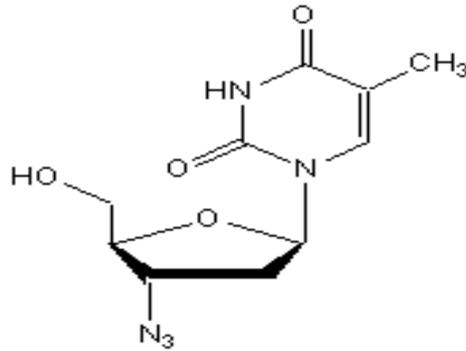


Figura 13: Estrutura do fármaco AZT

3.8.1 Terapia antirretroviral

A TARV é uma terapia na qual utilizam-se combinações de medicamentos no combate a infecção pelo HIV, tendo como mecanismo de ação, a inibição das principais proteínas responsáveis pelo desenvolvimento do vírus, as enzimas TR, PR e IN. Os inibidores de transcriptase reversa atuam impedindo a conversão do RNA em DNA inibindo a entrada do material genético do vírus no núcleo. Os inibidores de protease atuam inibindo a enzima protease, ocorrendo a não clivagem de proteínas virais e estruturais para a montagem do vírus, e os inibidores de integrase impedem a integração do material genético do vírus com o genoma do hospedeiro (De Souza & De Almeida, 2003).

O objetivo principal da TARV é o controle da infecção, ou seja, prevenindo que outras células sejam infectadas, reduzindo a replicação viral em níveis menores que 50 cópias/ ml (Hammer *et al*, 2006), mantendo a supressão do vírus e prevenindo a infecção de doenças oportunistas.

3.8.2 Terapia antirretroviral altamente ativa

A terapia antirretroviral altamente ativa (HAART *Highly Active Antiretroviral Therapy*). Foi introduzida em 1996 baseando-se na combinação de fármacos inibidores de protease e inibidores de transcriptase reversa, os chamados coquetéis, para uma maior eficiência na redução da carga viral plasmática de HIV-1, essa estratégia de tratamento visa um retardamento da resistência viral, devido ao fato de ser uma terapia com administração de fármacos que agem de mecanismos diferentes para um mesmo fim terapêutico (Johnston *et al*, 1998; Paterson *et al*, 2000; Dhimi *et al*, 2009; Greene *et al*, 2008).

Um protocolo comum de utilização das duas classes de fármacos é utilizar dois ou três inibidores de transcriptase reversa, no caso, dois INTR e um INNTR, ou um inibidor de protease (Janssen *et al*, 2005; Brito *et al*, 2011). Este é sim um protocolo eficaz, mas também tem seus riscos em relação a falha terapêutica podendo ocorrer uma resistência cruzada dependendo da posologia, eficácia e adesão do paciente ao tratamento, porém devido a imensa gama de medicamentos que estão sendo criados, alguns deles não são susceptíveis à resistência cruzada, e estão sendo amplamente estudados (Miranda *et al*, 2010).

3.9 Formas recombinantes

A recombinação genética faz parte do mecanismo natural de remodelamento dos vírus com o objetivo de controle no reparo de genomas defeituosos (Clavel *et al*, 1989). Com isso pode ocorrer um aumento das mutações virais conferindo adaptação em pressão seletiva, criando mecanismos de resistência perante ao sistema imunológico ou a uma TARV (Mouth *et al*, 1996; Boulerice *et al*, 1991). As formas recombinantes são resultadas da infecção de dois vírus em uma mesma célula, de forma simultânea ou sequencial em diversos eventos na etapa de transmissão do vírus, ou quando ocorre o empacotamento de dois genomas de RNA em cada vírion, com o vírus passando a produzir partículas virais heterozigotas (figura 14). Após esse processo a formação de um genoma recombinante pode ocorrer no próximo ciclo após uma infecção, através da leitura alternada (*alternate jumps*) pela transcriptase reversa entre os genomas co-empacotados (Nájera *et al*, 2002).

Já foram descritas diversas formas recombinantes, são conhecidas como CRF's. No entanto, para ser caracterizada como uma CFR é preciso que três vírus epidemiologicamente não ligados com estrutura e agrupamento filogenético semelhantes e consistentes sejam catalogados com pelo menos dois genomas corretos. As CFR ou URF (formas recombinantes únicas) resultam na formação de diferentes subtipos em uma mesma região geográfica (Buonaguro *et al*, 2007)

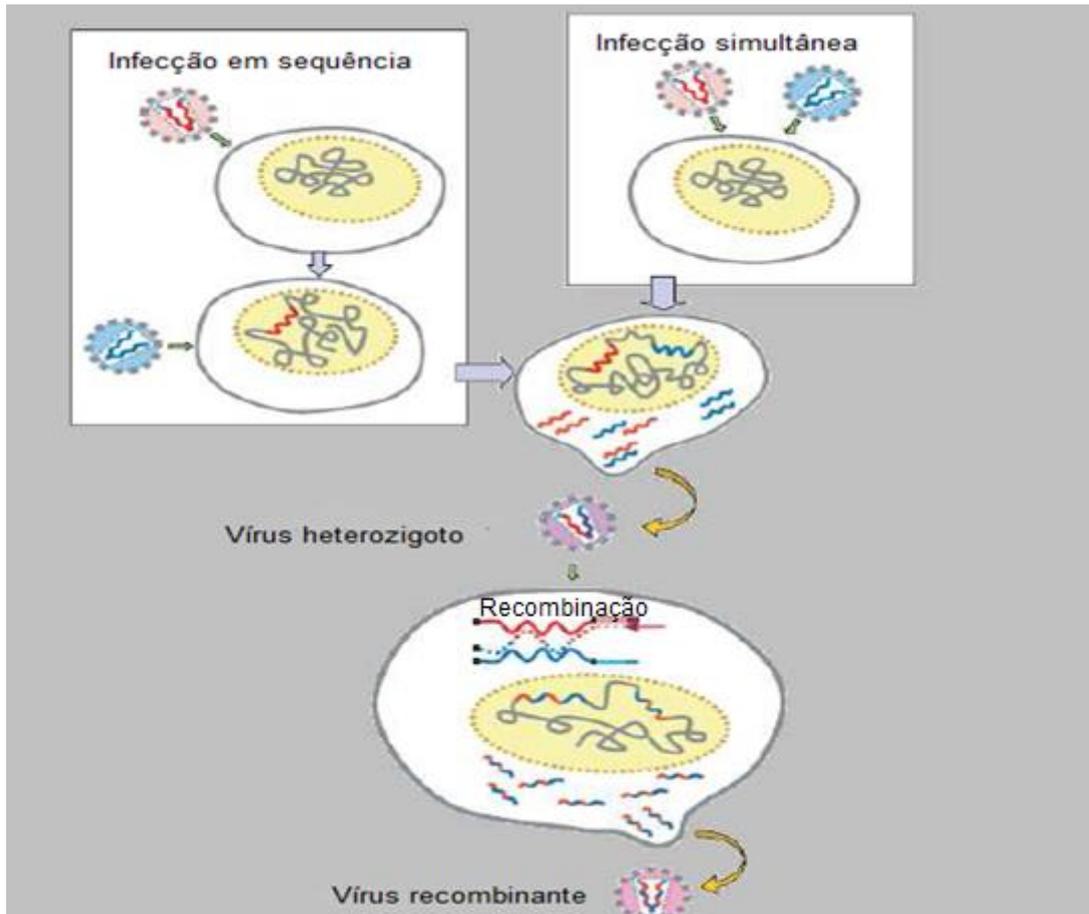


Figura 14: Formas recombinantes de HIV

Fonte: Nájera *et al*, 2002

4. JUSTIFICATIVA

A AIDS é a DST que mais causa óbitos no mundo, e por ser uma doença que não tem cura, ela se torna um problema de saúde pública, onde a maior taxa da infecção se concentra no continente africano (Cunico; Gomes; Vellasco Junior, 2008). A AIDS ocorre quando há uma diminuição muito significativa dos linfócitos T CD4+, levado a uma grave deficiência do sistema imunológico, limitando a capacidade de resposta a defesa contra patógenos (Brito *et al*, 2000).

O HIV-1 e o HIV-2 possuem apenas 40% de similaridade genômica sendo que o tipo 1 é mais virulento, possui a maior epidemiologia mundial e é mais mutável, apresentando assim uma maior resistência aos fármacos antirretrovirais. O tipo 2 evolui ao grau de AIDS de uma forma mais lenta, não é tão virulento e mutável, possuindo a característica de ser encontrado praticamente na África Ocidental (Ferreira; Riffel; Sant'Ana, 2010; Hill; Rosenbloom; Nowak, 2012).

A protease do HIV-1 é um importante alvo para o tratamento da infecção viral, visto que inibindo esta enzima não terão vírus maduros e infectivos. Porém o vírus produz diversas mutações que reduzem a susceptibilidade aos inibidores de protease (Batista, 2005). A mutação D30N é a mutação primária que confere resistência ao inibidor Nelfinavir um dos mais importantes e mais usados inibidores de protease (Martins, 2007; Jhonson, 2009). A mutação I84A confere resistência cruzada a oito inibidores de protease, incluindo o Nelfinavir. No estudo de Rhee *et al* (2010) teve um coeficiente de resistência superior a mutação D30N. A mutação M46I é uma mutação secundária que está relacionada a recuperar o *fitness* da enzima que é afetado devido a outras mutações para que assim possa exercer sua função normalmente e ainda assim ser resistente (Piana, Carloni & Rothlisberger, 2002).

Um importante avanço para o tratamento contra o HIV é a realização de uma terapêutica em que não tenha uma toxicidade para o indivíduo e que o medicamento atue sem perda de função. Através das técnicas de bioinformática e dinâmica molecular, é importante analisar a eficácia da interação do inibidor de protease em sua forma nativa e juntamente com as mutações D30N, I84A e M46I, para verificar o grau de perda de função em relação às mutações e mudança de conformação da enzima para uma forma mais próxima da sua forma nativa, mantendo sua função, contribuindo assim para uma boa evolução do tratamento.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Verificar os efeitos das mutações D30N, I84A e M46I na enzima protease HIV-1 na formação do complexo com o inibidor Nelfinavir através de técnicas de dinâmica molecular e bioinformática.

5.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do Nelfinavir na flexibilidade conformacional da proteína nativa;
- Verificar os efeitos da mutação D30N na flexibilidade conformacional do complexo protease-Nelfinavir;
- Verificar os efeitos da dupla mutação D30N/I84A na flexibilidade conformacional da protease em complexo com Nelfinavir;
- Verificar os efeitos da mutação D30N/I84A/M46I na flexibilidade conformacional da protease em apo e holo estrutura em complexo com Nelfinavir;
- Avaliar o efeito das mutações na energia livre do complexo protease-Nelfinavir;

6. METODOLOGIA

Para a realização deste trabalho, foram realizadas simulações de dinâmica molecular para analisar a flexibilidade da enzima HIV-1 protease em sua forma nativa, serão analisadas de forma individual as mutações D30N, I84A e M46I da HIV-1 protease complexada ao Nelfinavir, dupla (mutação D30N/I84A) e tripla mutação (D30N/I84A/M46I) para verificar também a diferença da HIV-1 protease não ligada e da HIV-1 protease ligada ao inibidor Nelfinavir através do PDB 1OHR.

6.1 Preparação dos sistemas

Foi realizado a protonação do aspartato 125 para a estabilização do sistema (Delphine *et al*, 2008). Os sistemas foram construídos através do programa AMBER 12 através do LeaP e o Antechamber, o primeiro para construir os sistemas, preparar os ligantes, atualizar moléculas e resíduos, adicionar cargas de solvatação e construir a caixa d'água (modelo TIP3P). O segundo irá reunir campos de força para parametrização de moléculas e resíduos que não fazem parte de biblioteca padrão do programa. Resultando em arquivos com as coordenadas cartesianas do sistema e dos parâmetros de topologia que juntos contém as informações necessárias para se realizar os cálculos de dinâmica (Case *et al*, 2005).

Os parâmetros de campo de força parm99SBildn foram utilizados no *software* AMBER 12 para a parametrização da proteína e íons. A minimização de energia do sistema foi realizada através de protocolos de passos múltiplos, com o ajuste de hidrogênio e o refinamento das moléculas de água para enfim obter a minimização. A termalização do sistema foi realizada em 4 etapas: 2 ns de 0 a 50 K com volume constante, 50 K a 150 K, 150 K a 20 e 250 K a 300 K, e 5 ns para equilibrar a densidade do sistema de maneira constante, uma trajetória de 40 ns ao final de cada sistema.

Técnicas de mecânica molecular foram utilizadas para adquirirmos fundamentos baseados nos movimentos dos núcleos e dos elétrons tratados separadamente, a partir de fundamentações de Born-Oppenheimer, a partir de cálculos de equações derivadas empiricamente para a superfície. Com o propósito de estudar uma estrutura anatômica e obter uma posição nuclear fixa. Nesta metodologia será suposto que a densidade eletrônica se ajusta instantaneamente às mudanças de configuração na configuração geométrica dos núcleos, assim se ajustando,

considerando um movimento livre e que todas as interações nucleares são aditivas (Cramer, 2004).

As moléculas foram consideradas como um complexo de átomos ligados entre si através de forças elásticas ou harmônicas, por forças de comprimento de ligação (r) ângulos de ligação (θ), ângulos de torção (ϕ), e interações entre átomos não ligados (d) (figura 15).

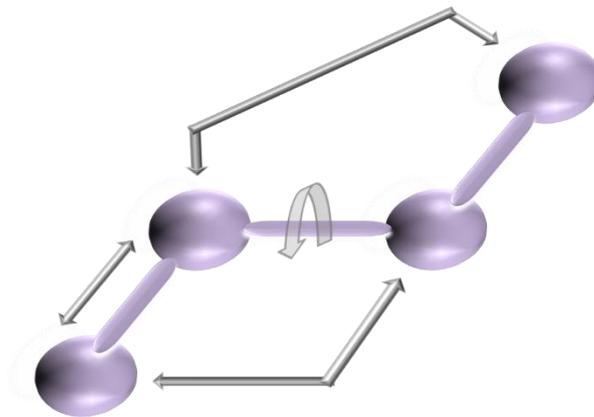


Figura 15: Contribuições estruturais para uma determinada molécula

Fonte: Moraes, *et al*, 2010.

As equações abaixo foram utilizadas para os cálculos da energia destas forças:

$$E = \sum K_r (r - r_0)^2 \quad \text{Energia de ligação;}$$

$$+ \sum K_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad \text{Energia dos ângulos de ligação;}$$

$$+ \sum K_\phi [1 + \cos(n\phi - \gamma)] \quad \text{Energia dos ângulos de torção;}$$

$$+ \sum_{ij} [\frac{A_{ij}}{r^{12}} - \frac{B_{ij}}{r^6} + q_i q_j] \quad \text{Energia de interação entre átomos que não}$$

fazem ligações.

A somatória dessas forças será necessária para se determinar um campo de força empírico para parametrizar o sistema a ser estudado. O campo de força

representa a energia potencial molecular em relação a uma geometria de referência, em um determinado sistema de coordenadas:

$$U = \sum U_{(r)} + \sum U_{(\theta)} + \sum U_{(\phi)} + \sum U_{(d)}$$

U , é a energia espacial da molécula e é considerada como a diferença da energia da molécula real e hipotética, em que os parâmetros estruturais são os valores ideais ou “naturais” para uma situação hipotética onde não existem quaisquer tensões entre as coordenadas internas do sistema molecular:

$U_{(r)}$ é a distância de ligação ideal;

$U_{(\theta)}$ é a energia de deformação do ângulo de ligação em relação a seu valor ideal;

$U_{(\phi)}$ é a energia devido à torção em torno de uma ligação;

$U_{(d)}$ é a energia da interação entre átomos não ligados.

