



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA MEDICINAL E MODELAGEM MOLECULAR

KAROLINE LEITE CUNHA

**USANDO A DINÂMICA MOLECULAR PARA AVALIAR O IMPACTO QUE AS
MUTAÇÕES NA PROTEASE DO HIV-1 PRODUZEM NA INTERAÇÃO DA
PROTEÍNA COM O ANTIRRETROVIRAL DARUNAVIR**

BELÉM-PARÁ

2019

KAROLINE LEITE CUNHA

**USANDO A DINÂMICA MOLECULAR PARA AVALIAR O IMPACTO QUE AS
MUTAÇÕES NA PROTEASE DO HIV-1 PRODUZEM NA INTERAÇÃO DA
PROTEÍNA COM O ANTIRRETROVIRAL DARUNAVIR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Química Medicinal e Modelagem Molecular do Instituto
de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará,
como requisito para a obtenção do Grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Lima Barros

BELÉM-PARÁ

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L533u Leite Cunha, Karoline
Usando dinâmica molecular para avaliar o impacto que as mutações na protease do HIV-1 produzem na interação da proteína com o antirretroviral darunavir / Karoline Leite Cunha. — 2019.
67 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Carlos Augusto Lima Barro
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Química Medicinal e Modelagem Molecular, Instituto de Ciências
da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

1. HIV. 2. Darunavir. 3. Protease. 4. Mutações. 5.
Modelagem Molecular. I. Título.

CDD 615.4

KAROLINE LEITE CUNHA

**USANDO A DINÂMICA MOLECULAR PARA AVALIAR O IMPACTO QUE AS
MUTAÇÕES NA PROTEASE DO HIV-1 PRODUZEM NA INTERAÇÃO DA
PROTEÍNA COM O ANTIRRETROVIRAL DARUNAVIR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química medicinal e Modelagem Molecular (PPGQMMM), do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do Grau de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Augusto Lima Barros

Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular, Instituto de Ciências da Saúde/UFPA

Orientador: Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Rosivaldo dos Santos Borges – Membro Interno

Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular, Instituto de Ciências da Saúde/UFPA

Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira – Membro Externo

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde/UFPA

Prof. Dr. Eduardo Dias Almeida- Suplente

Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular, Instituto de Ciências da Saúde/UFPA

Belém, 29 de Março de 2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e familiares, que me forneceram todo seu apoio durante esses mais de dois anos de mestrado, me incentivando e dando suporte para que eu pudesse concluir mais essa etapa da minha jornada acadêmica. Dedico também este trabalho ao Prof. Carlos Augusto Lima Barros, que pacientemente orientou este trabalho, tornado possível sua conclusão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus que me permitiu viver este momento, trazendo alegria para meus pais e a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, que sempre fizeram presentes me incentivando a continuar trilhando o caminho que escolhi seguir.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Augusto Lima Barros, por acreditar na proposta deste trabalho. Obrigado por sua paciência e ensinamentos, continue sempre firme no caminho da docência formando profissionais qualificados e capazes de exercer a profissão farmacêutica.

À Farmacêutica MSc. Tainá Guimarães Barros que acompanhou diversas etapas do desenvolvimento desta pesquisa, e que por vezes trouxe sabias palavras que contribuíram de forma significativa para que eu pudesse dar continuidade neste trabalho, me sinto honrada por ter contado com ajuda de uma amiga tão querida como você.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPS) que apoiaram a realização deste trabalho por meio da concessão de bolsa de incentivo.

RESUMO

O surgimento de cepas resistentes aos fármacos utilizados na terapia antirretroviral cresce de forma alarmante em escala global. Os antirretrovirais utilizados no tratamento de primeira e segunda linha do HIV são os que mais possuem relatos de casos de cepas resistentes. Os inibidores da protease são uma classe de drogas antirretrovirais que possui participação fundamental nos esquemas de tratamento da AIDS. Além do surgimento da resistência aos IPs utilizados nos esquemas usuais de tratamento, já existem relatos de resistência o Darunavir, um inibidor da protease usado no tratamento de resgate terapêutico em casos de pacientes que já apresentam falha no tratamento inicial e resistência comprovada. Portanto, este trabalho tem por objetivo avaliar, identificar e quantificar as mutações na protease do HIV-1 3UCB, bem como avaliar, por meio de simulações de dinâmica molecular, o impacto que as mutações produzem na interação a 3UCB e o seu ligante darunavir quando comparados com a protease do HIV-1 nativa 4LL3 complexada ao mesmo ligante. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que a protease do HIV-1 mutante 3UCB apresentou um perfil de ligação ligeiramente mais estável que complexo da protease do HIV-1 nativa 4LL3, com resultados de energia livre de ligação -68,77 e -64,62kcal/mol, respectivamente.

Palavras-chave: HIV; Darunavir; Protease; Mutações; Modelagem Molecular.

ABSTRACT

The emergence of drug-resistant strains used in antiretroviral therapy grows alarmingly on a global scale. Antiretrovirals used in the treatment of first and second line HIV are the ones that most have case reports of resistant strains. Protease inhibitors are a class of antiretroviral drugs that play a key role in AIDS treatment regimens. In addition to the emergence of resistance to IPs used in the usual treatment regimens, Darunavir, a protease inhibitor used in therapeutic rescue treatment, is already reported in patients who already have failed initial treatment and proven resistance. The aim of this work is to evaluate, identify and quantify HIV-1 3UCB protease mutations, as well as to evaluate, through molecular dynamics simulations, the impact that mutations produce on the interaction of 3UCB and its darunavir ligand when compared to the native HIV-1 protease 4LL3 complexed to the same linker. The results obtained in this study showed that the 3UCB multi-resistant HIV-1 protease had a slightly more stable binding profile than the native HIV-1 protease complex 4LL3, with binding free energy results -68.77 and -64.62 kcal / mol, respectively.

Keywords: HIV; Darunavir; Protease; Mutations; Molecular Modeling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do HIV-1.....	18
Figura 2 - Estruturas cristalográficas de protease de HIV-1 complexadas com um inibidor.....	24
Figura 3 - Representação esquemática do ciclo termodinâmico.....	33
Figura 4 - Protease do HIV-1 nativa complexada com o inibidor darunavir	36
Figura 5 - Protease do HIV-1 mutante complexada com o inibidor darunavir	37
Figura 6 - Representação 2D da estrutura do Darunavir	37
Figura 7 - RMSD do ligante do complexo 4LL3.....	43
Figura 8 - RMSD da proteína do complexo 4LL3.....	43
Figura 9 - RMSD do sítio ativo do complexo 4LL3.....	44
Figura 10 - RMSD da proteína, sítio ativo e ligante sobrepostos do complexo 4LL3.....	44
Figura 11 - RMSD do ligante do complexo 3UCB.....	45
Figura 12 - RMSD da proteína do complexo 3UCB.....	46
Figura 13 - RMSD do sítio ativo do complexo 3UCB.....	46
Figura 14 - RMSD da proteína, sítio ativo e ligante sobrepostos do complexo 3UCB.....	47
Figura 15 - Enantiômeros pela rotação no nitrogênio da sulfonamida do darunavir.....	48