Ligações eletrostáticas ou de hidrogênio também poderão ser adicionadas ao campo de força, assim como ligações cruzadas, representado pelos termos cruzados que consideram um certo número de interações entre comprimento de ligações (Clark, 1985).

A preparação de sistema foi realizada em uma máquina pessoal e as tarefas de simulação mais demoradas e que exigem mais do processador, foram simuladas em um sistema de lotes de uma máquina remota, para assim obter formato de arquivo estáveis e bem definidos para estas interfaces. (Case *et al*, 2005; Roe; Cheatham, 2013; Salomon-Ferrer; Case; Walker, 2013).

6.2 Dinâmica Molecular

Foi utilizado dois programas do AMBER para a simulação de dinâmica molecular, que são os programas SANDER (*Simulated Annealing with NMR-Derived Energy Restraints*) e o PMEMD (*Particle Mesh Ewald Molecular Dynamics*). O SANDER estão os principais parâmetros operacionais para a realização de cálculos que serão necessários para a simulação de dinâmica molecular como minimização de energia, dinâmica molecular e deslocamentos químicos de ressonância magnética

nuclear (RMN), com seu código-fonte escrito em Fortran-90, utilizando de uma sintaxe de lista para reconhecer os parâmetros definidos, apresentando cerca de 150 variáveis possíveis que podem ser adicionadas ao processo a ser calculado além de permitir dois tipos de condições periódicas octaedro e cubica (Case *et al*, 2005).

O PMEMD envia para cada processador apenas as informações coordenadas necessárias para calcular os pacotes de energia potencial que é atribuído por ele, na intenção de otimizar o desempenho do processador. (Do Nascimento *et al*, 2013; Salomon-Ferrer; Case; Walker, 2013 Duke *et al*, 2009).

6.3 Análise das trajetórias

As análises de trajetória foram realizadas pelo CPPTRAJ (*Complementary Program to PTRAJ*), para análise de séries temporais de posições atômicas tridimensionais que processam múltiplas trajetórias e apresentam uma lista de procedimentos de análise muito extensa, como cálculos de trajetória, RMSD (*Root Mean Square Deviation* - Desvios quadráticos médios atômicos, RMSF (*Root Mean Square Fluctuation* – Desvios quadráticos médios atômicos de flutuação) distância de ligações, trajetória de energias e potencial eletrostático e médio dos sistemas. (Roe; Cheatham III, 2013).

As análises de energia livre de Gibbs foram realizadas através da energia de interação solvatada por um conjunto de *scripts* para determinar a energia livre de ligação a partir das trajetórias da dinâmica entre a proteína e o ligante baseado na previsão de afinidades de ligação ligante-proteína, que representa uma racionalidade entre tempo, custo reduzido devido a utilização de métodos computacionais e uma acurácia maior para complementar a energia de interação do campo de força com a dessolvatação da ligação (Sulea; Purisima, 2012). Foram utilizados parâmetros ajustados para reproduzir as energias livres de ligação de um conjunto dos complexos proteína-ligante, incluindo os termos da constante dielétrica do soluto, interação de Van der Waals, interação de Coulomb, cavidade e o campo de reação (Cui *et al*, 2008).

O estado livre do sistema foi obtido a partir da fragmentação rígida da proteína e do substrato de conformações do seu estado complexado e a formação das ligações de hidrogênio incluídas implicitamente no efeito eletrostático, em afinidades de ligação para um fator de escalonamento global empírico, deste modo, podendo ser

interpretado como o mecanismo de compensação de entropia na energia de ligação MM/GBSA (Sulea; Purisima, 2012).

A energia livre foi calculada para cada estado admitindo que uma média temporal infinita seja igual a uma média de *ensemble*, assim, um número finito de amostras é utilizado para estimar uma média temporal e a integração é resolvida (Shirts, 2012).

7. RESULTADOS

Ao longo dos 40ns de dinâmica molecular, a protease do HIV-1 mostrou uma variação estrutural dentre os sistemas aqui estudados. O sistema 1OHR com inibidor demonstrou uma conformação fechada da enzima enquanto que o mesmo sistema sem inibidor, apresentou uma conformação aberta (figura 16).

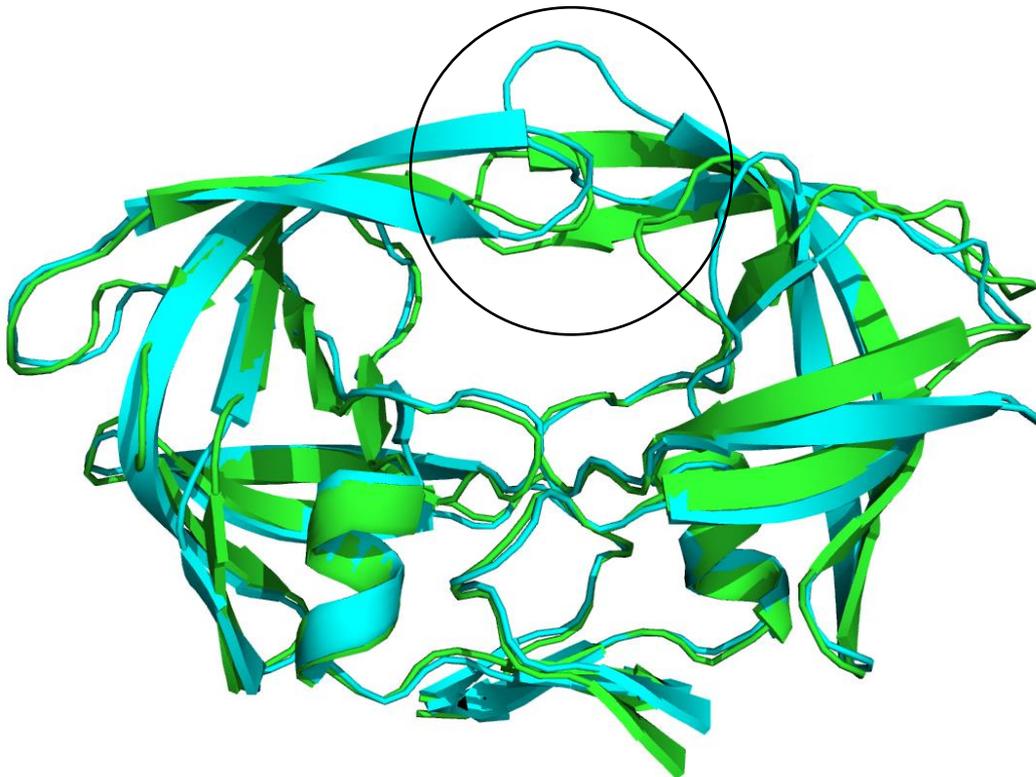


Figura 16: Sobreposição da estrutura da Protease do HIV-1 na sua forma nativa com inibidor (coloração verde) e sua forma nativa sem inibidor (coloração azul). Para mostrar a diferença de abertura do *flap* da enzima em relação as duas estruturas demonstradas.

A análise conformacional através dos gráficos de RMSD dos sistemas nativos com e sem inibidor, mostraram uma maior movimentação da enzima sem inibidor, e o sistema com inibidor mais estável (figura 17).

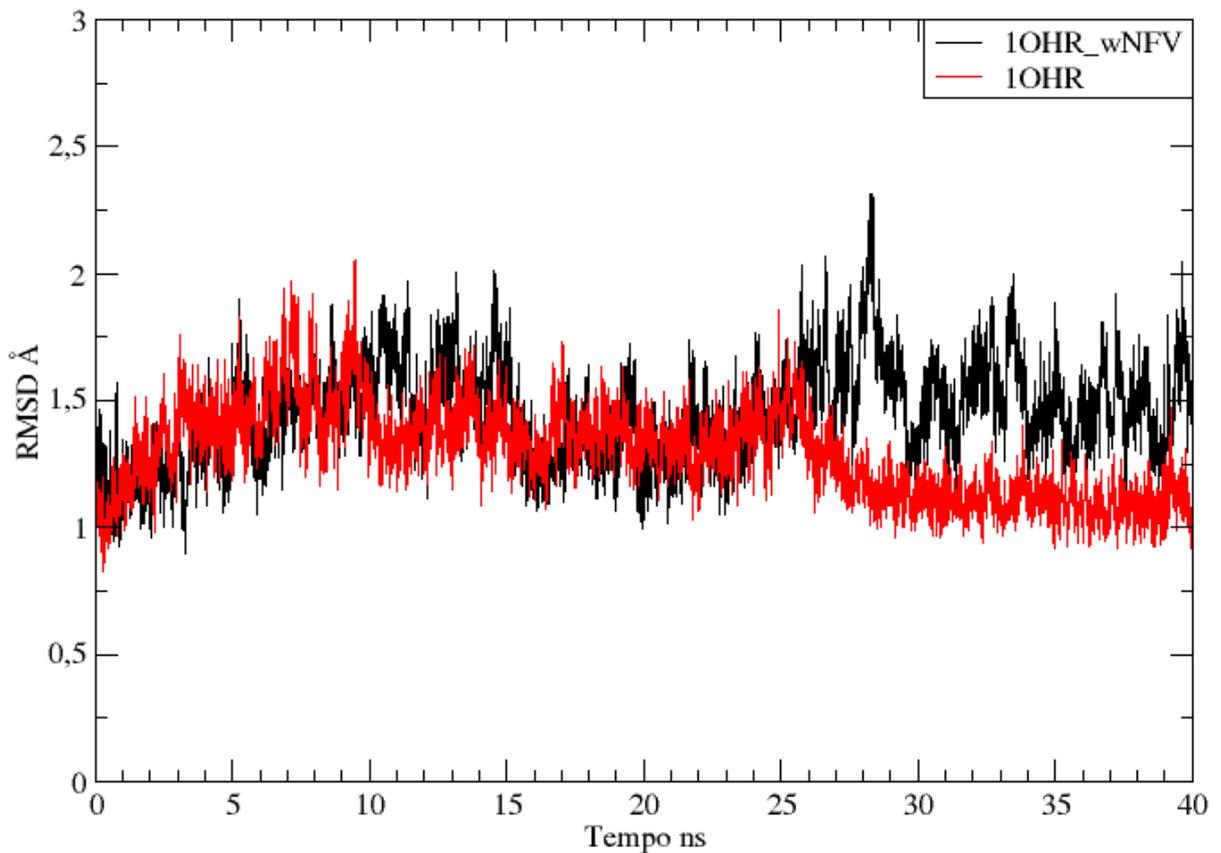


Figura 17: RMSD dos 40ns de dinâmica molecular da protease do HIV-1 em sua forma nativa sem inibidor (coloração preta) e na sua forma nativa com inibidor (coloração vermelha).

As análises de RMSF mostraram uma maior flutuação dos resíduos de aminoácidos da enzima sem inibidor, sendo que se destaca a isoleucina 50 das cadeias A e B, que é um aminoácido importante para o *flap* da enzima, tanto para a abertura, quanto para manter a proteína fechada figura (18).

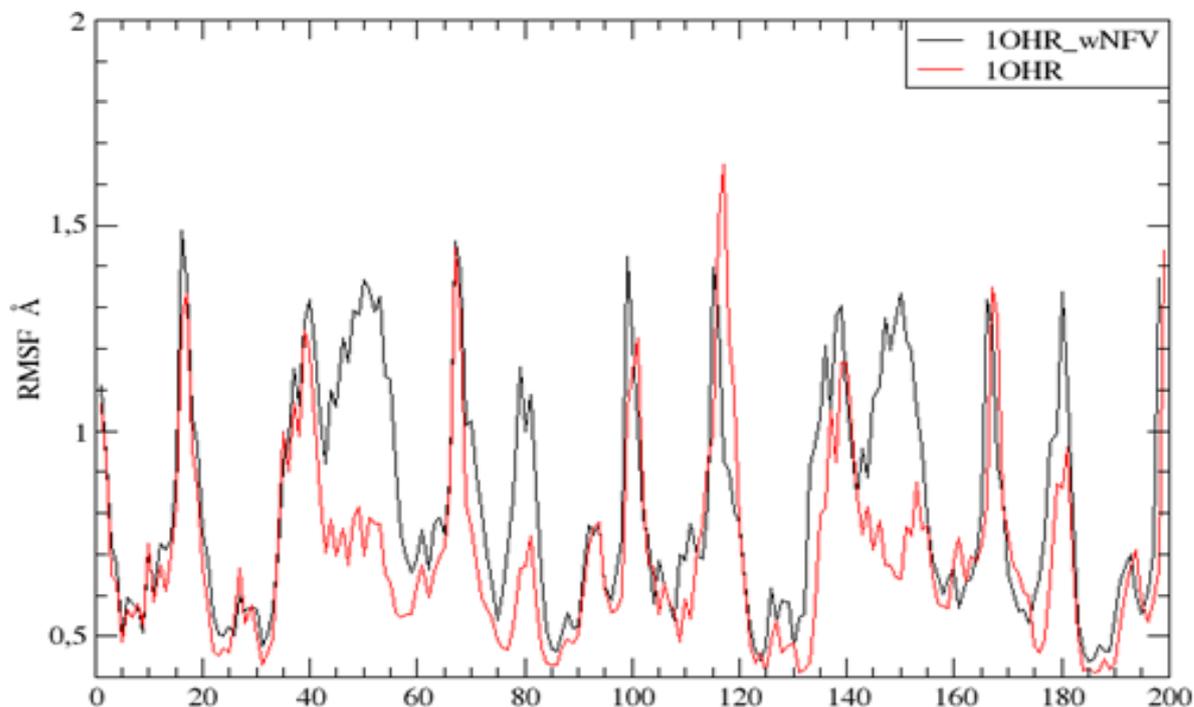


Figura 18: RMSF dos 198 resíduos de aminoácidos da protease do HIV-1 em sua forma nativa sem inibidor (em preta) e na sua forma nativa com inibidor (em vermelho).

A mutação que leva a substituição D30N, ao longo dos 40ns de dinâmica molecular, apresentou diferenças estruturais, comparados ao sistema com a enzima nativa, de um *flap* em conformação semi-aberta, alterações no sítio ativo e mudanças na forma de apresentação do inibidor na cavidade (figura 19).

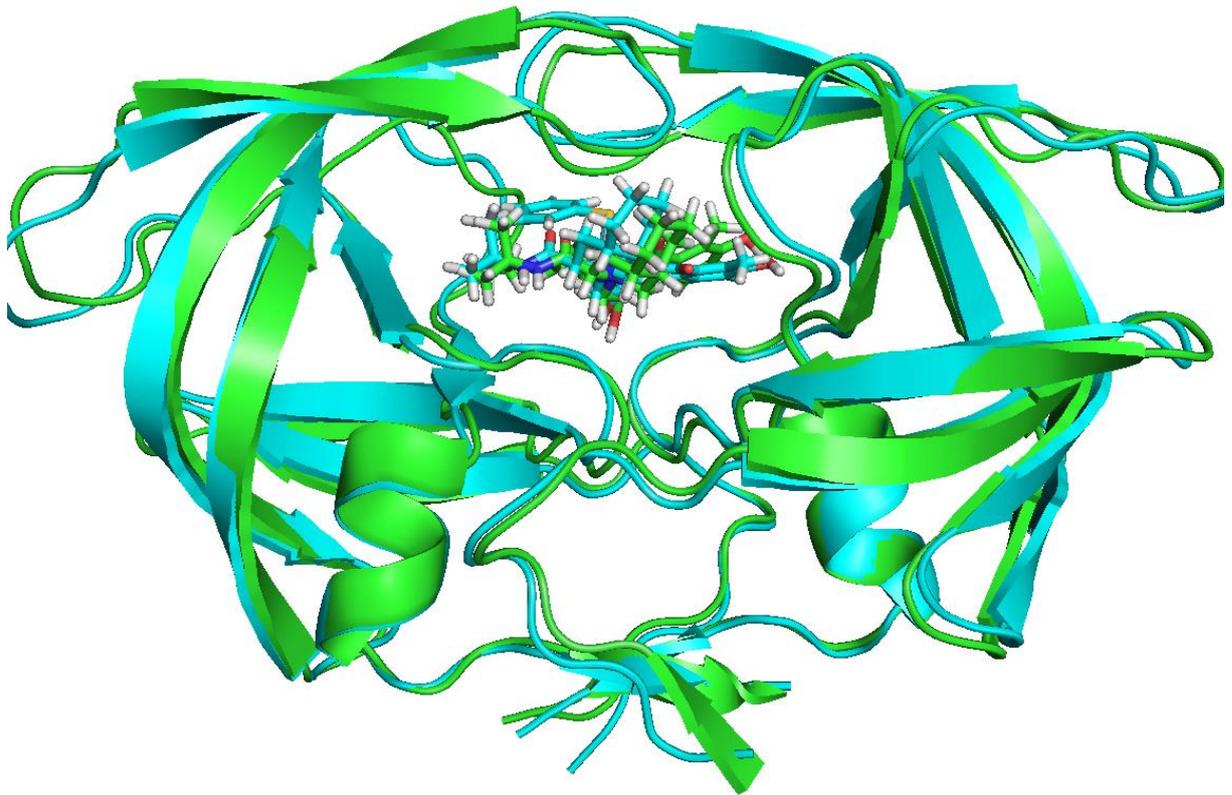


Figura 19: Sobreposição das estruturas 1OHR (Nativa com inibidor em verde) e D30N (enzima com mutação no resíduo 30 em azul).

As análises de RMSD mostraram maior instabilidade da enzima com a mutação já nos últimos nanossegundos da dinâmica e o sistema sem mutação apresentou instabilidade um pouco maior no começo, mas no decorrer da dinâmica permaneceu e terminou de forma estável, comprovando a eficiência inibitória do Nelfinavir. Pôde se observar também pelo RMSD, que a protease nativa (1OHR) apresenta uma conformação fechada, e o sistema com mutação uma conformação semi-aberta (figura 19).

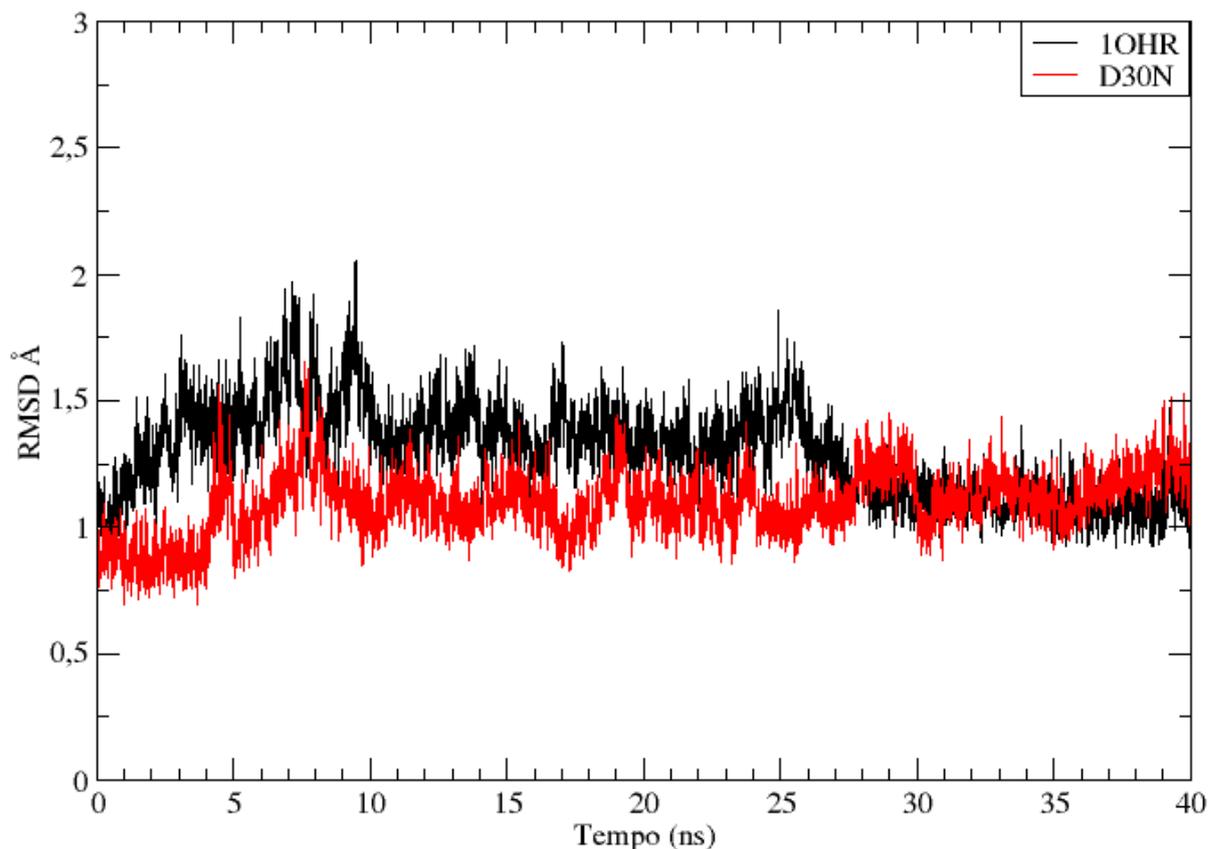


Figura 20: RMSD dos 40ns de dinâmica molecular da protease do HIV-1 em sua forma nativa com inibidor (em preto) e com a mutação D30N (em vermelho).

As análises de RMSF em comparação com os sistemas com a protease nativa (1OHR) e com a mutação (D30N), mostraram uma maior flutuação de resíduos de aminoácidos do sistema com a protease mutada. Todos os 198 resíduos de aminoácidos flutuaram mais em relação a protease nativa, conseqüentemente pela característica dessa mutação apresenta perdas de ligações de hidrogênio que a substituição de um aspartato para uma asparagina causa (figura 21).

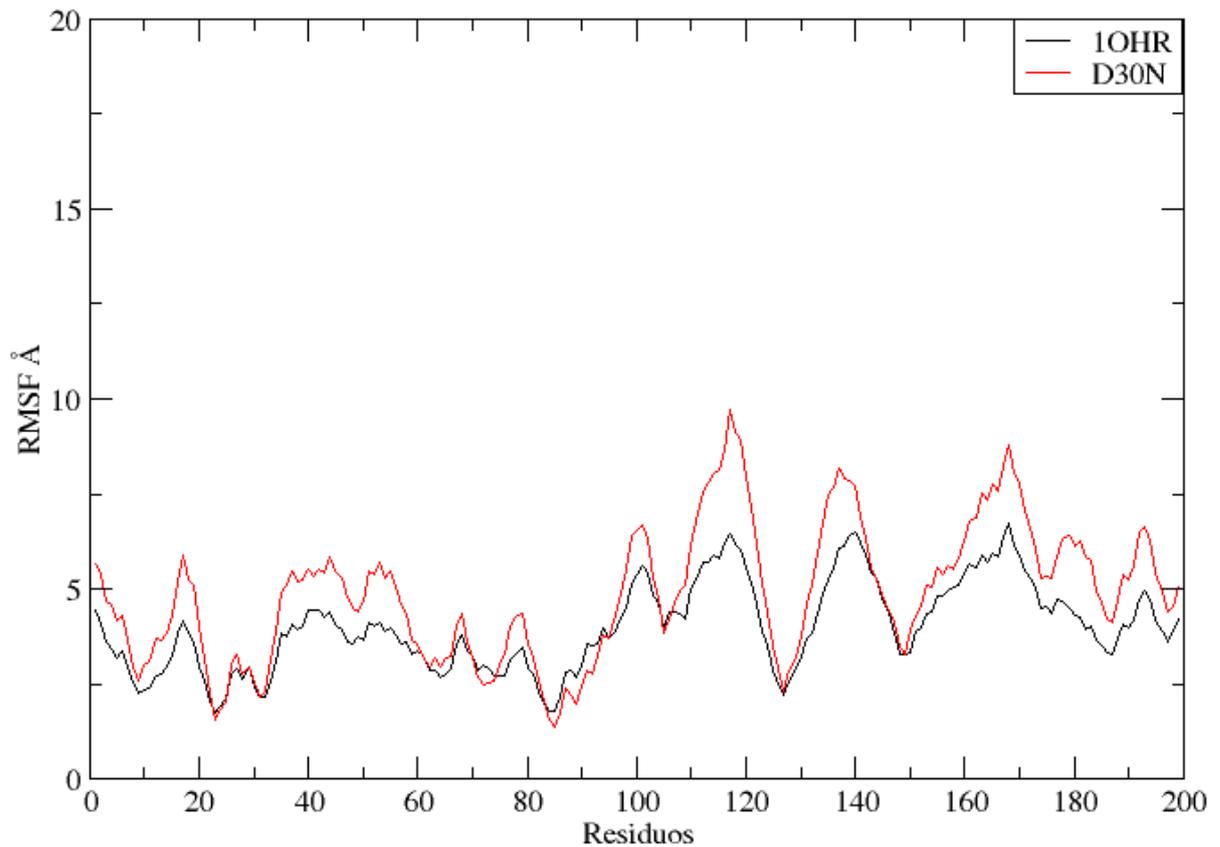


Figura 21: RMSF dos 198 resíduos de aminoácidos da protease do HIV-1 em sua forma nativa com inibidor (coloração preta) e com a mutação D30N (coloração vermelha).

As mudanças estruturais da dupla mutação que leva à substituição da isoleucina por uma alanina no aminoácido 84 (I84A) foi a que mais se destacou em termos visuais de abertura do *flap* da enzima. Esse sistema apresentou um enorme contraste mesmo comparado o sistema D30N em que é evidente a abertura do *flap* (figura 21).

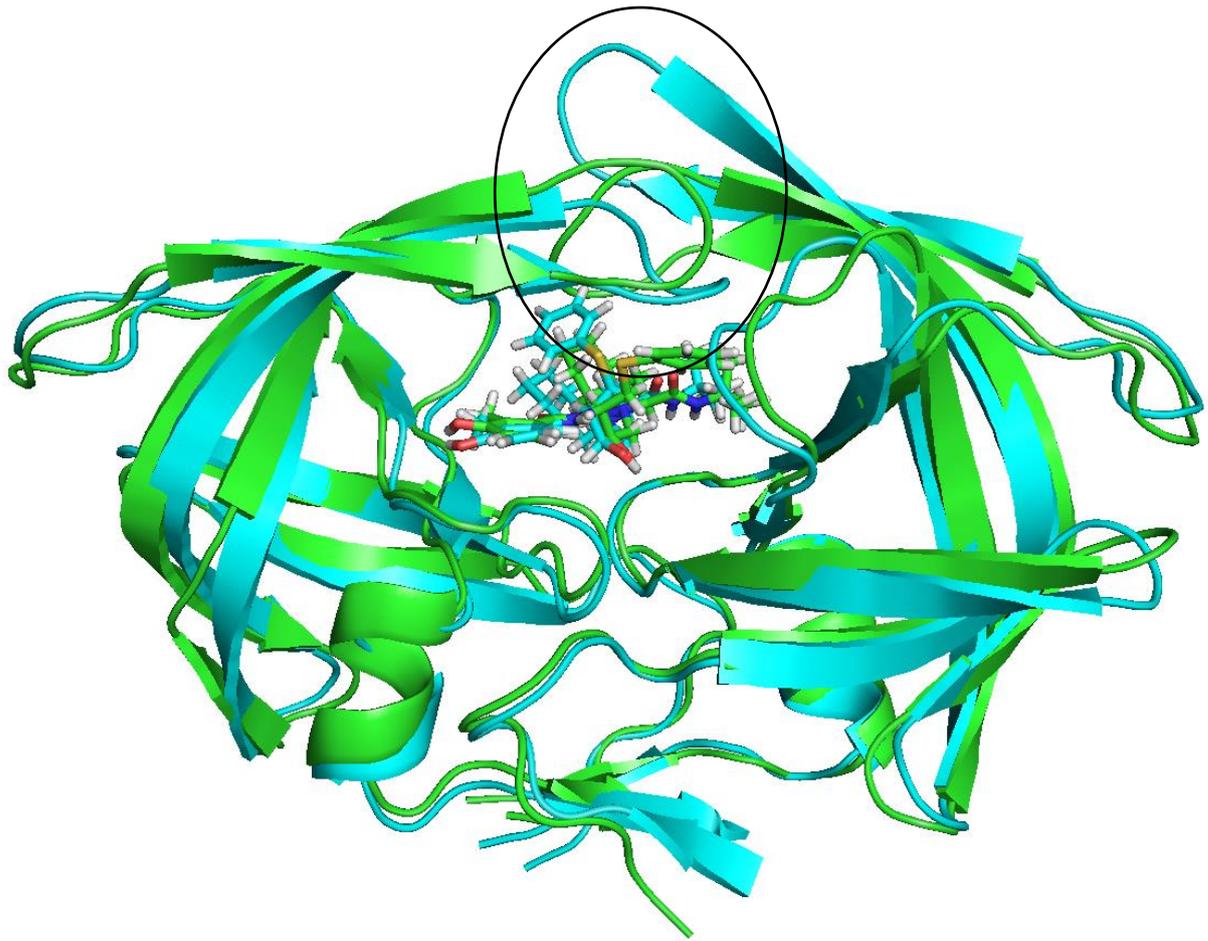


Figura 21: Sobreposição da estrutura da protease do HIV-1 com a mutação D30N (em verde) e com a dupla mutação D30N_I84A (em azul).

O sistema D30N_I84A foi o que mais apresentou instabilidade nas análises de RMSD, terminando a dinâmica acima de 1.5 angstroms o que se aumenta variação a medida que a dinâmica se estende e dá a característica de abertura do *flap*, que é mostrado na figura 19 na estrutura da enzima. A variação do sistema com a dupla mutação foi superior à da mutação D30N que apresentou uma conformação semi-aberta (figura 22).