Figura 16 - Gráfico de RMSF dos C α da protease nativa.....	49
Figura 17 - Gráfico de RMSF dos C α da protease mutante.....	49
Figura 18 - Protease do HIV-1 nativa 4LL3 antes da dinâmica.....	50
Figura 19 - Protease do HIV-1 nativa 4LL3 depois da dinâmica.....	51
Figura 20 - Protease do HIV-1 mutante 3UCB antes da dinâmica.....	51
Figura 21 - Protease do HIV-1 mutante 3UCB depois da dinâmica.....	51
Figura 22 - Interações de <i>Van de Waals</i> por resíduo da protease nativa.....	56
Figura 23 - Interações de <i>Van de Waals</i> por resíduo da protease mutante.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS - Acquired Immunodeficiency Syndrome

AMBER - Assisted Model Building with Energy Refinement

ASP - Ácido Aspártico ou Aspartato

ASN - Asparagina

CPI - Complexo de Pré-Integração

DM - Dinâmica Molecular

HAART - Highly Active Antiretroviral Therapy

HIV - Human Immunodeficiency Virus

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry

MM/GBSA - Molecular Mechanics Generalization Born Surface Area

MM - Modelagem Molecular

MVD - Molegro Virtual Docker

OMS - Organização Mundial da Saúde

PDB - Protein Data Bank

RMSD - Root Mean Square Deviation

SIE - Solvated Interaction Energy

TYR - Tirosina

VMD - Visual Molecular Dynamics

PIs - Inibidores de proteases

ITRNt – Inibidores da transcriptase reversa nucleosídeo-nucleotídeo (ITRN)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 JUSTIFICATIVA.....	14
1.2 OBJETIVOS.....	15
1.2.1 Objetivo Geral.....	15
1.2.2 Objetivos Específicos.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 HIV/AIDS.....	16
2.1.1 Aspectos Epidemiológicos.....	16
2.1.2 Estrutura e ciclo de replicação do HIV.....	17
2.1.3 Terapia Antirretroviral.....	19
2.2 PROTEASE DO HIV.....	23
2.2.1 Estrutura e Mecanismo da Protease do HIV.....	23
2.2.2 Inibidores da Protease do HIV-I.....	24
2.3 MUTAGENESE DO HIV.....	25
2.4 METODOS TEÓRICOS DE QUÍMICA COMPUTACIONAL.....	27
2.4.1 Dinâmica Molecular.....	27
2.4.1.1 Dinâmica Molecular Clássica.....	30
2.4.1.2 Dinâmica Molecular De Sistemas Solvatados.....	30
2.4.1.3 Método Molecular <i>Mechanics Generalized Born Surface Area</i> (MM-GBSA).....	32
2.4.1.4 Energia de Decomposição por Resíduo.....	33
3 METODOLOGIA.....	35
3.1 ESTRUTURAS INICIAS E PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS DA PROTEASE DO HIV-I COMPLEXADA AO INIBIDOR DARUNAVIR NATIVA E MUTANTES....	35
3.2 PREPARO DOS SISTEMAS E SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR.....	38
3.3 ENERGIA LIVRE DE LIGAÇÃO E DECOMPOSIÇÃO POR RESÍDUO.....	39

3.4 PACOTES COMPUTACIONAIS UTILIZADOS	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 DINÂMICA MOLECULAR E RMSD	41
4.2 FLUTUAÇÕES QUADRÁTICAS MÉDIAS (RMSF).....	46
4.3 ANÁLISE DAS DISTÂNCIAS MÉDIAS DE LIGAÇÃO E INTERAÇÕES DE HIDROGÊNIO	50
4.4 ANÁLISE DE ENERGIA LIVRE DE LIGAÇÃO	53
4.5 ANÁLISE DE ENERGIA DE DECOMPOSIÇÃO POR RESÍDUO	54
5 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1 INTRODUÇÃO

A síndrome da imunodeficiência humana adquirida (AIDS, *acquiredimmunodeficiencysyndrome*) é causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV, *humanimmunodeficiencyvirus*), sendo caracterizada por diversos aspectos clínicos, como imunodepressão severa associada a infecções oportunistas, perda de peso e degeneração do sistema nervoso central (SNC). (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003; CUNICO; GOMES; VELLASQUES JUNIOR, 2008; SANTOS; ALBUQUERQUE; BRITO, 2014).

O Brasil é referência, entre os países em desenvolvimento, no que se refere a distribuição gratuita de medicamentos antirretrovirais para a população. Atualmente o tratamento da AIDS consiste em uma terapia combinada de diversas classes de antirretrovirais denominada HAART/TARV (Terapia Antirretroviral Altamente Ativa), que impede a infecção de novas células do sistema imune bloqueando diversas etapas do ciclo replicativo do vírus. Apesar da TARV ser considerada um sucesso no que concerne ao tratamento do AIDS, que reduz significativamente a carga viral dos pacientes tratados melhorando sua qualidade de vida, ainda possui algumas limitações como a alta incidência de efeitos colaterais, o que dificulta a adesão ao tratamento, e o rápido surgimento de cepas resistentes a diferentes esquemas de antirretrovirais utilizados atualmente (DE MELO; BRUNI; FERREIRA, 2006).

Nesse contexto os antirretrovirais utilizados no tratamento de primeira e segunda linha do HIV são os que mais possuem relatos de casos de cepas resistentes. Dentre eles temos inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa (NRTIs), inibidores nucleotídicos da transcriptase reversa (NtRTI), inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa (NNRTIs), e inibidores de protease (PIs)(BRASIL, 2015).

Segundo a OMS, a não adesão ao tratamento com os esquemas antirretrovirais prescritos é uma das principais causas do crescente surgimento de cepas resistentes. O que torna necessária a mudança do esquema de antirretrovirais, utilizando outros fármacos que podem onerar o custo do tratamento dificultando seu acesso a população em diversos países. Ainda segundo a OMS, prospecções matemáticas mostraram que 135.000 mortes adicionais e 105.000 novas infecções podem ocorrer nos próximos cinco anos, e os custos de tratamento do HIV poderiam aumentar em US\$ 650 milhões adicionais durante esse período, caso nenhuma ação for tomada contra o aumento do surgimento da resistência aos antirretrovirais (BRASIL, 2015; WHO, 2017).

A protease do HIV é uma enzima homodimérica, que possui duas cadeias polipeptídicas de 99 resíduos de aminoácidos idênticas. Cada monômero contém a sequência conservada ASP-THR GLY, que fornece o grupo asparatil que é necessário para catálise enzimática. Os inibidores da protease do HIV-1 são utilizados amplamente no Brasil nos esquemas de segunda linha de tratamento e no resgate terapêutico (terceira linha de tratamento). Sendo são abundantes os relatos de casos de resistência aos inibidores da protease (BRASIL, 2015; FDA, 2011; SANTOS; ALBUQUERQUE; BRITO, 2014, STANFORD, 2017).

1.1 JUSTIFICATIVA

O surgimento de cepas resistentes aos fármacos utilizados na terapia antirretroviral cresce de forma alarmante em escala global. Os antirretrovirais utilizados no tratamento de primeira e segunda linha do HIV são os que mais possuem relatos de casos de cepas resistentes. Com a perda da resposta terapêutica ao tratamento com os fármacos de primeira e segunda linha se torna necessária a mudança no esquema terapêutico e a introdução antirretrovirais de outras gerações, que possuem um custo mais elevado e oneram e muito o tratamento da AIDS.

A complexidade da resistência aos antirretrovirais está associada ao aparecimento de múltiplas mutações que se combinam e acumulam-se por gerações resultando em cepas altamente resistentes.