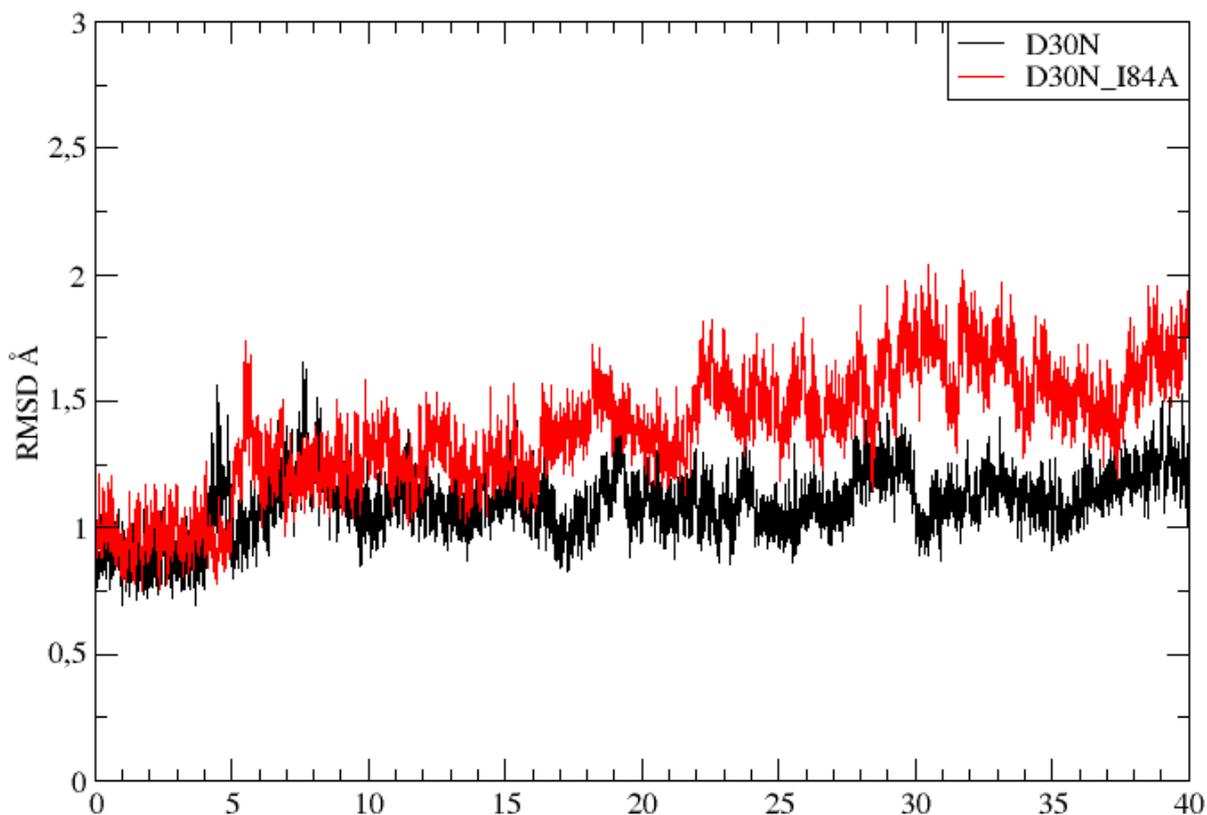


Figura 22: RMSD dos 40ns de dinâmica molecular da protease do HIV-1 com a mutação D30N (em preto) e com a dupla mutação D30N_I84A (em vermelho).

Os RMSF dos sistemas D30N+D30N_I84A apresentaram uma predominância de flutuação dos resíduos de aminoácidos do sistema D30N_I84A, com destaque para os aminoácidos das regiões 120 e 140, próximos de onde há a substituição D30N. Os aminoácidos em torno da substituição I84A, diferem em relação às cadeias da enzima, a cadeia A apresenta menor atividade, diferente do resíduo 84 da cadeia B e apesar de ter baixa atividade levando em consideração a cadeia, no geral, se mostra com alta atividade de flutuação (figura 23).

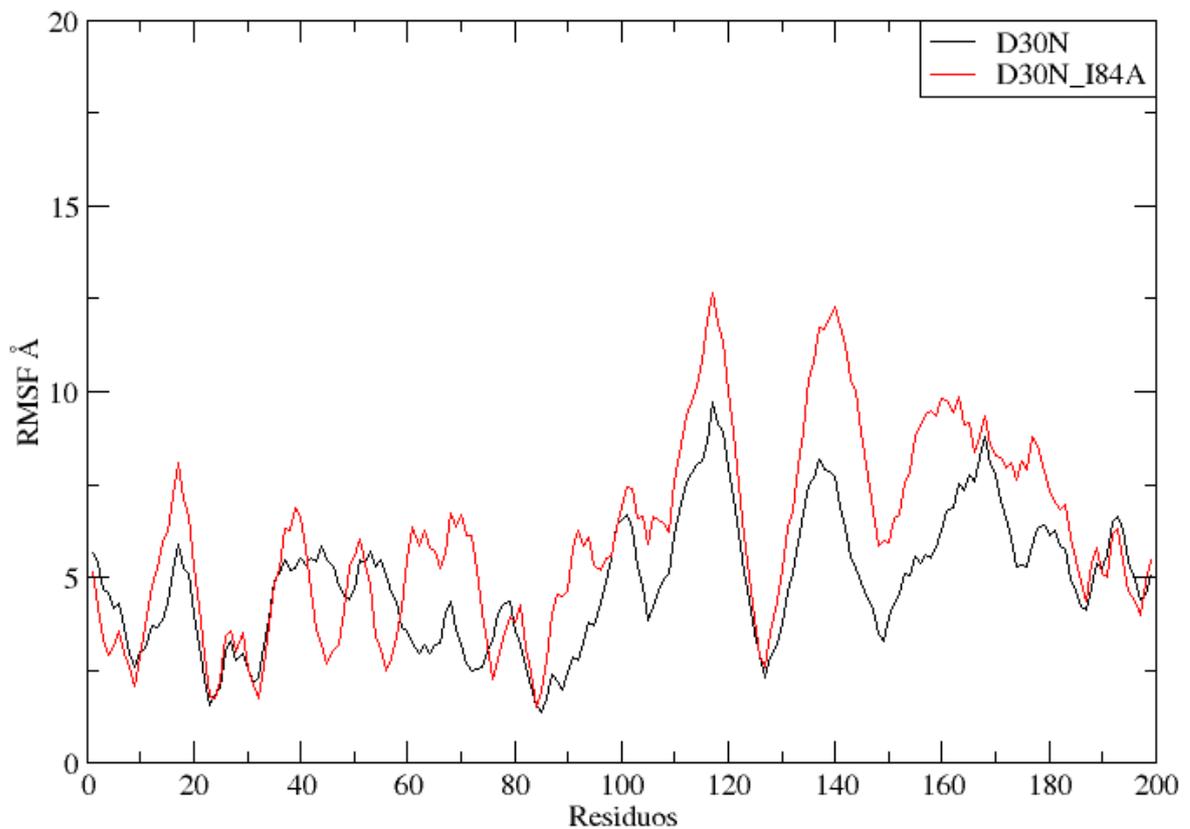


Figura 23: RMSF dos 198 resíduos de aminoácidos da protease do HIV-1 com a mutação D30N (coloração preta) e com a dupla mutação D30N_I84A (coloração vermelha).

A dinâmica envolvendo a tripla mutação foi de extrema importância para a avaliação da mutação que leva à substituição M46I, em relação a recuperação da estrutura da enzima aproximada a enzima nativa. A análise estrutural, mostrou a capacidade de recuperação dessa mutação diante de uma mutação extremamente supressora que consiste do sistema D30N_I84A. É possível analisar a tentativa de recuperação principalmente da cadeia B, em que a enzima apresenta uma conformação semi-aberta (figura 24).

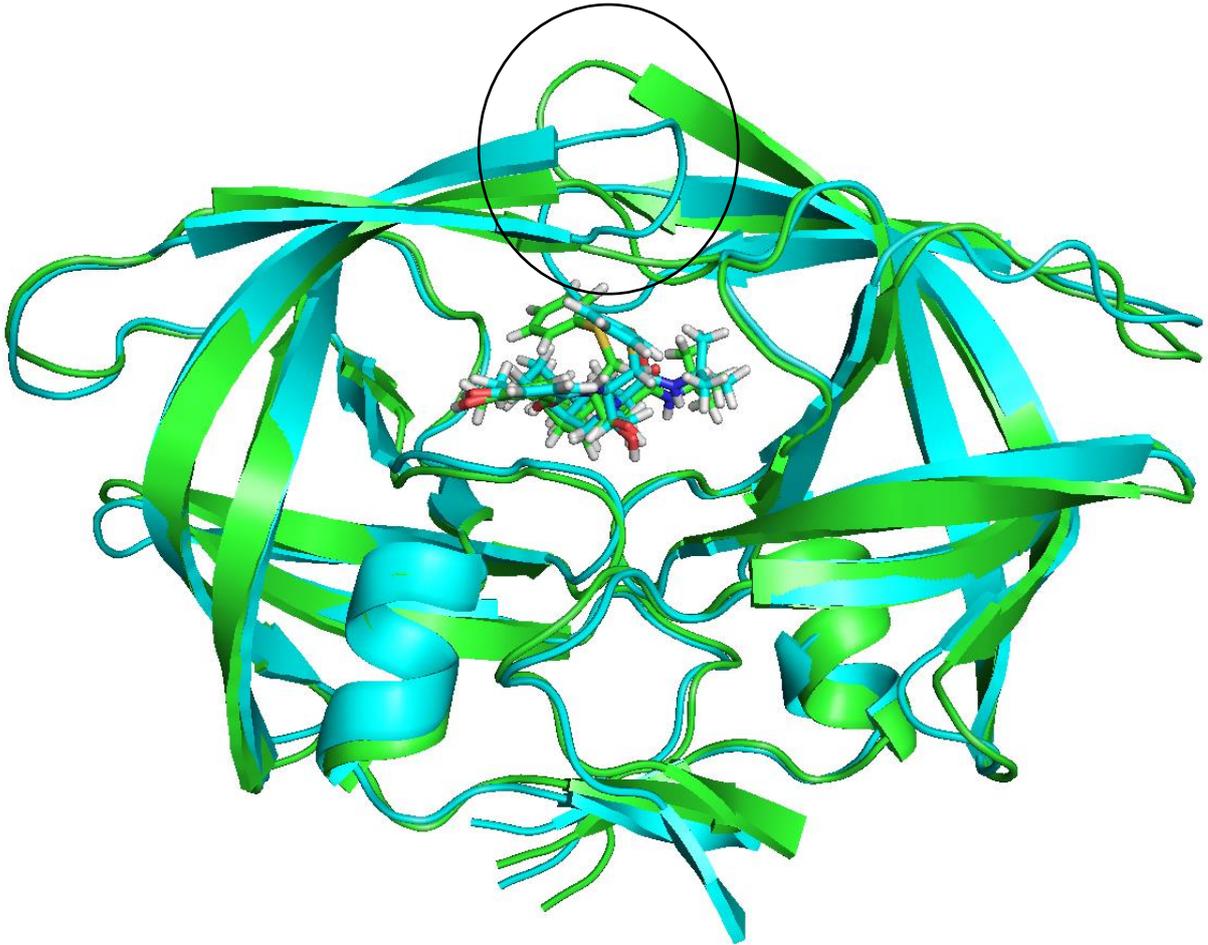


Figura 24: Sobreposição da estrutura da protease do HIV-1 com a mutação D30N_I84A_M46I (em azul) e com a tripla mutação D30N_I84A_M46I (em verde).

A análise estrutural dos sistemas, principalmente da tripla mutação, foi encontrada que uma maior estabilidade nos gráficos de RMSD, e uma maior variação do sistema com a dupla mutação (figura 25).

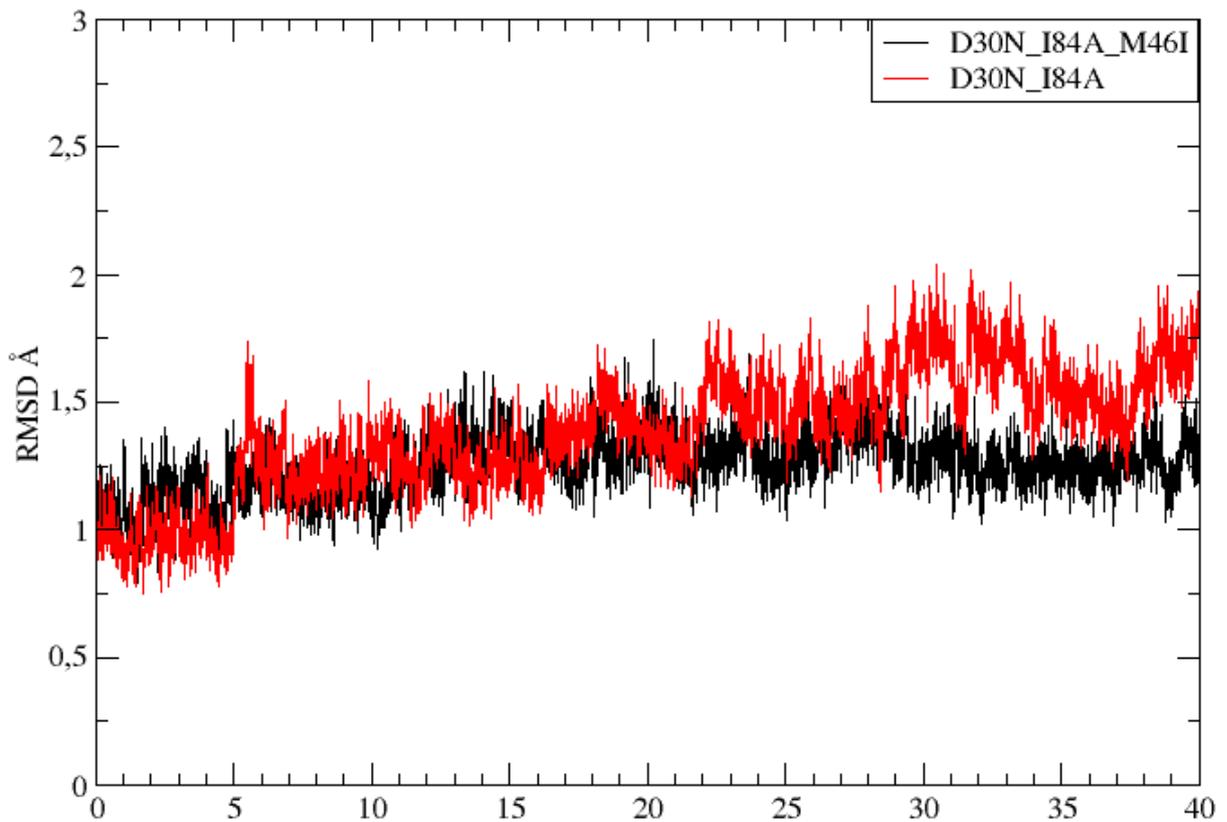


Figura 25: RMSD dos 40ns de dinâmica molecular da protease do HIV-1 com a tripla mutação D30N_I84A_M46I (em preto) e com a dupla mutação D30N_I84A (em vermelho).

Nos resultados de RMSF houve uma diferença dentre os outros sistemas, em que apesar do sistema com três mutações apresentar maior estabilidade no RMSD, no RMSF, foi o que apresentou mais flutuação devido a característica da substituição da metionina pela isoleucina no resíduo 46, que aumenta a atividade catalítica, promovendo um aumento da flutuação dos resíduos (figura 26).

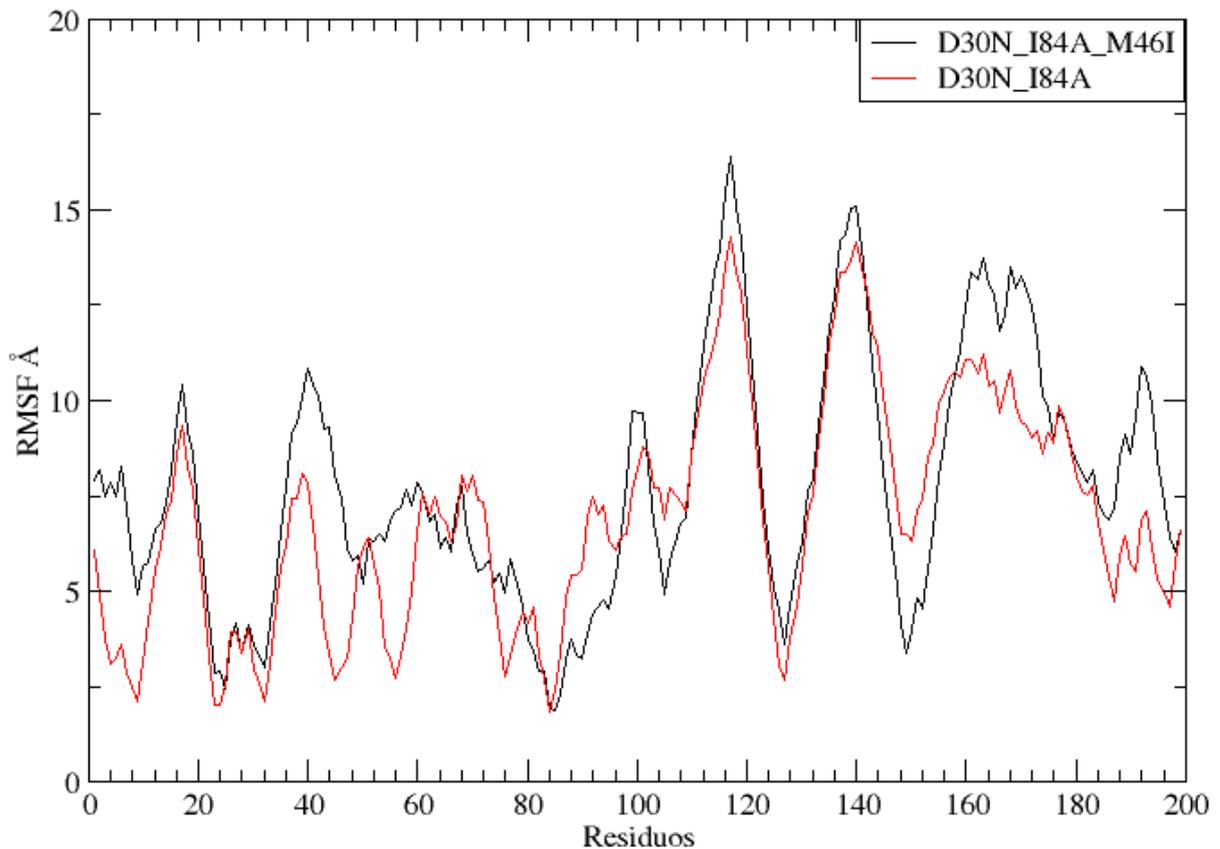


Figura 26: RMSF dos 198 resíduos de aminoácidos da protease do HIV-1 com a mutação D30N_I84A_M46I (em preto) e com a dupla mutação D30N_I84A (em vermelho).

Para efeitos comparativos, em relação a importância de cada complexo para a definição da variabilidade do sistema, o que mais chamou atenção foi o complexo com três mutações, (D30N_I84A_M46I) que apresentou uma variabilidade semelhante à do sistema com a mutação simples (D30N). Estes dois sistemas apresentaram variação parecida durante todos os 40ns de dinâmica molecular, aproximando-se ainda mais no fim da dinâmica, apontando uma conformação semi-aberta. Em relação ao sistema com a tripla mutação (D30N_I84A_M46I) que antes já se mostrava ser o mais instável (figura 27).

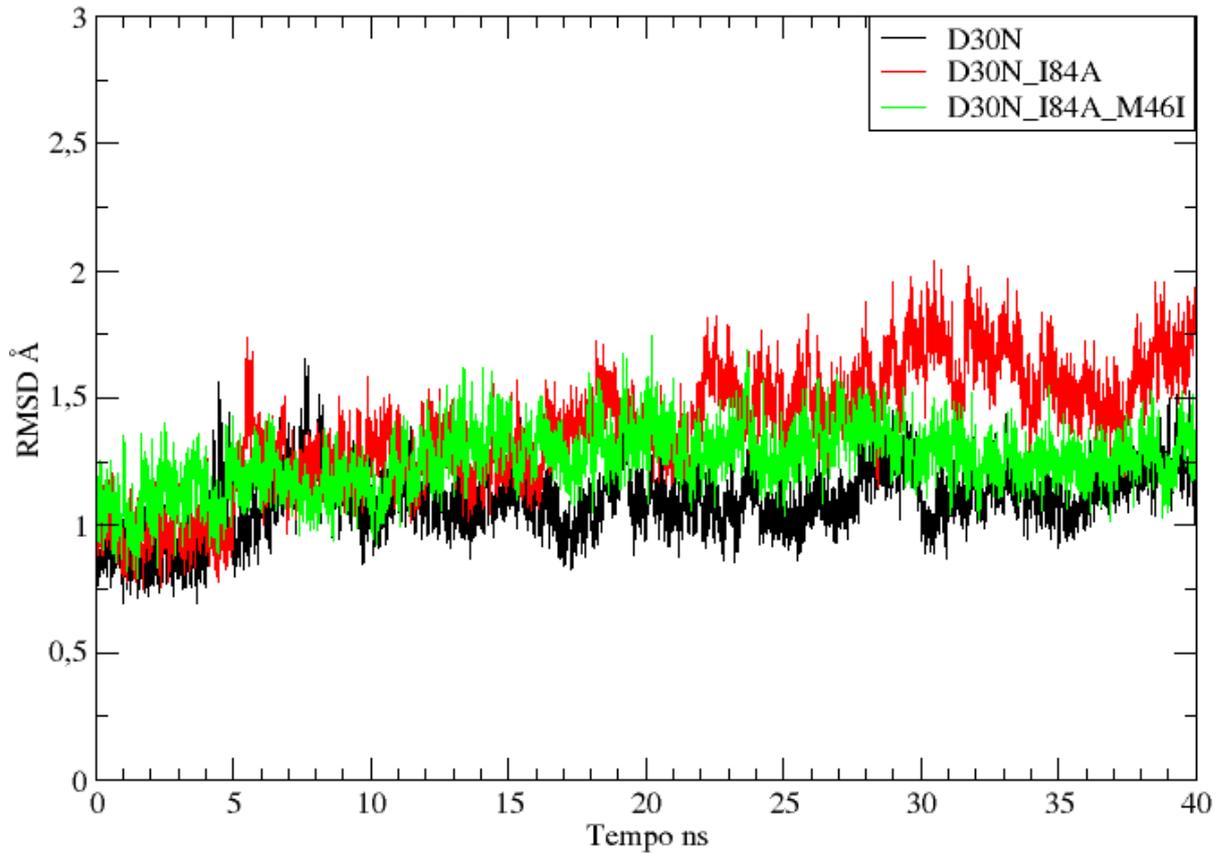


Figura 27: RMSD dos 40ns de dinâmica molecular da protease do HIV-1 com a mutação D30N (em preto) e com a dupla mutação D30N_I84A (em vermelho) e a tripla mutação D30N_I84A_M46I (em verde).

Devido a característica que a mutação possui, o sistema com mutação tripla foi o que mais apresentou flutuação de resíduo. Foram feitas análises de RMSF dos 3 sistemas que mutações juntas, em que os sistemas que mais flutuaram foram os com a tripla mutação, mutação dupla e mutação simples (figura 28).

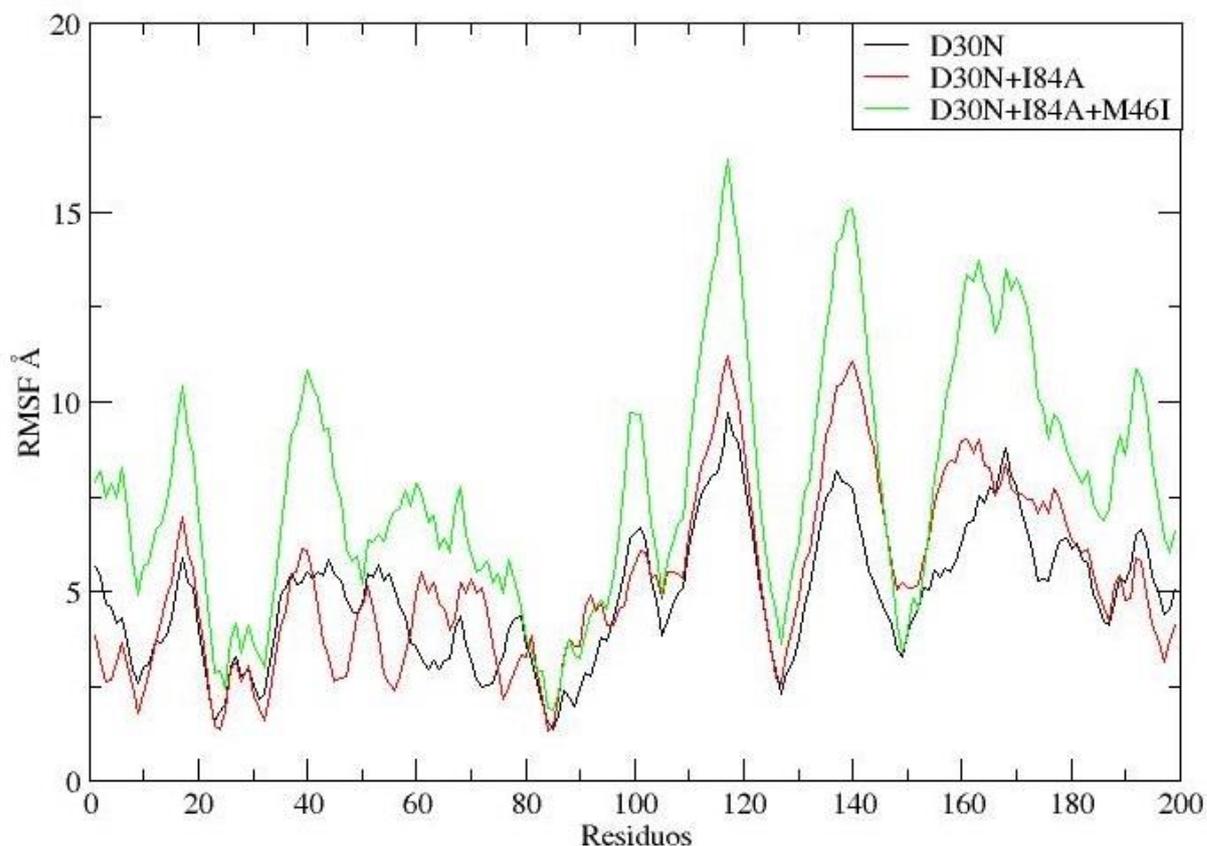


Figura 28: RMSF dos 198 resíduos de aminoácidos da protease do HIV-1 com a mutação D30N (em preto), com a dupla mutação D30N_I84A (em vermelho) e a tripla mutação D30N_I84A_M46I.

Ao longo dos 40ns de dinâmica, o Nelfinavir apresentou diferentes formas no sítio ativo da enzima (figura 29). A interação entre o fármaco e o inibidor apresentou ligações importantes com os aminoácidos, glicina 27, aspartato 30 das cadeias A e B e isoleucina 50 e 84 (figura 30) e suas distâncias de ligação (tabela 2). Nos cálculos de energia livre MM/GBSA, os sistemas apresentaram valores de -56.96 -47.73, -40.46 e -54.57 Kcal/mol (tabela 3).

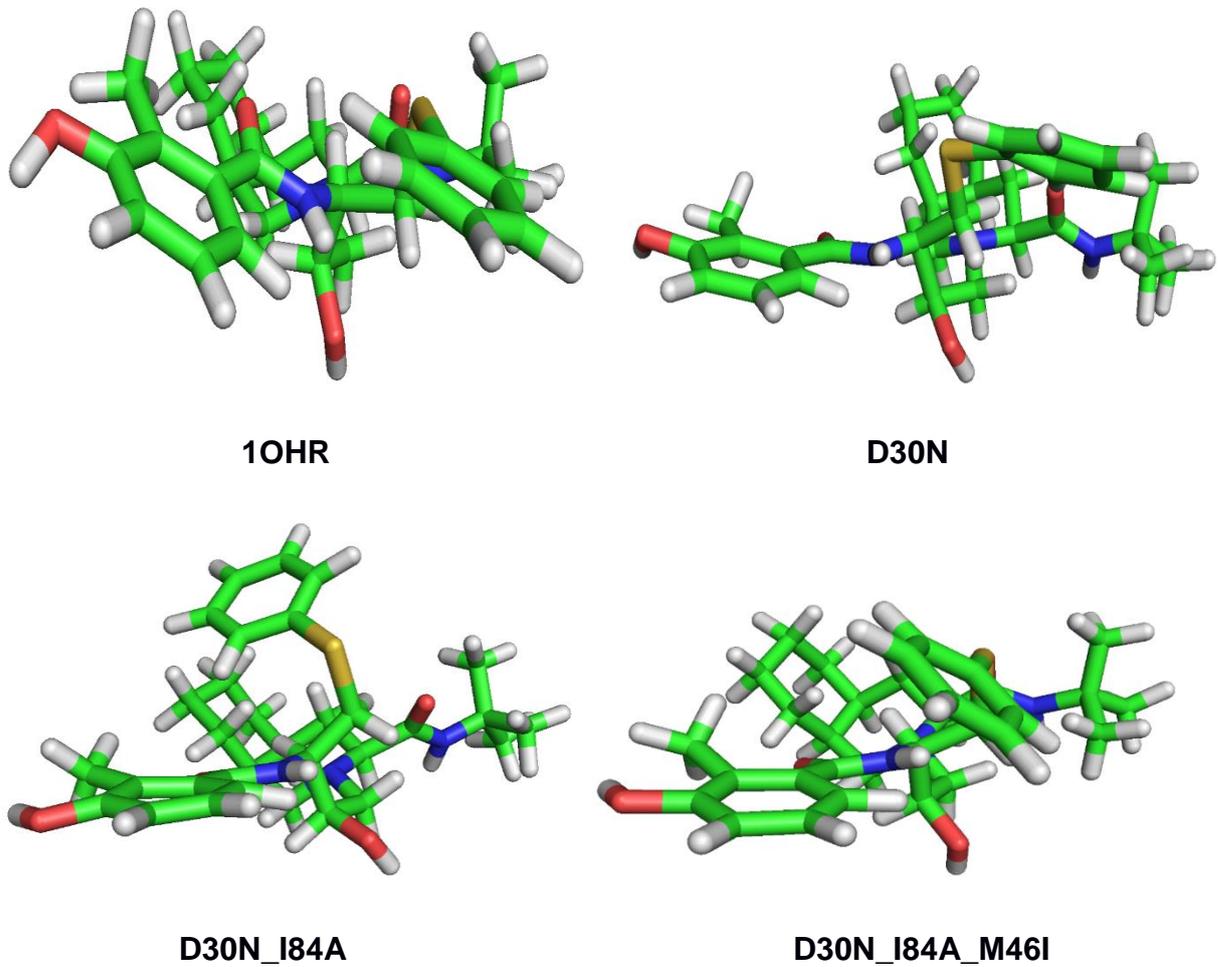
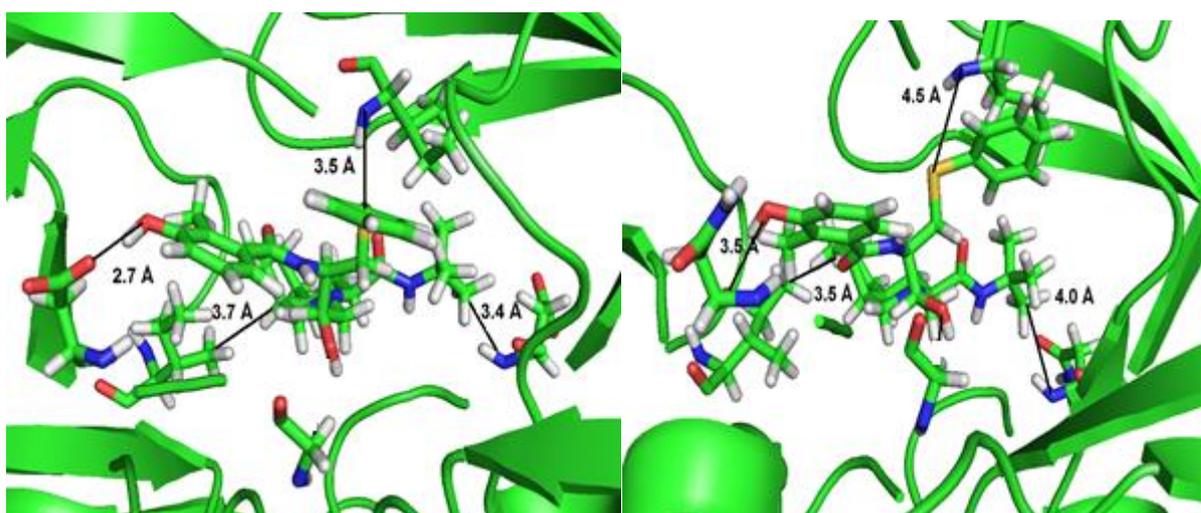


Figura 29: Formas apresentadas pelo Nelfinavir no final dos 40ns de dinâmica dos respectivos sistemas abordados 1OHR, D30N, D30N_I84A e D30N_I84A_M46I.