Os inibidores da protease são uma classe de drogas antirretrovirais que possui participação fundamental nos esquemas de tratamento da AIDS. Além do surgimento da resistência aos IPs utilizados nos esquemas usuais de tratamento, já existem relatos de resistência o darunavir, um inibidor da protease usado no tratamento de resgate terapêutico em casos de pacientes que já apresentam falha no tratamento inicial e resistência comprovada. O que torna ainda mais evidente o quão grave é o fenômeno de resistência aos antirretrovirais.

Nesse contexto, surge a necessidade de se investigar quais impactos a ocorrência de múltiplas mutações podem gerar na interação entre a protease do HIV-1 e o seu inibidor darunavir, por meio de métodos computacionais de química teórica.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Este estudo tem por objetivo avaliar, identificar e quantificar as mutações na protease do HIV-1 3UCB, bem como avaliar, por meio de simulações de dinâmica molecular, o impacto que as mutações produzem na interação a 3UCB e o seu ligante darunavir quando comparados com a protease do HIV-1 nativa 4LL3 complexada ao mesmo ligante.

1.2.2 Objetivos Específicos

- i. Usando como referência a protease nativa 4LL3, identificar e descrever as mutações presentes na protease HIV-1 Mutante PR 20-3UCB;
- ii. Descrever e fazer um estudo por modelagem molecular das interações da protease do HIV-1, tipo selvagem, complexada ao inibidor darunavir;
- iii. Descrever e fazer um estudo por modelagem molecular das interações da protease do HIV-1, PR20 mutante, complexada ao inibidor darunavir;
- iv. Identificar e mensurar os principais resíduos da protease do HIV-1 nativa 4LL3 e mutante 3UCB, que interagem com o inibidor darunavir;
- v. Realizar estudo de dinâmica molecular das proteases nativa e mutante complexadas com o inibidor darunavir;
- vi. Calcular a energia livre por meio dos métodos de *Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area*(MM/GBSA) para todos os sistemas do estudo;
- vii. Realizar cálculos de decomposição por resíduo para as principais interações existentes entre as proteases do HIV-1 protease do HIV-1 nativa 4LL3 e mutante 3UCB;
- viii. Avaliar se a coexistência de múltiplas mutações na protease tipo HIV-1 podem influenciar na interação com o inibidor, darunavir, por meio de métodos de modelagem molecular.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HIV/AIDS

A síndrome da imunodeficiência humana adquirida (AIDS, *acquiredimmunodeficiencysyndrome*) é causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV, *humanimmunodeficiencyvirus*), sendo caracterizada por diversos aspectos clínicos, como imunodepressão severa associada a infecções oportunistas, perda de peso e degeneração do sistema nervoso central (SNC). O HIV pertencente ao gênero *Lentiviruse* família *Retroviridae*, estabelece uma infecção persistente crônica, com longo período de latência e início gradual do aparecimento dos sintomas clínicos. Foram identificadas duas famílias do HIV, sendo estas denominadas de HIV-1 e HIV-2. A maior parte das epidemias causadas pelo vírus estão relacionadas com o tipo 1 (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003; BRUNTON et al., 2010).

O HIV possui tropismo por células do sistema imunológico que possuem o receptor CD4, como linfócitos e macrófagos. As partículas virais que iniciam a infecção estão presentes no sangue, sêmen, e outros fluidos corporais e a transmissão ocorre de indivíduo para indivíduo, por meio de relação sexual ou uso de agulhas contaminadas. Também pode ocorrer transmissão vertical, da mãe para o feto, e transmissão por meio de transfusão sanguínea (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003; BRUNTON et al., 2010).

2.1.1 Aspectos Epidemiológicos

Descoberta nos EUA, em 1981, a AIDS se espalhou rapidamente, adquirindo altos índices de morbidade e mortalidade em escala global, afetando principalmente países em desenvolvimento (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003; CUNICO; GOMES; VELLASQUES JUNIOR, 2008; SANTOS; ALBUQUERQUE; BRITO, 2014).

Levaram anos de pesquisa após a descoberta do HIV para que fármacos para o tratamento da infecção fossem desenvolvidos. O primeiro antirretroviral a ser lançado foi a zidovudina, que foi lançado em 1987, sob o nome comercial de Retrovir®, pelo laboratório GlaxoSmithKline. Depois vieram a didanosina (Videx®) em 1991, e a zalcitabina (Hivid®) em 1992 (FDA, 2011). O tratamento da infecção pelo HIV consiste na utilização combinada de um esquema de fármacos antirretrovirais, prática que teve sua importância para o tratamento eficaz infecção reconhecida desde de 1996, sendo denominada como terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) ou TARV. O tratamento com antirretrovirais tem por

objetivo diminuir a carga viral dos pacientes tratados, diminuindo a morbimortalidade e aumentando a expectativa e qualidade de vida das pessoas que vivem com o HIV/AIDS (BRASIL, 2015).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2016 o número de pessoas que viviam com o HIV em todo o mundo era de 36,7 milhões, sendo que 19,5 milhões, cerca de 53%, dessas pessoas tiveram acesso a terapia antirretroviral em 2016 (WHO, 2017). O Brasil é o país com maior concentração populacional da América Latina, e em consequência disso também é o país que concentra o maior índice de casos novos na região, cerca de 40%. Com base nos dados fornecidos em março de 2016 a UNAIDS (Programa Internacional de Combate à Aids das Nações Unidas) estima que o número de pessoas vivendo com HIV no país é de aproximadamente 830.000, e que, cerca de, 15.000 pessoas vêm a óbito anualmente devido a causas relacionadas à AIDS (UNAIDS, 2017).

Em julho deste ano a OMS (Organização Mundial da Saúde) comunicou a imprensa um alerta sobre a crescente ameaça de resistência aos medicamentos utilizados no tratamento da AIDS. Nesta ocasião também foi divulgado um relatório detalhado sobre o assunto, o qual foi baseado em pesquisas nacionais realizadas em diversos países. A organização advertiu que o aumento da resistência aos antirretrovirais em diferentes países pode prejudicar o progresso global no tratamento e prevenção da infecção pelo HIV se medidas efetivas não forem tomadas precocemente, afim de evitar o avanço do surgimento de novas cepas resistentes (WHO, 2017).

O relatório publicado pela OMS mostrou que em 6 dos 11 países pesquisados na África, Ásia e América Latina, mais de 10% das pessoas que iniciaram a terapia antirretroviral apresentaram uma cepa de HIV resistente a alguns dos medicamentos mais amplamente utilizados contra o HIV. A OMS considerou o percentual de 10% um limite que não deve ser ultrapassado, recomendando que esses países revisem urgentemente seus programas de tratamento do HIV (WHO, 2017).

2.1.2 Estrutura e ciclo de replicação do HIV

O HIV é classificado na família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus* e apresenta duas espécies, o Vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1) e Vírus da imunodeficiência humana 2 (HIV-2) (ICTV, 2012). Seu genoma é constituído por duas moléculas de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples de polaridade positiva que servem de molde para a síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) por ação da DNA polimerase dependente de RNA (transcriptase reversa - RT) (COFFIN, 1996; HUANH et al., 1998).

O HIV-1 apresenta diâmetro de aproximadamente 110 nm. Possui forma esférica e apresenta um envelope, com glicoproteínas de superfície (gp120) e transmembrana (gp41). Na superfície interna do envelope observa-se a presença da proteína da matriz (p17) e o capsídeo viral, constituído pela proteína p24 (COFFIN, 1996; LUCIW, 1996; TURNER; SUMMERS, 1999) (Figura 1).