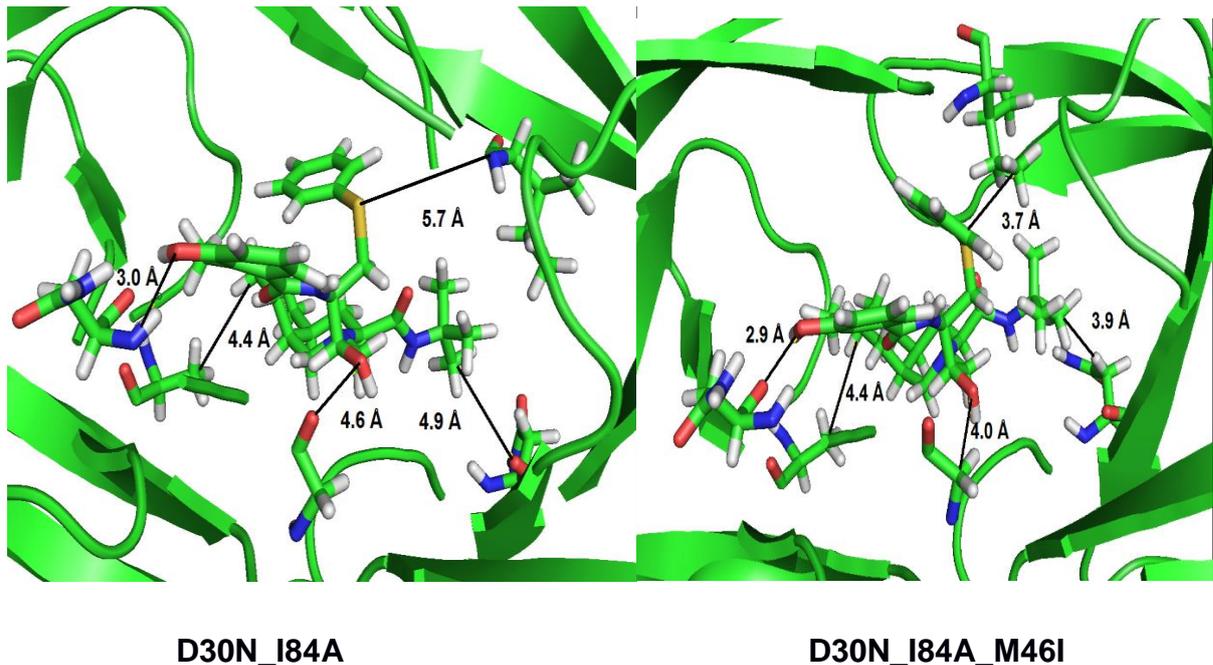


Figura 30: Caverna do sítio ativo da Protease do HIV-1 e suas principais interações com o Inibidor Nelfinavir

| 1OHR | | |
|----------------------|-------------------|-----------------------|
| Aminoácidos (Átomo) | Ligante (Átomo) | Distância (Angstroms) |
| Glicina 27 (C-Alfa) | Nelfinavir (C-2) | 4.1 (Angstroms) |
| Aspartato 30 (OD-2) | Nelfinavir (O-4) | 2.7 (Angstroms) |
| Aspartato 130 (N-13) | Nelfinavir (C-30) | 3.4 (Angstroms) |
| Isoleucina 50 (N) | Nelfinavir (S-1) | 4,5 (Angstroms) |
| Isoleucina 84 (CG-2) | Nelfinavir (C-1) | 3.7 (Angstroms) |
| D30N | | |
| Aminoácidos (Átomo) | Ligante (Átomo) | Distância (Angstroms) |
| Glicina 27 (Ca) | Nelfinavir (O-2) | 4.6 (Angstroms) |
| Aspartato 30 (N) | Nelfinavir (O-4) | 3 (Angstroms) |
| Aspartato (O) | Nelfinavir(C-12) | 4.9 (Angstroms) |
| Isoleucina (N) | Nelfinavir (S-1) | 5.7 (Angstroms) |
| Isoleucina (CB) | Nelfinavir (C-5) | 4.4 (Angstroms) |
| D30N_I84A | | |
| Aminoácidos (Átomo) | Ligante (Átomo) | Distância (Angstroms) |
| Glicina 27 (C-a) | Nelfinavir (O-2) | 4.6 (Angstroms) |

| | | |
|----------------------------|------------------------|------------------------------|
| Aspartato (N) | Nelfinavir (O-4) | 3 (Angstroms) |
| Aspartato (O) | Nelfinavir (C-12) | 4.9 (Angstroms) |
| Isoleucina (N) | Nelfinavir (S-1) | 5.7 (Angstroms) |
| Alanina (C-b) | Nelfinavir (C-5) | 4.4 (Angstroms) |
| D30N_I84A_M46I | | |
| Aminoácidos (Átomo) | Ligante (Átomo) | Distância (Angstroms) |
| Glicina 27 (C) | Nelfinavir (O-2) | 4 (Angstroms) |
| Aspartato 30 (O) | Nelfinavir (O-4) | 3.9 (Angstroms) |
| Aspartato 130 (CB) | Nelfinavir (C-12) | 3.9 (Angstroms) |
| Isoleucina 50 (N) | Nelfinavir (S1) | 3.7 (Angstroms) |
| Alanina 84 (CB) | Nelfinavir (C5) | 4.4 (Angstroms) |

Tabela 2: Distância em angstroms entre os átomos dos aminoácidos que constituem a protease do HIV-1 e os átomos que constituem o Nelfinavir.

| | Nativa | D30N | D30N_I84A | D30N_I84A_M46I |
|-----------------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| ΔG MM/GBSA Kcal/Mol | -56.96 | -47.73 | -40.46 | -54.57 |

Tabela 3: Valores dos resultados de Energia livre de cada sistema da protease do HIV-1 com o Nelfinavir.

8. DISCUSSÃO

O sistema 1OHR com e sem inibidor, validaram bem os nossos resultados devido a demonstrarem resultado semelhante que Kaldor *et al*, 1997, apresentando no sistema. Os efeitos das mutações corroboram de maneira persistente na estrutura da protease do HIV-1 interferindo diretamente na interação com os inibidores de protease, contribuindo para a resistência da enzima a estes fármacos seja por perda de ligações de hidrogênio ou por abertura *flap* da proteína. Ao longo dos 40ns de dinâmica molecular, os resultados da dinâmica dos sistemas demonstraram equilíbrio e todos os testes foram validados em relação ao que já é bem definido na literatura (Jhonson *et al*, 2009). A estrutura nativa sem inibidor da enzima protease do HIV-1 (1OHR-wNFV) apresentou conformação semi-aberta durante os testes, e quando complexada com o inibidor Nelfinavir (1OHR) apresentou conformação fechada, como demonstrado na literatura (Kaldor *et al*, 1997) em relação aos estudos de dinâmica molecular da interação deste fármaco com esta proteína, comprovando a eficácia de inibição da molécula.

A análise de RMSD comprovou graficamente a diferença da flexibilidade da enzima na sua forma apo e holo, assim como é mostrado na literatura com um RMSD acima de 1,5 angstroms que garante a conformação semi-aberta da proteína para a entrada do substrato na forma apo e a conformação fechada na forma holo mostrando a pouca flexibilidade da enzima quando complexada ao inibidor do meio para o fim dos 40ns de dinâmica molecular. Após o período de estabilização entre o fármaco e a proteína, deixando-a rígida, portanto, por promover uma inibição irreversível, o Nelfinavir impede que a protease clive as poliproteínas do HIV gag e pol.

As análises de RMSF permitiram verificar a flutuação de cada um dos 198 resíduos de aminoácidos que constituem a protease, tendo como destaque a Isoleucina 50 nas duas cadeias da enzima. Para melhor análise foi retirado apenas os 10 últimos nanossegundos da dinâmica no qual o sistema se mostrou mais estável, assim sendo, este resíduo demonstrou uma grande flutuação na sua forma apo e baixa flexibilidade quando complexada ao Nelfinavir, dando indícios de que este resíduo é de extrema importância para o mecanismo de abertura e fechamento do *flap* da enzima, devido este ser o que mais se movimenta. Em contrapartida é o resíduo que mais perde flexibilidade quando a enzima esta foi complexada ao Nelfinavir,

devido a discrepância entre os resultados de RMSF em apo e holo. Não obstante, é um importante resíduo quando se trata de resistência a inibidores, pois, a partir de uma mutação para outro aminoácido, pode interferir de maneira significativa na interação do inibidor com a enzima afetando a sua interação e ter grande participação na abertura do *flap*.

Os efeitos estruturais da principal mutação da protease do HIV-1 que confere resistência ao Nelfinavir (D30N) apresentou uma conformação semi-aberta no seu *flap*, além de apresentar perda de ligações de hidrogênio, fator que é característico da mutação no sentido de garantir a resistência ao Nelfinavir

As análises de RMSD mostraram a diferença de movimentos que a protease realiza ao longo dos 40 ns de dinâmica molecular em relação a abertura do seu *flap* no sistema 1OHR (forma nativa com inibidor) e no sistema D30N (protease com mutação no resíduo 30). No início da dinâmica o sistema 1OHR apresentou mais instabilidade e maior indícios de movimento até em torno de 25ns e do meio para o fim da dinâmica se mostrou estável e com menor movimentação. A partir disto, o sistema começou a se estabilizar principalmente em relação as torções que os anéis do inibidor Nelfinavir promove durante a dinâmica para realizar o melhor encaixe, além de que a função natural da protease é manter o movimento dos *flaps* tanto para a entrada do substrato na cavidade do sítio ativo da enzima, quanto para realizar o processo de clivagem que normalmente aconteceria com as poliproteínas gag e pol. Já o sistema mutado (D30N) apesar de demonstrar menor medida em angstroms no início da dinâmica, apresenta maior variação ao fim dos 40ns, devido ao tempo que o Nelfinavir necessita para se acomodar na cavidade da enzima que provavelmente em uma extensão desta mesma dinâmica este resultado pode se consolidar ainda mais.

As análises de RMSF de mostraram a flutuação de cada um dos resíduos de aminoácidos que compõem a protease. A grande maioria dos resíduos flutuam mais na presença da mutação D30N. Isto ocorre justamente devido a presença da mutação fazendo com que não somente os resíduos de aminoácidos flutuem bastantes, mas também a variabilidade do Nelfinavir nessa situação é algo perceptível ao longo dos 40ns de dinâmica, justamente essa diferença de acomodação do fármaco interagindo com a proteína nativa e com a proteína mutada. Os resíduos que menos aparentam ter flutuação estão entre os aminoácidos 20 a 30 e 80 a 90. Isto é explicado devido a

estes aminoácidos estarem relacionados ao sítio catalítico da enzima, com destaque ao Aspartato 25, que faz de fato a hidrólise das poliproteínas do HIV e que se mostra mais rígido. Estes mesmos resíduos que compõem a cadeia B da protease mostraram maior flutuação em relação a cadeia A. Este efeito pode ser explicado devido a protonação dos Aspartatos 25 da cadeia A e B que compõem o sítio ativo da enzima, pois quando um está no estado protonado (mais rígido), o outro se apresenta desprotonado (mais flexível).

A dupla mutação D30N_I84A apresentou uma grande abertura no *flap* da proteína mostrando ser uma conjugação de mutações de extrema importância para a resistência da enzima ao inibidor. A mutação I84A vem ganhando destaque por apresentar grande inibição da interação do fármaco com a protease do HIV-1 no estudo feito por Rhee, *et al*, (2010), esta mutação apresentou elevado grau de resistência em todos os inibidores de protease até hoje sintetizados. Algumas características fazem com que esta mutação ganhe destaque, começando pela relação do volume entre os dois aminoácidos envolvidos.

É evidente a importância do tamanho dos aminoácidos e neste caso a inserção de um aminoácido menor como a alanina promoveu uma menor interação com o inibidor, pois na cavidade da enzima já existe uma distância relevante entre o fármaco e a enzima o que dificultou ainda mais a presença de um aminoácido menor. Isto interfere em todo o resto da interação, que é estabelecida entre o sítio ativo e o *flap* da enzima, além do ajuste das cadeias A e B. Os resíduos 81, 82, e 84 das cadeias A e B estão entre os resíduos que ajudam a manter o Nelfinavir na cavidade da enzima, e uma mutação nesta região, que, como já foi dito, compõe o sítio catalítico da enzima, altera de maneira significativa a interação entre receptor e ligante (Gupta *et a*, 2015). E uma vez que a interação é dificultada ocorre a abertura do *flap* mediado pela Isoleucina do resíduo 50 que é visível maior flexibilidade do *flap* da cadeia B, justamente em relação da protonação do Aspartato estar em um lado das cadeias.

A análise das trajetórias de RMSD da dupla mutação D30N_I84A e da mutação D30N, demonstrou o que já era esperado a partir da análise estrutural da enzima principalmente em relação ao *flap*. O sistema com a dupla mutação demonstrou ser bem mais instável que a mutação simples ao longo dos 40 ns de dinâmica molecular, mostrando-se mais estável somente nos primeiros 5 ns. Um fato que é importante ressaltar não somente a instabilidade do sistema é maior variação

de movimentos, mas também é importante considerar a circunstância de que esta é uma mutação adicional que se sobrepõe sobre a principal que confere resistência ao Nelfinavir, fator que pode ser elevado na presença de mais mutações em uma mesma enzima.

As análises de RMSF mostrou que os resíduos com mais flutuação são os aminoácidos do sistema com a dupla mutação D30N_I84A (em vermelho). Alguns contrapontos são observados principalmente nos primeiros resíduos das duas cadeias, propriamente em torno do resíduo 80 da cadeia A e em torno do resíduo 90 da cadeia B. Estes contrapontos ocorrem justamente devido a mutação e são esperados, visto que a proteína e o fármaco se acomodam um de acordo com o outro e uma simples alteração aminoacídica é suficiente para mudar o modo de ligação do Nelfinavir, além de outros estudos (Rhee *et al*, 2010) mostrarem a capacidade desta substituição.

Em relação a tripla mutação D30N_I84A_M46I o objetivo era verificar a capacidade de recuperação da conformação da estrutura da protease devido as características da mutação M46I, trazendo de volta a estrutura da enzima à sua conformação nativa. A dupla mutação D30N_I84A mostra ser bastante resistente ao Nelfinavir, como já foi comentado anteriormente, e a tripla mutação D30N_I84A_M46I tenta retornar à conformação nativa perante a duas importantes mutações. Este efeito acontece devido propriamente à ocorrência das mutações, que, não somente se tornam resistente a interação com os fármacos inibidores de protease, mas também acabam interferindo na própria interação com a clivagem das poliproteínas gag e pol. Porém, este restabelecimento, dependendo da gravidade da mutação não é totalmente reconstituído. É perceptível que o *flap* do sistema com a tripla mutação apresenta uma conformação semi-aberta, o que culmina como já foi discutido, na dificuldade da interação do Nelfinavir principalmente em manter o *flap* fechado, resultando na possível resistência ao fármaco e a enzima apresentando alta atividade catalítica das poliproteínas devido à afinidade de ligação. Ainda sendo visível a discrepância da conformação em que adota o Nelfinavir com a dupla mutação e com a tripla mutação.

Esta mutação considerada secundária, é uma das mais importantes em relação a recuperação do *fitness* da enzima. As trajetórias de RMSD desta tripla mutação comparada a dupla mutação, demonstrou na apresentação estrutural que

esta é mais estável e menos variável, apesar de conter 3 mutações na mesma enzima. Enquanto que a dupla mutação ainda se mostrou mais variável e menos estável. A adição da terceira mutação M46I é o que faz toda a diferença não somente na estrutura da enzima como também no aumento da eficiência catalítica. Esta é uma mutação de *flap* que acaba induzido menos perturbação no domínio das abas e melhora o efeito deletério de outras mutações, restaurando o equilíbrio (Schock, Garsky & Kuo, 1996).

Por estar associada ao aumento da atividade catalítica, é normal que a flutuação dos resíduos da protease seja maior com a mutação M46I, em que justamente os aminoácidos que mais flutuam são os que estão em torno do resíduo 46 nas cadeias A e B, além dos aminoácidos em torno dos resíduos 20 das cadeias A e B que compõe o sítio catalítico da enzima, aparentemente pelo aumento da eficiência catalítica que a mutação M46I propõe. Já os resíduos que fazem parte do *flap* da enzima se mostram mais estáveis.

As análises de RMSD e RMSF com os 3 principais sistemas foram feitas para demonstrar a capacidade de devolver o *fitness* da enzima em relação a mutação M46I, D30N, D30N_I84A e D30N_I84A_M46I, em que mostra de forma mais específica a capacidade que a mutação M46I tem de restabelecer a conformação da enzima diante de uma mutação altamente supressora. Mostrando que o Nelfinavir consegue fazer o seu papel em deixar a proteína estável. A tripla mutação se mostra acima da mutação simples, porém, além de levar em consideração uma tripla mutação em relação a uma simples, a primeira mostra menos oscilações e ao final da dinâmica as linhas do gráfico ficam até sobrepostas e é possível teorizar que em uma extensão dessa mesma dinâmica a tripla mutação teria um comprimento em angstroms menor que propriamente a mutação simples.

Os aminoácidos da mutação tripla são os que mais flutuam, e não necessariamente tornam a proteína, mais instável. Outros fatores como atividade catalítica, ligações com o inibidor, entre outros, fazem com que a atividade dos aminoácidos seja grande, sem que o esqueleto da proteína apresente esse fator, e esta é a principal diferença entre os sistemas trabalhados aqui, justamente pelo aumento da atividade catalítica da enzima dada a mutação M46I. Os outros dois sistemas da dupla e tripla mutação, não fogem à regra, onde uma mutação (I84A) já

supressora, em conjunto com a principal mutação que confere resistência ao Nelfinavir, apresenta uma maior oscilação de aminoácidos que de fato interfere no esqueleto da enzima como foi mostrado nos resultados de RMSD, dando indícios de que a atividade do Nelfinavir é comprometida na mutação simples e principalmente da dupla mutação.

Ao longo dos 40ns de dinâmica o Nelfinavir adotou diferentes conformações tanto durante o estabelecimento da própria estrutura em relação ao receptor, quanto diferentes formas entre os sistemas que foram estudados (1OHR, D30N, D30N_I84A e D30N_I84A_M46I). Essas diferentes formas apresentadas são explicadas justamente pelas substituições de aminoácidos provocadas pela enzima obrigando um remanejamento do inibidor, uma vez que ele apresenta uma forma inicial e vai se adequando de acordo com as unidades de interação e com os movimentos que a enzima se propõe, principalmente em relação do tamanho da abertura do *flap* e o espaçamento da cavidade que é onde se localiza o sítio ativo.

A energia livre calculada de cada sistema com o ligante, mostrou a vulnerabilidade dos sistemas com mutação apresentando baixos valores de energia. Os valores de energia livre dos sistemas D30N e D30N_I84A, comprometem a fácil retirada do ligante do receptor, o que leva também às diferentes estruturas apresentadas pelo Nelfinavir provocadas pelas alterações das estruturas na proteína.

As principais interações que mantêm o Nelfinavir na cavidade da enzima ocorrem com os aminoácidos, glicina 27, aspartato 30 (cadeias A e B) Isoleucina 50 e importantes no sentido de que quando há um ligante, seja inibidor ou um polipeptídeo, o *flap* da enzima se mantém fechado (Gupta *et al*, 2014). Foi acrescentada a distância da ligação com o aminoácido 84, para justamente observar a sua contribuição para a mudança conformacional da enzima.

Na estrutura 1OHR, mantêm ligações curtas no que culmina na estrutura fechada da enzima. Já em relação à mutação D30N além do distanciamento das principais ligações e mudanças rotacionais dos aminoácidos, o que apresenta maior destaque é em relação a Isoleucina 50, que é justamente o aminoácido de *flap* que faz a interação com o Inibidor e também interage com a glicina 48, outro aminoácido que compõe o *flap* que neste caso dá a característica de conformação semi-aberta desse sistema.

No sistema com a dupla mutação essas distâncias aumentam mais ainda com maior destaque para a isoleucina 50 que na enzima nativa uma ligação de 3,5 angstroms passou a ser de 5,7. E como principal fator para a recuperação do *fitness* e conformação da enzima a mutação M46I, por ser uma região de *flap* e ajuda a manter a alça fechada melhorando a interação do inibidor com a isoleucina 50 com uma ligação de 3,7 angstroms (nativa 3,5), com o complexo dos aminoácidos glicina 48, isoleucina 48 (sistema mutado), e isoleucina 50 com um melhor rearranjo, melhor interação entre si, para contribuir para um melhor *fitness* da enzima, tentando manter o *flap* da enzima fechado na presença do inibidor na cavidade do sítio ativo da protease.

9. CONCLUSÃO

Este estudo explana os mecanismos moleculares de 3 importantes mutações que acometem a enzima protease do HIV, com a finalidade de proporcionar um melhor entendimento para o desenho e melhoramento de novos inibidores além de esclarecer o que acontece com estas mutações. A mutação D30N, já bem descrita na literatura, demonstrou mais uma vez ser importante, em estabelecer uma semi-abertura no *flap* da enzima, instabilidade superior à enzima nativa e significativa à interação do inibidor com a enzima. A dupla mutação D30N_I84A foi a mais supressiva deste estudo, apresentando maior abertura de *flap*, volume de cavidade, maior instabilidade e menor grau de energia de ligação com o inibidor. Um importante achado foi em relação à mutação D30N_I84A_M46I, que apesar de duas importantes mutações, a substituição que ocorre no resíduo 46 entre uma metionina e uma isoleucina, tenta de forma eficaz retornar à conformação padrão da protease, fator importante para a sua funcionalidade que seria a clivagem das poliproteínas gag e pol do HIV.

A perspectiva deste estudo é contribuir no entendimento de função molecular dos aminoácidos com interação com o inibidor Nelfinavir, a fim de contribuir para a manipulação do tratamento do HIV quando utilizado inibidores de protease. Estudos experimentais, ou estudos de modificações do inibidor devem ser conduzidos para propor melhorias na inibição, melhorando a eficácia do tratamento, juntamente com estudos concomitantes de mutações principais no sítio ativo e fora do sítio ativo.

10.REFERÊNCIAS

Agnieszka. K. Moliner. V and Świderek. K. Dynamic and Electrostatic Effects on the Reaction Catalyzed by HIV-1 Protease. **Journal of The American Chemical Society**, 138. 2016

AIDS Info. Information on HIV/AIDS Treatment, Prevention and Research . Disponível em: aidsinfo.nih.gov/drugs/263/nelfinavir/0/patient. Acessado em 11/2017.

Antiretroviral Pregnancy Registry Steering Committee. Antiretroviral Pregnancy Registry International Interim Report from 1 January 1989 Through 31 January 2003. Wilmington, NC: **Registry Coordinating Center** 2003

Antunes, D. A.; Rigo, M. M.; Sinigaglia, M.; Medeiros, R. M.; Junqueira, D. M.; Almeida, S. E. M.; Vieira, J. F.; New insights into *In Silico* prediction of HIV protease resistance to nelfinavir. **Plos One** 2014.

AIDS EPIDEMIC UPDATE. Epidemiological status. 2013.

Arnold, K. L. bordoli, J. Kopp, T. Schwede The Swiss-Model workspace: a web-based environment for protein structure homology modeling. **Bioinformatics** **22(2): 195-201.2006**.

Arthur, L. O. Bess, J. W. Sowder, R.C.I. Benveniste, R. E. Mann, D. L. Chermann, J. C. Henderson, L.E. Cellular proteins bound to immunodeficiency virus: Implications for pathogenesis and vaccines. **Science**, 258: 1935-1938, 1992.

Babine, R. E.; Bender, S. L. Molecular recognition of protein-ligand complexes: applications to drug design. **Chem Rev.** 97, 1359.1997.

Bardsley-Elliot, A. Plosker, G. L. Nelfinavir: an update on its use in HIV infection. **Drugs**. 59(3): 581-620. Mar 2000.

Batista, P. R. Estudos computacionais da protease do HIV-1: Abertura das alças e diferenças entre subtipos. **Dissertação de mestrado em biofísica**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 159 p. Rio de Janeiro. 2005.

Barre-Sinoussi, F. Chermann, J. C. Rey, F. Nugeyre, M. T, Chamaret, S. Gruest, J. Dauguet, C. xler-Blin, C. Vezinet-Brun, F. Rouzioux, C. Rozenbaum, W and

Montagnier, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science** 220(4599): 868-871.1983

Buonaguro, L. Tornesello, M. L. Buonaguro, F. M. HIV-1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. **J. virol.** 81(19): 10209-10219. 2007.

Brigati, C. Giacca, M. Noonan, D. M. Albin, A. HIV Tat, its TARgets and the control of viral genes expression. **FEMS Microbiol. Lett**, v. 220, n. 1, p. 57-65, 2003.

Brito, A. M. et al. AIDS e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifacetada. **Química Nova** São Paulo, v. 34, n. 2, p. 207-217, mar. / abr. 2000.

Brito, M. A. Fármacos recentes usados para o tratamento da infecção pelo HIV-1: enfuvirtida, maraviroc, raltegravir e etravirina. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** 32(2):159-168. 2011.

Buktinck, P.; Tollenaere, K.P.; Winter, H. Computational medicinal chemistry for drug discovery. New York: **Marcel Dekker**, 2003. 794 p.

Boulerice, F. Li, X. G. Lvochich, A. Wainberg, M. A. Recovery of infections human immunodeficiency virus type 1 after fusion of defectively infected clones of U-937 cells. **J. Virol.**65: 5589-5592. 1991.

Brito, A. M. Fármacos recentes usados para o tratamento da infecção pelo HIV-1: enfuvirtina, marovic, raltegravir e etravirina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Avançada**, Araraquara, v. 32, n. 2, p. 159-168,2011.

Broder CC & Collman RG. Chemokine receptors and HIV. **Journal of Leukocyte Biology**, 62: 20–29. PMID:9225988. 1997.

Case, d. A., T. E. Cheatam, 3RD, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K. M. Merz, JR., A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang, R. J. Woods “The Amber Biomolecular simulation programs.” **Journal of Computational Chemistry** 26(16); 1668-1668. 2005.

Clark, T. A Handbook of Computational Chemistry; **Wiley**; New York. 1985

Clavel, F. Hoggan, M. D. Willey R. L, Strebel, K, M. A. Repaske, R. Genetic recombination od human immunodeficiency vírus. **Journal of Virology**; 1455-1459. 1989.

Cunico, W.;Gomes, C. R. B.; Vellasco Junior, W. T. HIV: Recentes avanços na pesquisa de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 8, p. 2111-2117, 2008.

Cunningham, A. L. et al. Structure and function of HIV. **Medical Journal of Australia**, Sydney, v. 164, n. 3, p. 161-171, Feb. 1996.

L. J. Graham, D. J. Laird, D. Quintero, J. C. Rhodes, A. Robbins, H. L. Roth, E. Shivaprakash, M. Yang, T. Chodakewitz, J. A. Deutsch, P. J. Leavitt, R. Y. Massari, F. E. Mellors, J. W. Squires, K.E. Steigbigel, R.T., Teppler, H., and Emini, E.A. Genetic correlates of in vivo viral resistance to indinavir, a human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor. **Journal of Virology**. 70: 8270–8276. 1996.

Collins, K. L. Chen, B. K. Walker, B. D. Baltimore, D. HIV-1 nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. **Nature**, London, v. 391, p. 197-401, Jan. 1998.

Crawford, S. Goff, S. P. A deletion mutation in the 5' part of the POL gene of moloney murine leukemia virus blocks proteolytic processing of the GAG and POL polyproteins. **Journal of Virology**, Washington, v. 53, n. 3, p. 899-907, Mar. 1985.

Cramer, C. J. Essential Computational Chemistry Theories and Models. UK, **British Library**. 2004

Aiken, C. HIV: Antiviral action countered by Nef. **Nature** 526, 202–203 (08 October 2015) doi:10.1038/nature15637. Published online.30 September 2015.

De Souza, M. V. N. De Almeida. Fármacos inibidores de fusão: uma nova estratégia à replicação do vírus VIH. **Química nova** 26: 366-72. 2003.

Delphine, C. B. David, M. R. Jan, H. J. **Proteins**. 73:765-783. 2008

Dhami. H. et al. The chemokine system and CCR5 antagonists: potential in HIV treatment and other novel therapies. **Journal of Clinical Pharmacy & Therapeutics**, Oxford, v. 34, n 2, p. 147-160, Apr. 2009.

Do Nascimento, J. P. Estudo da seletividade do metal e inibição seletiva da integrase do HIV-1 por métodos MQ/MM e dinâmica molecular. **Tese de doutorado**, universidade federal do Pará, Brasil. 2013.

Ferreira, R.C.S.; Riffel, A.; Sant'Ana, A, E, G. HIV: Mecanismo de replicação, alvos farmacológicos e inibição por produtos derivados de plantas. **Química Nova**. São Paulo, v. 33, n. 8, p. 1743-1755, 2010.

Flexner, C. HIV-protease inhibitors. **New England Journal of Medicine**, 338, pp. 1281-1292. 1998.

Frankel, A. D. Young, J. A. T. HIV-1: Fifteen proteins and RNA. **Annu. Rev. Biochem**, v.1, p. 67, 1998.

Freed, E. O. HIV-1 replication. **Somatic cell and molecular genetics**, 26: 13-33, 2002.

Freed, E. O. Martin, M. A. The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. **Journal of Biological Chemistry**, 270: 23883-23886, 1995.

Freed EO, Martin MA. HIVs and Their Replication. In: **Fields Virology**, 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health / Lippincott Williams & Wilkins, pp. 2107–2186, 2007.

Gallo, R. C.; Montagner, L.; Explanations of the origin(s) of the HIV and the etiology of AIDS, **Scientific American**, v. 41, p. 259, 1988.