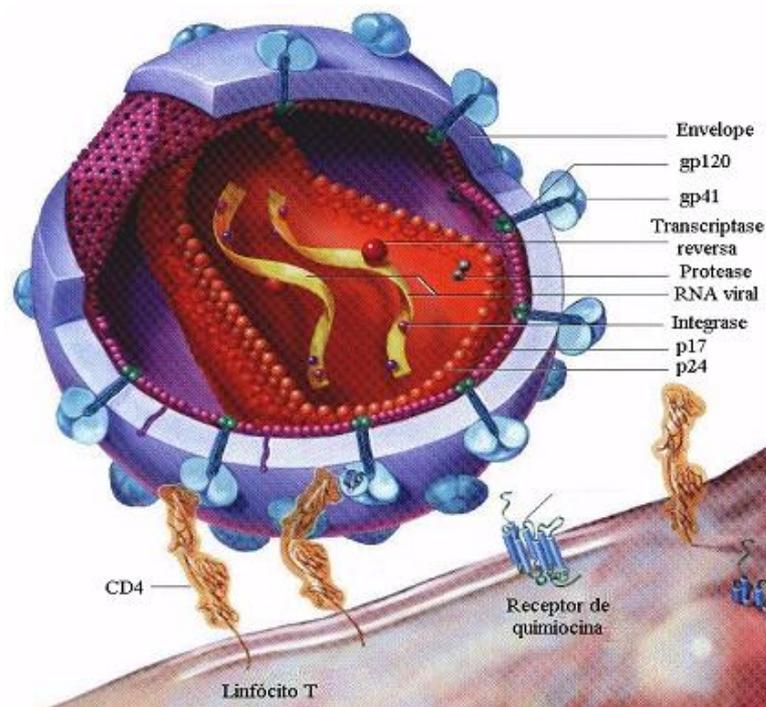


Figura 1 – Representação esquemática do HIV-1 (Adaptado de ABBAS et al., 1997).

Quanto à simetria do capsídeo, existem descrições de simetria cônica e outras evidências que sugerem uma conformação icosaédrica (COFFIN, 1996). No interior do capsídeo localizam-se duas cópias iguais do genoma de RNA de fita simples, de polaridade positiva, as quais contêm os três genes estruturais *gag*, *pol* e *env*, assim como os genes que codificam proteínas essenciais à replicação viral (protease, transcriptase reversa e integrase) e por proteínas acessórias (Nef, Vif e Vpr) (WU et al., 1996; CHEN et al., 1998; KOTOV et al., 1999; TURNER; SUMMERS, 1999; JETZT et al., 2000; ZHOU; AIKEN, 2001).

O agente viral adsorve a membrana da célula alvo, por meio de interações entre a glicoproteína do envelope, gp120, e o domínio aminoterminal da glicoproteína de superfície celular CD4, presente nos linfócitos T CD4⁺, monócitos, macrófagos, células dendríticas e células da micróglia cerebral (WYATT; SODROSK, 1998; DOUEK et al., 2002).

A interação gp120-CD4 gera mudanças conformacionais nas estruturas dessas proteínas, o que promove a interação de uma porção da molécula gp120 com o receptor de quimiocina, que, por sua vez, desencadeia nova conformação a estrutura da molécula gp41, resultando na fusão do envelope da partícula viral com a membrana da célula hospedeira (DORANZ et al., 1996; TRKOLA et al., 1996; CHAPHAM & WEISS, 1997; RIZZUTO et al., 1998; TSCHERNING et al., 1998; WYATT; SODROSKY, 1998; TURNER; SUMMERS, 1999).

O vírus também é capaz de entrar na célula por via endocítica, com fusão tardia de membranas no endossoma. No interior da célula, o vírus perde seu capsídeo, libera o genoma viral no citoplasma da célula hospedeira e ocorre o processo de transcrição reversa (COFFIN, 1996; EMERMAN; MALIN, 1998; TURNER; SUMMERS, 1999).

O processo de transcrição reversa é catalizado pela enzima DNA polimerase dependente de RNA viral (transcriptase reversa), que sintetiza o DNA viral a partir do RNA genômico viral (LUCIW, 1996; FREED, 1998; GÖTTE et al., 1999; TURNER; SUMMERS, 1999).

O DNA formado é transportado para o núcleo por nucleoproteínas do complexo de pré-integração, onde é integrado covalentemente ao genoma da célula hospedeira, através da catálise da integrase (WU et al., 1996; MILLER et al., 1997; DANIEL et al., 1999; TURNER; SUMMERS, 1999; VANDEGRAAFF et al., 2001).

O genoma do HIV-1 é expresso através de uma molécula de mRNA subgenômico e duas moléculas de mRNA, a partir das quais são traduzidas as proteínas virais (Turner & Summers, 1999). Após a montagem da nova partícula, o envelope é adquirido por meio do brotamento, cruzando a membrana plasmática (COFFIN, 1996; WYATT; SODROSKI, 1998).

2.1.3 Terapia Antirretroviral

O uso da terapia antirretroviral (TARV) tem por objetivo diminuir a morbidade e mortalidade das pessoas que vivem com a HIV/AIDS (PVHA), melhorando a qualidade e a expectativa de vida, e não erradicar a infecção pelo HIV. No intuito de estabelecer os critérios para o início de tratamento, buscou-se defini-los com base nas estimativas de risco de infecções oportunistas, evolução para aids e óbito. Entretanto, já existem evidências de que, mesmo em indivíduos assintomáticos com contagens elevadas de LT-CD4⁺, a replicação viral e a ativação imune crônica estão associadas ao desenvolvimento de doenças não

tradicionalmente relacionadas à infecção pelo HIV, tais como eventos cardiovasculares (BRASIL, 2015).

Atualmente no Brasil, o Ministério da Saúde, levando em consideração evidências de benefícios clínicos e de prevenção da transmissão do HIV providas por estudos intervencionistas e observacionais, somadas à disponibilidade de opções terapêuticas progressivamente mais cômodas e bem toleradas, estabeleceu novos critérios para o início do tratamento antirretroviral, que incluem a recomendação de início mais precoce, de acordo com o Quadro 2 (BRASIL, 2015).

Quadro 1 – Recomendações para início de terapia antirretroviral.

Recomendações para início de terapia antirretroviral em pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA)	
Condições clínicas e imunológicas	Recomendação
Pessoas vivendo com HIV/aids	
Todas as PVHA, independente da contagem de CD4	Estimular o Início imediato da TARV
Sintomáticos	
Independente da contagem de Linfócitos T CD4⁺	Iniciar TARV
Assintomáticos	
Contagem de Linfócitos T CD4⁺ ≤ 500 células/ mm³	Iniciar TARV
Contagem de Linfócitos T CD4⁺ 500 células/ mm³	
<ul style="list-style-type: none"> • Co-infecção por hepatite B e com indicação de tratamento da hepatite 	Iniciar TARV
<ul style="list-style-type: none"> • Pacientes com risco elevado ou doença cardiovascular 	Considerar início de TARV
<ul style="list-style-type: none"> • Neoplasias que necessitem de tratamento imunossupressor 	Considerar início de TARV
<ul style="list-style-type: none"> • Carga viral do HIV acima de 100.000 cópias/mL 	Considerar início de TARV
Sem contagem de Linfócitos T CD4 ⁺ disponível	Não iniciar TARV
GESTANTES	
Independente da contagem de Linfócitos T CD4⁺	Iniciar TARV
PORTADORES COM PARCEIROS SORODIVERGENTES	
Independente da contagem de Linfócitos T CD4⁺	Oferecer TARV para redução da transmissibilidade

Fonte: Brasil, 2015.

O benefício da TARV já foi claramente demonstrado em pacientes com doença sintomática avançada e naqueles que, apesar de assintomáticos, apresentam imunodeficiência acentuada expressa na contagem de linfócitos T CD4+ abaixo de 200/mm³. Além disso, vários estudos demonstram que o uso de antirretrovirais representa uma potente intervenção para a prevenção da transmissão do HIV. Dentro dessa perspectiva, o ministério da saúde recomenda atualmente o estímulo ao início imediato da TARV para todas as PVHA, independentemente da contagem de LT-CD4+, na perspectiva de redução da transmissibilidade do HIV, considerando a motivação da PVHA. (BRASIL, 2008; BRASIL, 2015).

Com a ampla utilização da TARV no Brasil houve melhora nos indicadores de morbidade, de mortalidade e qualidade de vida. Por outro lado, contribuiu para o desenvolvimento do perfil crônico-degenerativo assumido pela doença na atualidade. Pacientes em uso de TARV há mais tempo convivem com toxicidade dos medicamentos, assim como com a possibilidade de co-infecções e/ou variantes resistentes do vírus (BRASIL, 2008).

Segundo Romão Júnior (2014), a detecção precoce da doença renal aliadas a condutas terapêuticas adequadas para retardar a progressão da enfermidade, pode reduzir o sofrimento dos pacientes além de reduzir os custos financeiros associados aos tratamentos de diálise.

Em nível da atenção básica é necessário tratar e controlar os fatores de risco modificáveis como diabetes, hipertensão, dislipidemia, tabagismo e doença cardiovascular, de acordo com as normatizações do Ministério da Saúde (BRASIL, 2014).

Muitas vezes os portadores da doença renal crônica apresentam quase sempre evolução progressiva, insidiosa e assintomática, dificultando assim o diagnóstico precoce da disfunção renal. Por isso, é necessário que a equipe de saúde seja conscientizada a aumentar a vigilância e capacitação nos cuidados primários á saúde, para diminuição do aparecimento de casos novos nos pacientes do HIPERDIA (ROMÃO JÚNIOR, 2014).

Dois anos após a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS/SIDA) ter sido identificada como uma doença em 1981, o vírus humano da imunodeficiência (HIV) foi isolado como suposta causa da doença. A partir desse momento se iniciou uma intensiva busca por componentes que poderiam inibir a infecção e a replicação do vírus e, talvez, alterar favoravelmente o curso da doença. O primeiro componente que mostrou inibição da replicação do vírus HIV tanto *in vitro* quanto *in vivo* foi o suramin. Entretanto, o primeiro agente antirretroviral a ser licenciado para uso clínico foi a zidovudina, em 1987. Em 2000, já

havia sido aprovados cinco inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa (DE CLERCQ, 2009; DE CLERCQ, 2010; RAFFANTI; HAAS, 2003).

Até o ano de 2010 haviam, nos Estados Unidos e Europa, vinte e cinco drogas antirretrovirais licenciadas para uso clínico no tratamento da AIDS. Estes compostos são distribuídos em diferentes categorias dependendo da interação com seu alvo dentro do ciclo de replicação do HIV. Os alvos investigados mais intensamente durante as primeiras décadas de pesquisa na área são a transcrição reversa e o processamento proteolítico pela protease viral (DE CLERCQ, 2009; DE CLERCQ, 2010).

A transcrição reversa e catalizada pela enzima transcriptase reversa (RT) (RNA – dependente de DNA polimerase), uma enzima viral específica que retrotranscreve o genoma viral do RNA de cadeia simples para o DNA pro-viral de cadeia dupla. Enquanto que o processamento proteolítico é catalisado pela protease viral que cliva a poliproteína precursora viral em proteínas virais maduras (tanto estruturais quanto funcionais) (DE CLERCQ, 2009).

Posteriormente novos alvos foram investigados como possíveis sítios de ação para as drogas antirretrovirais, os quais podemos citar: a entrada viral, particularmente a fusão vírus-célula e a interação do vírus com seus (co) receptores; e a integração do DNA pro-viral no genoma das células hospedeiras, um processo realizado por uma enzima viral específica, integrase, que determina se a célula infectada com HIV e todas as células filhas que dela derivam irão portar permanentemente o pro-vírus (DE CLERCQ, 2009).

Através da Lei 9.313 de 1996, o Ministério da Saúde - MS vem garantindo o acesso ao tratamento antirretroviral (TARV) a todas as pessoas que vivem com HIV-1 e que tenham indicação de recebê-lo, conforme as recomendações terapêuticas vigentes no Brasil (BRASIL, 2008).

Atualmente o arsenal de drogas antirretrovirais disponíveis no Brasil, distribuídas gratuitamente no sistema único de saúde (SUS), para o tratamento da infecção pelo HIV é composto por cinco inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa (NRTIs) (zidovudina, didanosina, estavudina, lamivudina, e abacavir), um inibidor nucleotídico da transcriptase reversa (NtRTI) (tenofovir), três inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa (NNRTIs) (nevirapina, etravirina, e efavirenz), sete inibidores de protease (PIs) (saquinavir, ritonavir, tripanavir, lopinavir, atazanavir, fosamprenavir, e duranavir), um inibidor de fusão (FI) (enfuvirtida), um inibidor de co-receptores (maraviroque) e dois inibidores de integrase (INIs) (raltegravir e dolutegravir) (DE CLERCQ, 2010; BRASIL, 2015).

Desde 1996, a importância do regime de combinação de drogas anti-HIV começou a ser amplamente aceita. Tal prática, comum para o tratamento de tuberculose, foi também

introduzida para o tratamento da AIDS. Sendo esta denominada como terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) ou TARV. A combinação e três (ou mais) compostos antirretrovirais, se forma semelhante ao tratamento da tuberculose, tem como objetivos obter sinergismo entre diferentes compostos com diferentes alvos moleculares, reduzir as dosagens individuais das drogas diminuindo seus efeitos tóxicos, e diminuir a probabilidade do desenvolvimento de resistência às drogas (DE CLERCQ, 2009).

2.2 PROTEASE DO HIV

2.2.1 Estrutura e Mecanismo da Protease do HIV

A protease do HIV é uma enzima homodimérica, com duas cadeias polipeptídicas de 99 resíduos de aminoácidos idênticas. Cada monômero contém a sequência conservada ASP-THR GLY, que fornece o grupo asparatil que é necessário para catálise (MENÉNDEZ-ARIAS, 2010).

Esta asparatil protease é responsável pelo processamento da poliproteína Gag/Pol, resultando em proteínas estruturais, proteínas do capsídeo, da matriz, nucleocapsídeo, bem como as enzimas essenciais do vírus como protease, transcriptase reversa e integrase (DEWDNEY et al., 2013; YEDIDI et al., 2014).

Cristalograficamente, foi demonstrado que apenas um resíduo de ácido aspártico é protonado no homodímero, o que é consistente com a formação de intermediário tetrahédrico do substrato. Ambas as subunidades contém a superfície em gancho flexível, conhecida como região *flap* (resíduos 42 a 58), que se fecha quando o substrato ou inibidor liga-se a enzima (MENÉNDEZ-ARIAS, 2010).