Gallo, R. C. Sarin, P. S. Gelmann, E. P.; Robert-Gurof, M.; Richardson, E.; Kalyanaraman, V. S.; Mann, D.; Sidhu, G. D.; Stahl, R. E.; Zolla-Pazner, S.; Leibowitch, J.; Popovic, M. Isolation of human t-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, 220: 865–867, 1983.

Gosh, A. K. Aspartic acid proteases as therapeutic targets. Jhon Wiley and Sons: **Hoboken**, NJ, 2011.

Ghosh AK, Chapsal BD, Weber IT, Mitsuya H. Design of HIV protease inhibitors targeting protein backbone: an effective strategy for combating drug resistance. **Acc Chem Res** 41: 78–86. 2008.

Greene, W. C. Debyser, Z. Ikeda, T. Freed, E. O. Stephens, E. Yonemoto, W. Buckheit, R. W. Esté, J. A. Cihlar T. Novel targets for HIV therapy. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 80, n. 3, p.. 251-265, 2008.

Greene, W.C. Peterlin, B.M. Molecular insights into HIV biology. **HIV insight knowledge base chapter**. February 2003; Content rewied october 2005.

Gupta, A. Jamal, S. Goyal, S. Jain, R. Wahi, D. Grover, A. Structural studies on molecular mechanisms os Nelfinavir resistance caused by non-active site mutation V77I in HIV-1 protease. **BMC Bionformatics**.16 (Suppl 19):S10. 2015.

Hahn, B. H. et al. AIDS as zoonosis: scientific and public health implications. **Science**, New York, v. 287, n. 5453, p. 607-614, Jan. 2000.

Hammer, S. M. Saag, M. S. Schechter, M. Montaner, J. S. G. Schooley, R. T. Jacobsen, D. M. Thompson, M. A. Carpenter, C. C. J. Fischl, M. A. Gazzard, B. G. Gatell, J. M. Hirsch, M. S. Katezenstein, D. A. Richman, D. D. Vella, S. Yeni, P. G. Volderberding, P. A. Treatment for adult HIV infection. **Recommendations of the International AIDS Society-USA Panel**. JAMA. 296:827-843. 2006

Harms, G.; Feldmeier, H. HIV infection and tropical parasitic diseases: deleterious interactions in both directions? **Tropical Medicine & International Health**, Oxford, v. 7, n.6, p. 479-488, 2002.

Heeney JL, Dalglish AG, Weiss RA. Origins of HIV and the evolution of resistance to AIDS. **Science**. 2006; 313(5786):462-6. 9.

Henderson, L. E. Benveniste, R. E. Sowder, R. Copeland, T. D. Schultz, A. M. Oroszlan, S. Molecular characterization of gag proteins from simian immunodeficiency virus (SIV Mne). **Journal of Virology**, Washington, v. 62, n. 8, p. 2587-2595, Aug, 1988

Hill. A, L.; Rosenbloom. D. I, S.; Nowak. M, A.; Evolutionary Dynamics of HIV at Multiple spartial and temporal scales. **Journal of Molecular Medicicine**. Amsterdam, v. 90, n5, p. 543 561, May 2012.

HIV Resistance Database. Stanford University. PI resistance notes, march, 2. Disponivel em: hivdb.stanford.edu. 2014

Hornak, V.; Simmerling, C. **Drug Discovery Today**, 12, 132. 2007

Hoxie, J. A. Alpers J, D. Rackowski, J. L. Huebner, K. Haggarty, B. S. Cedarbaum, A. J. Reed, J. C. Alterations in T4 (CD4) protein and mRNA synthesis in cells infected in HIV. **Science**, 234: 1123-1127, 1986.

Horwitz, J. P. Chua, J. & Noel, M. J. **The journal of Organic Chemistry**. 29: 2076-8. 1964

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 100B. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Lyon (FR): **International Agency for Research on Cancer**; 2012.

Janeway, C. A. Travers, P. Walport, M. Shlomchik, M. O Sistema imune na saúde e na doença. In: **Imunobiologia**. 5° ed. Artmed, 2002.

Janssen, P. A. J. Lewi PJ, Arnold, E. Daeyaert, F. de Jong , M. Heeres, J. Koymans, L. Vinkers, M. Guillemont, J. Pasquier, E. Kukla, M. Ludovici, D. Andries, K. de Béthune, M. P. Pauwels, R. Das, K. Clark, A. D. Jr, Frenkel, Y, V. Hughs, S. H. Medaer, B. De Knaep, F. Bohets, H. De Clerck, F. Lampo, A. Williamns, p. Stoffels, P. Search of a novel anti-HIV drug: multidisciplinary coordination in the discovery of a 4-[[4-[[4-[(1E)-2-Cyanoethenyl]-2-6-dimethylphenyl] amino]-pyrimidinyl]amino]benzotrile (R27874, Rilpivirene). **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 48, n. 6, p. 1901-1909, Nov. 2005

Johnson, V. A, Calvez, V. Gunthard, H. F. Paredes, R. Pillay, D. et al. Update the drug resistance mutations in HIV-1: March 2013. **Topics in Antiviral Medicine** 21: 6–14. 2013.

Johnson, V. A. Brun-Vezinet, F. Clotet, B. Gunthard, H. F. Kuritzkes, D. R. Pillay, D. Schapiro, J. M. Richman, D. D. Update of the drug resistance mutations in HIV-1. **Topics in HIV Medicine** 17: 138-145. December 2009.

Johnston, B. E. et al. Adherence to highly active anti-retroviral therapy among HIV: infected patients of the innercity. In World AIDS Conference, 12, 1998, Geneva. WAC, V. 1, p. 599. 1998. Jouvenet, N. Bieniasz, P. D. Simon, S. M. Imaging the biogenesis of individual HIV-1 virions in live cells.454(7201):236–40. **Nature**. 2008.

Kent, S. B. H.; Torbeev, V. U. Convergent Chemical Synthesis and Crystal Structure of a 203 AminoAcid “Covalent Dimer” HIV-1 Protease enzyme molecule. **Angew. Chem.** Int. Ed. 46, 1667 –1670. 2007.

Kim, B. Nguyen, L.A. Daddacha, W. Hollenbaugh, J. A. Tight Interplay Among SAMHD1 Level, Cellular dNTP Levels and HIV-1 Proviral DNA Synthesis Kinetics in

Human Primary Monocyte-Derived Macrophages. **Journal of Biology Chemistry**. 2012.

Laguna, J. Garza, E. P. Montes, F. M. Vázquez, J. P. P. Rosas, H. R. **Bioquímica de Laguna**. Sexta edição. 2012.

Lee , J. C. Bell, D. C. Guinness, R. M. Ahmad, T. *Pneumocystisjiroveci* pneumonia and pneumomediastinum in an anti-TNF α naive patient with ulcerative colitis. **World Journal of Gastroenterology**, 15(15):1897-1900, 2009.

Lever, A. M. L. HIV: The virus. **Medicine**, 33: 1-3, 2005.

Levy, J. A. Heterogeneity in transmission and pathogenesis. In: Mann, J. M: Tarantola, D. J. M. (Ed). AIDS in the world II. New York: **Oxford University**. P. 177-185. 1996

Levy, J. A. Hoffman, A. D. Kramer, S. M. Landis, J. A. Shimabukuro, J. M. Oshiro, L. S. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. **Science** 225(4664): 840-842. 1984

Malim, M.H. Hauber, J. Le, S.Y. Maizel, J.V. Cullen, B. R. The HIV-1 ver trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. **Nature**, v. 338, n. 6212, p. 254-257, 1989.

Martins, N. H. Ensaios enzimáticos de protease de HIV-1 de subtipos brasileiros. **Dissertação de mestrado em física biomolecular**. 119 p. Universidade de São Carlos, São Carlos. 2007.

Mammano, F. Trouplin, V. Zennou, V. and Clavel, F. Retracing the evolutionary pathways of human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors: Virus fitness in the absence and in the presence of drug. *J. Virol.* 74: 8524–8531. 2000.

Marx, P. A. Apetrei, C. Drucker, E. AIDS as a zoonosis? Confusion over the origin of the virus and the origin of the epidemics. **Journal of Medical Primatology**, 33: 220–226, 2004.

Meek, T. D.; *J. Enzyme Inhibition*. 6, 65. 1992.

Meek, T. D.; Lambert, D. M.; Metcalf, B. W.; Petway, S. R.; Dreyer, G. B.; Design of anti-AIDS drugs; De Clercq, E., ed.; **Elsevier**: Amsterdam, p. 25. 1999.

Melo, F. L. Caracterização biológica e molecular de recombinantes naturais de HIV-1. **Dissertação de Mestrado**. 2011.

Ministério da Saúde. Brasil. Boletim Epidemiológico AIDS e DST. Brasília; **Ministério da Saúde**. 2011.

Miranda, A. S. Avila, C. M. da Silva, F. C. Lopes, R. O. Maraviroque: uma inovação terapêutica para o tratamento da AIDS. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 2, n. 2, p. 130-139. 2010.

Mouth, L. Corbeil, J, Richmann, D. D. Recombination leads to the rapid emergence of HIV-1 dually resistant mutants under selective drug pressure. **Proceedings of The National Academy of Sciences USA**; 93: 6106-6111. 1996.

Murray, J. M. Kelleher, A. D. Cooper, D. A. Timing of the Components of the HIV Life Cycle in Productively Infected CD4+ T Cells in a Population of HIV-Infected Individuals. **Journal of Virology**. 2011.

Nájera, R. Delgado, E. Pérez-Alvarez, L. Thompson, M. M. Genetic recombination and its role in the development of HIV-1 pandemic. *AIDS*. 16(suppl): S3-S16. 2002.

National Cancer Institute (NCI). Nelfinavir in treating patients with metastatic, refractory, or recurrent solid tumors. disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00436735>. NLM identifier: NCT00436735. Accessed March 25, 2015.

Nazari, R. Joshi, S. CCR5 as target for HIV-1 gene therapy: **Current gene therapy**, 8(4):264-72, 2008.

NIAID - **National Institute of Allergy and Infectious Diseases**. HIV/AIDS. Estrutura do HIV. 2009

Oliveros, M. R. Prevalência e covariação de mutações relacionadas a resistência aos inibidores de protease do subtipo F do HIV-1. **Dissertação de mestrado** em fisiopatologia experimental, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo. 118 p. 2005.

Pascutti, P. G. **Introdução à Modelagem e Dinâmica Molecular**. 2002

Papathanasopoulos, M. A.; Hunt, G. M.; Tiemessen, C. T. Evolution and diversity of HIV-1 in Africa- a review. **Virus Genes**, 26: 151-163, 2003.

Paterson, D. L. Swindells, S. Mohr, Brester, M. Vergis, E. N. Squier, C. Wagener, M. M. Singh, N. Adherence to protease inhibitor therapy and outcomes in patients with HIV infection. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 133, n. 1, p. 21-30, 2000.

Peeters, M.; Jung, M.; Ayoub, A. The origin and molecular epidemiology of HIV. **Expert Review of Anti Infective Therapy**, London; v.11, n.9, p.885-96, 2013.

Peng, C. HO, B. K. Chang, T. W. Chang, N. T. Role of human immunodeficiency virus type 1-specific protease in core protein maturation and viral infectivity. **Journal of Virology**, Washington, v. 63, n. 6, p. 2550-2556, June 1989.

Piana, S. Carloni, P. Rothlisberger, U. Drug resistance in HIV-1 protease: Flexibility-assisted mechanism of compensatory mutations. **Protein Science**. Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press. Copyright The Protein Society. 2002.

P. Plantier, J. C. et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. **Nature Medicine**, New York; v.15, n.8, p.871-2, 2009.

Reinke, R. Steffen, N. R. Jr, E. R. Natural selection results in conservation of HIV-1 integrase activity despite sequence variability. **AIDS**. 15: 823-830, 2001.

Rhee, S. Y. Taylor, J. Fessel, J. W. Kaufman, D. Towner, W. Troia, P. Ruane, P. Hellinger, J. Shirvani, V. Zolopa, A. Shafer, R. W. HIV-1 protease mutations and protease inhibitor cross-resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Vol. 54, No. 10. p. 4253-4261, Oct. 2010.

Rhee, S. Y. Taylor, J. Wadhera, G. Ben-Hur, A. Brutlag, D. L. Shafer, R. W. Genotypic predictors of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. **Proceeding National Academy of Sciences USA** 103: 17355-17360. 2006.

Rhee, S. Y. Taylor, J. Fessel, W. J. Kaufman, D. Towner, W. Troia, P. Ruane, P. Hellinger, J. Shirvani, V. Zolopa, A. and Shafer, R. W. HIV-1 Protease Mutations and Protease Inhibitor Cross-Resistance. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. p. 4253–4261 Vol. 54. No. 10. 2010.

Robertson, D. L. et al. HIV-1 Nomenclature proposal. **Science**, New York; v.288, n.5463, p.55–56, 2000.

Roe, D. R. T. E. Cheatham III "PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data." **Journal of Chemical Theory and Computation**. 2013.

Rufo, P. A. Lin, P. W. Andrade, A. Jiang, L. Rameh, L. Flexner, C. Alper, S. L. Lencer, W. I. Diarrhea-associated HIV-1 APIs potentiate muscarinic activation of Cl⁻ secretion by T84 cells via prolongation of cytosolic Ca²⁺ signaling. *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, v. 186 n. 5, C998-C1008. 1 May 2004.

Safety, efficacy, and tolerability of nelfinavir-containing antiretroviral therapy for patients coinfecting with HIV and hepatitis C undergoing methadone maintenance. Brown, L. S. Jr. Kritz, S. Ch, M. Madray, C. **Journal of Substance Abuse Treatment**. Jun;30(4):331-5. 2006

Schock, H.B., Garsky, V.M., and Kuo, L.C. Mutational anatomy of an HIV-1 protease variant conferring cross-resistance to protease inhibitors in clinical trials. Compensatory modulations of binding and activity. **Journal of Biological Chemistry**. 271:31957–31963.1996.

Shirts, M. R. Best practices in free energy calculations for drug design. **Methods in Molecular Biology** 819: 425-467. 2012.

Salomon-Ferrer, R. D. A. Case, R. C. Walker: an overview of the Amber biomolecular simulation package. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* 3(2): 198-210.2013.

Sulea, T. E. O. Purisima. The solvated interaction energy method for scoring binding affinities. **Methods in Molecular Biology** 819: 195-303. 2012.

Swiss Institute of Bioinformatics. 2011

Tebit, D.M.; Arts, E. J. Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. **The Lancet Infectious Diseases**. Dis. New York; v.11, n.1, p. 45–56, 2011.

UNAIDS. Global Report: UNAIDS Report on the Global AIDS Epidemic 2015. Geneva: **UNAIDS**. 2015.

Vaishnav, Y. N. Wongstaal, F. The Biochemistry of AIDS. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 60, p. 577-630, 1991.

Wigg, M.D. Santos, N. O. S Romanos, M. T. V. Vírus da imunodeficiência humana. Introdução a virologia humana. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**; P183-97. 2002.

Wu, X., Ohrngren; P., Ekegren, J.K.; Unge, J., Unge, T.; Wallberg, H.; Samuelsson, B.; Hallburg, A., Larhed, M. Two-Carbon-Elongated HIV-1 Protease Inhibitors with a Tertiary-Alcohol-Containing Transition-State Mimic. **Journal of Medicinal Chemistry** 51(4):1053-1057. 2008.

Young, B. & Kuritzkes, D. S. Resistance to HIV-1 inhibitors In *Protease inhibitors in AIDS therapy*, eds. R.C. Ogden and C. Flexner. **Marcel Dekker**, New York. 2001.

Zhengdong, L. Chu, Y. Wang, Y. HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. **HIV AIDS** (Auckl). 7:95-104. 2015.