O substrato se liga a protease do HIV em uma conformação β e é ancorado por muitas pontes de hidrogênio e a maioria das interações com os inibidores são fundamentadas em interações hidrofóbicas, de forma que a enzima reconhece sete resíduos de clivagem no substrato, quatro deles na porção N-terminal e 3 na porção C-terminal (MENÉNDEZ-ARIAS, 2010).

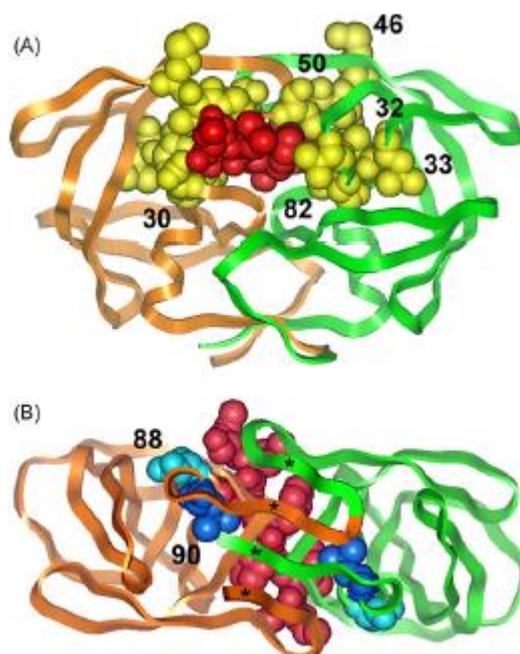


Figura 2 - Estruturas cristalográficas de protease de HIV-1 complexadas com um inibidor. (A) As duas cadeias polipeptídicas da protease são representadas como diagramas de fita (laranja e verde). O inibidor é mostrado em vermelho usando um modelo CPK. Os restos de gelatina representam resíduos que estão envolvidos na aquisição de mutações importantes de resistência a fármacos. (B) Vista de baixo do complexo de protease / inibidor de HIV-1 mostrando a estrutura em folha a envolvida na estabilização do homodímero e a localização de Asn88 e Leu90 (modelos CPK pálido e azul escuro). As coordenadas atômicas foram retiradas do ficheiro PDH 7HVP SWAIN et al., 1990. Fonte: MENÉNDEZ-ARIAS, 2010.

2.2.2 Inibidores da Protease do HIV-1

Existem atualmente vários inibidores de protease licenciados para uso clínico no tratamento de infecções pelo HIV. Com exceção do tripanavir (que é baseado em um esqueleto de cumarinas), todos os IPs são baseados no princípio da “peptidomimética”, isto é, contém um esqueleto hidroxietileno que mimetiza a ligação peptídica normal (clivada pela HIV-1 protease), mas que por si só não pode ser clivada. Impedindo assim que a protease do HIV realize sua função normal, que é o processamento proteolítico da proteína precursora viral em proteínas virais maduras (DE CLERCQ, 2009).

Os inibidores da protease do HIV são atualmente utilizados dentro do regime da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART), mostrando uma grande taxa de sucesso no tratamento, reduzindo a morbidade e a mortalidade induzida pelo HIV, resultando no crescimento da expectativa de vida dos pacientes infectados pelo HIV. Entretanto existem muitos aspectos preocupantes sobre os IPs que requerem atenção, tais como do desenvolvimento de resistência e seus múltiplos efeitos colaterais (ZHA et al., 2012).

A resistência viral contra os IPs é o resultado de uma complexa interposição de vários fatores, incluindo não somente as mutações virais, mas também fatores farmacocinéticos e interações droga-droga (ZHA et al., 2012).

Todos esses agentes atuam por ligação reversível ao sítio ativo da protease, tendo ação sobre células já infectadas, de modo que as partículas virais geradas são imaturas e não-infecciosas. Suas propriedades farmacocinéticas são apresentadas no quadro 2 (AARNOUTSE et al., 2001; RAFFANTI; HAAS, 2003).

Quadro 2 – Propriedades farmacocinéticas de alguns inibidores da protease do HIV-1.

FARMACOCINÉTICA	AMPRENAVIR	NELFINAVIR	RITONAVIR	SAQUINAVIR	LOPINAVIR _R ¹	DARUNAVIR
Biodisponibilidade Oral	35-90 %	20-80 %	65-75 %	12 %	?	82%
Efeito das Refeições sobre a ASC*	↑21% (rica em gordura)	↑20-30 %	↑15% (formulação em cápsula)	↑60%	↑50%	↑30%
t _{1/2 elim} **Plasmática (h)	7,0-11,0	3,5-5,0	3,0-5,0	7,0-12,0	6,0-8,0	15
Ligação com as Proteínas Plasmáticas	90 %	98 %	98 %	98 %	98 %	95%
Biotransformação	CYP3A4	CYP3A4 > 2C	CYP3A4 > 2D6	CYP3A4	CYP3A4	CYP3A4
Auto-indução da biotransformação	Não	Sim	Sim	Não	Sim	?
Excreção Renal do Fármaco Original (%)	4 < 3,0	1,0-2,0	3,5	< 3,0	< 3,0	8
Inibição da CYP3A4*	++	++	++++	+	+++	+++

* ASC, área sob a curva de concentração plasmática-tempo; **t_{1/2 elim}, meia vida de eliminação; ↑, aumento; ↓, diminuição; CYP, citocromo P450.¹ O Lopinavir_R refere-se à co-formulação com Ritonavir. Fonte: Raffanti ; Haas, 2003.

2.3 MUTAGENESE DO HIV

A resistência viral aos fármacos é causada por mutações no genoma do HIV, o que desencadeiam a codificação de proteínas estruturalmente modificadas, afetando a interação e atividade dos antirretrovirais (MENÉNDEZ-ARIAS, 2010).

A taxa de mutação do HIV é da ordem de 4×10^{-5} mutações por base, por ciclo replicativo, ou seja, cerca de uma mutação a cada três gerações, produzindo 10^{14} mutações por dia no mundo, com base nas estimativas populacionais de portadores (CHEN et al. 2004).

O maior problema no tratamento da infecção por HIV-1 é a resistência aos fármacos, problema que se estabelece pela alta taxa de mutação do vírus somada à pressão dos esquemas terapêuticos de drogas sobre a biologia do HIV. A frequente identificação de mutações associadas à resistência é crítica tanto para a terapia antirretroviral, sendo desfavorável na individualização do tratamento, bem como no planejamento de novas drogas (CHEN et al. 2004).

Cepas resistentes aos fármacos são comuns em pacientes portadores de HIV-1, já foram descritas 36 mutações de perda do sentido (*missense*) associadas à resistência a um ou mais dos inibidores de protease. O desafio da resistência reside na grande possibilidade de combinação de mutações, sendo acumuláveis na protease do vírus. Mutantes altamente resistentes muitas vezes têm 20 ou mais mutações e estratégias para desenvolvimento de inibidores efetivos estão constantemente sendo revisadas (SHEN et al., 2015).

Na natureza, o HIV-1 encontra-se amplamente distribuído no mundo, sofrendo pressão de mutação e pressão de seleção da terapia antirretroviral, conduzindo ao acúmulo de mutações combinadas. Desta forma, um estudo a partir da co-cristalização do complexo LPV e protease do HIV-1, de isolado clínico é mais representativo para investigação estrutural e elucidação dos mecanismos de resistência, favorecendo um estudo comparativo para análise do impacto das mutações sobre o complexo LPV e protease do HIV-1, partindo da co-cristalização do complexo para cepa mutante MDR769, descrita por Liu et al. (2013).

A resistência aos inibidores da protease se dá pela ocorrência de mutações que se acumulam, culminando na substituição de dois ou mais aminoácidos que resultam em mudanças conformacionais na superfície e na cavidade do sítio ativo da enzima, reduzindo a interação com o ligante, (MENÉNDEZ-ARIAS, 2010).

Mutações de resistência primárias afetam resíduos do sítio de ligação ao substrato e sua vizinhança, são mutações que reduzem a atividade catalítica e a capacidade de replicação viral, são elas relacionadas: D30N, V32I, L33F, M46I/L, I47A/V, G48V, I50L/V, V82A/F/L/S/T, e I84V. De maneira compensatória à perda de função estabelecida pelas mutações primárias, outros aminoácidos são adicionalmente modificados como forma de reestabelecer a estabilidade e a atividade enzimática, são designadas como mutações secundárias (MENÉNDEZ-ARIAS, 2010).

Segundo Liu e colaboradores (2013), as mutações V32I, I47A, M46I, L33F, I54V, V82A, I84V e L90M são descritas como mutações de resistência e combinação entre as mutações L76V, M46I e V82A na protease são responsáveis por reduzir a eficácia do

lopinavir, bem como o acúmulo de mutações nos códons 82, 54 e 46 antes do início da terapia antirretroviral, favorecem a resistência a este fármaco.

A identificação de novas mutações de resistência requer a combinação de estudos clínicos e de ciência básica, bem como estudos de genotipagem descrevem a frequência de mutações de resistência em populações de portadores de HIV ao redor do mundo e do Brasil (CHEN et al., 2004; FERREIRA et al., 2011; GRÄF et al., 2011; MACÊDO et al., 2011; SANTOS et al., 2011; VELASCO-DE-CASTRO et al., 2014). As principais mutações de resistência aos inibidores de protease estão relacionadas no Quadro 3.

Quadro 3 – Mutações de resistência mais relevantes para os inibidores da protease do HIV-1.

Maiores Mutações de Resistência para os Inibidores da Protease (PI)													
Cons	24	32	46	47	48	50	54	76	82	84	88	90	
	L	V	M	I	G	I	I	L	V	I	N	L	
ATV/r		I	IL	V	VM	<u>L</u>	VTAM		ATS		<u>V</u>	<u>S</u>	M
DRV/r		I		VA		V	LM	V	F	V			
LPV/r	I	I	IL	<u>VA</u>	VM	V	VTAL	V	ATS	V			M
							M		F				

Negrito/sublinhado: Suscetibilidade reduzida de alto nível ou resposta virológica.
Negrito: susceptibilidade reduzida ou resposta virológica.
Texto claro: reduzida suscetibilidade em combinação com outras mutações de resistência a PI.
Abreviaturas: atazanavir (ATV), darunavir (DRV), lopinavir (LPV). Administrado com ritonavir para reforço farmacocinético (/r).
IPs adicionais: Fosamprenavir (FPV), indinavir (IDV), saquinavir (SQV) e tipranavir (TPV) raramente são usados. Nelfinavir (NFV) já não é recomendado. FPV/r e IDV/r nunca são mais ativos do que DRV/r e raramente, ou nunca, mais ativos do que LPV/r versus vírus resistentes. O TPV/r é ocasionalmente utilizado para a terapia de resgate, uma vez que pode ser ativo contra vírus LPV/r e DRV/r resistentes com mutações que aumentam a susceptibilidade a TPV. Consultas de especialistas +/- testes fenotípicos devem ser obtidos antes do uso de FPV, FPV/r, IDV/r, SQV/r e TPV/r.
Mutações adicionais: D30N e N88D são as principais mutações de resistência NFV. As mutações L10F, V11I, K20TV, L23I, K43T, F53L, Q58E, A71IL, G73STCA, T74P, N83D e L89V são mutações acessórias não polimórficas comuns. L10RY, V11L, L24F, M46V, G48ASTLQ, F53Y, I54S, V82CM, I84AC, N88TG são raras variantes não polimórficas.
Hipersusceptibilidade: I50L (cada PI exceto ATV); L10F, L24I, I50V, I54L (TPV); L76V (ATV, SQV, TPV); I47A (SQV); N88S (FPV).

Fonte: Stanford, 2018.

2.4 METODOS TEÓRICOS DE QUÍMICA COMPUTACIONAL

2.4.1 Dinâmica Molecular

Simulação por Dinâmica Molecular (DM) é uma das técnicas computacionais mais versáteis para o estudo de macromoléculas biológicas. Noplaneamento racional de fármacos baseado na estrutura do ligante, as simulações de DM têm contribuído exaustivamente em diversos estágios do processo (ALONSO; BLIZNYUK; GREASY, 2006).

A metodologia da DM é fundamentada nos princípios da Mecânica Clássica e fornece informações sobre o comportamento dinâmico microscópico, em determinado tempo e dos átomos individuais que compõem o sistema (BURKET; ALLINGER, 1982). Para se obter as propriedades macroscópicas (pressão, energia interna, volume, temperatura, entropia, energia livre, etc) de interesse à aplicação da mecânica estatística, é requerida a partir de outras microscópicas.

Com base na Mecânica Molecular (MM), as moléculas são tratadas como uma coleção de átomos que podem ser descritas por forças newtonianas, ou seja, são tratadas como uma coleção de partículas mantidas unidas por forças harmônicas ou elásticas. Um conjunto completo dos potenciais de interação entre as partículas é referido como “campo de força” (BROOKS; KARPLUS; PETTITT, 1988).

O campo de força empírico, tal como é conhecido como uma função energia potencial, permite que a energia potencial total do sistema, $V(r)$, seja calculada como a partir da estrutura tridimensional (3D) do sistema. $V(r)$ é descrito como a soma de vários termos de energia, incluindo os termos para átomos ligados (comprimentos e ângulos de ligação, ângulos diedros) e os termos para átomos não-ligados (interações de van der Waals e de Coulomb). Um típico campo de força é representado pela equação 1:

$$V(r) = \sum V_l + \sum V_\theta + \sum V_{vdW} + \sum V_{elec} \quad (1)$$

$$V_l = k_l (l - l_0)^2 \quad (2)$$

Onde, V_l é a energia de estiramento da ligação em relação a seu valor de equilíbrio (ou ideal), V_θ é a energia de deformação do ângulo de ligação em relação a seu valor de equilíbrio, V_ϕ é a energia devido à torção em torno de uma ligação, V_{vdW} representa a energia das interações de van der Waals e V_{elec} representa as energias de atração ou repulsão eletrostática entre duas cargas. A forma padrão para representar os potenciais harmônicos devido às oscilações dos comprimentos e ângulos de ligação com relação aos valores de equilíbrio é a utilização da Lei de Hooke, mostrada nas equações 2 e 3:

Onde l e θ são os comprimentos e ângulos de ligação, respectivamente, l_0 e θ_0 são os

$$V_\theta = k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (3)$$

correspondentes valores de equilíbrio e k_l e k_θ as constantes de força para a restituição aos respectivos valores de equilíbrio. A aproximação harmônica é válida somente para pequenas

distorções com relação aos valores de equilíbrio. A forma funcional padrão para representar o potencial de energia para uma torção está mostrada na equação 4:

$$V_{\varphi} = \frac{V_n}{2}(1 + \cos(n\varphi - \gamma)) \quad (4)$$

Onde V_{φ} é a energia devido à torção em torno de uma ligação, n é o número de máximos (ou mínimos) de energia em uma torção completa, φ é o ângulo diedro e γ é o ângulo de fase (defasagem no ângulo diedro que pode gerar um ponto de mínimo ou de máximo na posição $\varphi = 0$) (GUNSTEREN; BERENDSEN, 1987). O valor de n dependerá do tipo de torção considerada e, geralmente, não excede o valor 3.

Em alguns campos de força, um quarto potencial harmônico é definido para manter a estrutura tridimensional em um conjunto de quatro átomos, descrevendo ainda oscilações da mesma. Esse potencial é denominado “potencial torcional impróprio”. As interações entre pares de átomos não-ligados covalentemente (i, j) são descritas por potenciais compostos pelos termos de van derWaals e eletrostático, representados respectivamente pelos potenciais de Lennard-Jones (equação 5) e de Coulomb (equação 6).

$$V_{vdw} = 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (5)$$

$$V_{elet} = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r_{ij}} \quad (6)$$

Na equação 5, ϵ_{ij} é a profundidade do potencial entre a barreira atrativa e a repulsiva, e σ_{ij} é a distância finita na qual o potencial interpartícula é zero. Ambos são parâmetros ajustados experimentalmente ou por cálculos teóricos. No caso das interações eletrostáticas (equação 6), q_i e q_j correspondem à magnitude das cargas pontuais de cada átomo, r_{ij} a distância entre as cargas, ϵ_0 a permissividade do espaço livre e ϵ_r a constante dielétrica relativa do meio.

Os campos de forças existentes foram desenvolvidos de maneira independente e com todos os conjuntos de parâmetros específicos. Alguns incluem outros termos para descrever especificamente as ligações de hidrogênio ou para acoplar oscilações entre ângulos e

comprimentos de ligação, com o objetivo de se obter uma melhor concordância com espectros vibracionais (BROOKS; KARPLUS; PETTITT, 1988). A confiabilidade dos resultados é baseada na elaboração de um campo de força com parâmetros bem definidos. A escolha do campo de força depende, em grande parte, do sistema a ser estudado e das propriedades que serão investigadas. No caso de sistemas biomoleculares, os campos de força mais utilizados são AMBER, CHARMM, GROMOS, entre outros.

2.4.1.1 Dinâmica Molecular Clássica

A simulação de DM clássica consiste da solução numérica, passo a passo, da equação de movimento, que pode ser descrita para um sistema atômico simples pela equação 7:

$$F_i(t) = m_i a_i(t) \quad (7)$$

$$F_i(t) = -\partial V(r_i) / \partial r_i \quad (8)$$

Onde F_i é a força que atua sobre cada partícula do sistema em um instante de tempo t , e a_i é a aceleração do átomo i de massa m_i . Uma vez definido o campo de força, é possível calcular as forças que atuam sobre cada átomo, calculando-se a derivada primeira da energia potencial, obtida do campo de força escolhido, em relação às posições desses átomos (equação 8). A equação 8 gera diretamente a aceleração da partícula. A partir desta, integrando-se as equações de movimento, pode-se obter as velocidades, cuja integral, por sua vez, proporciona a mudança de posição do átomo.

Com as novas posições e velocidades de cada partícula, obtêm-se as energias potencial e cinética do sistema. Aplicando-se sucessivamente esse procedimento, obtém-se o que se denomina de “trajetória”, que nada mais é do que o conjunto de posições e velocidades de cada partícula ao longo do tempo.

2.4.1.2 Dinâmica Molecular De Sistemas Solvatados

Existem dois modelos de solvatação que podem ser utilizados para realizar simulações de DM de sistemas solvatados: o modelo de solvatação explícita e o modelo de solvatação implícita. No primeiro modelo, centenas ou milhares de moléculas de solvente são incorporadas explicitamente ao sistema como um componente adicional (BIZZARRI; CANNISTRARO, 2002). Vários potenciais foram desenvolvidos e parametrizados para descrever as moléculas de água explicitamente.

Os mais utilizados são os da família TIP (*Transferable Intermolecular Potentials*), desenvolvidos por Jorgensen e colaboradores (JORGENSEN; CHANDRASEKHAR; MADURA, 1983), TIP3P, TIP4P e TIP5P, os modelos de carga pontual, SPC e SPC/E, desenvolvidos por Berendsen, e o modelo ST2 de Stillinger e Rahman (STILLINGER; RAHMAN, 1974). Em alguns casos, tais como sistemas de proteína muito grandes, torna-se necessário a utilização de modelos de solvatação implícita, que reduzem o custo computacional das simulações. Em geral, um tratamento implícito de solvatação considera a influência média do solvente através da estimativa direta da energia livre de solvatação, definida como o trabalho reversível necessário para transferir o soluto em uma configuração fixa do vácuo para a solução.

O método de solvatação implícita não considera os graus de liberdade do solvente explicitamente, mas o trata como um meio contínuo. Métodos empíricos, tais como o modelo de área superficial acessível ao solvente (SASA), muitas vezes constituem formas simples e rápidas de avaliação da energia de solvatação com uma precisão comparável aos modelos teóricos. Na abordagem SASA, a energia livre de solvatação do soluto é expressa como a soma das contribuições atômicas, ponderada pelas suas áreas expostas ao solvente. A contribuição de cada átomo é quantificada por um coeficiente de superfície, o qual reflete a hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade do tipo de átomo em questão (ROUX; SIMONSON, 1999; FERRARA; APOSTOLAKIS, 2002)

O modelo de solvatação contínuo tem se destacado para descrever a solvatação eletrostática. Nesta abordagem o soluto é considerado como uma cavidade embebida em um meio dielétrico. A correspondente energia livre de solvatação eletrostática pode ser calculada rigorosamente através das soluções da equação de Poisson-Boltzmann (PB), ou aproximadamente pelo uso do modelo generalizado de Born (GB) (BAKER, 2005). Em estudos de associação de macromoléculas biológicas com ligantes, o modelo de solvatação implícita de Born generalizado (GB) é o mais aplicado devido ao seu menor custo computacional (ZOU et al., 1999; LIU et al., 2004)

A combinação GB/SA tem sido reconhecida como uma excelente escolha para o tratamento implícito de solvatação em simulações biomoleculares. Diversas otimizações dos métodos de solvatação implícita têm sido realizadas e encontram-se implementados em diversos pacotes de programas de modelagem molecular como CHARMM, AMBER e XPLOR. Adicionalmente, continuam os esforços de pesquisa para a parametrização destes modelos com diferentes solventes (LI; ZHU, 1999; LUQUE; ZHAN, 1996).

2.4.1.3 Método Molecular *MechanicsGeneralized Born Surface Area* (MM-GBSA)

O método MM-GBSA aplica solvente implícito em seu modo de solvatação e é amplamente utilizado para o cálculo de energia livre de ligação para complexos não-ligados covalentemente. Este método calcula a energia livre de ligação via o ciclo termodinâmico mostrado na Figura 3, onde os termos de energia livre de solvatação são calculados utilizando o modelo de solvente implícito. A energia total calculada dentro do ciclo é obtida sobre a média do *ensemble* obtido de uma trajetória simulada. Os *ensemble* são obtidos para cada um dos três estados – complexo (receptor + ligante), receptor e ligante livre (MILLER et al., 2012).

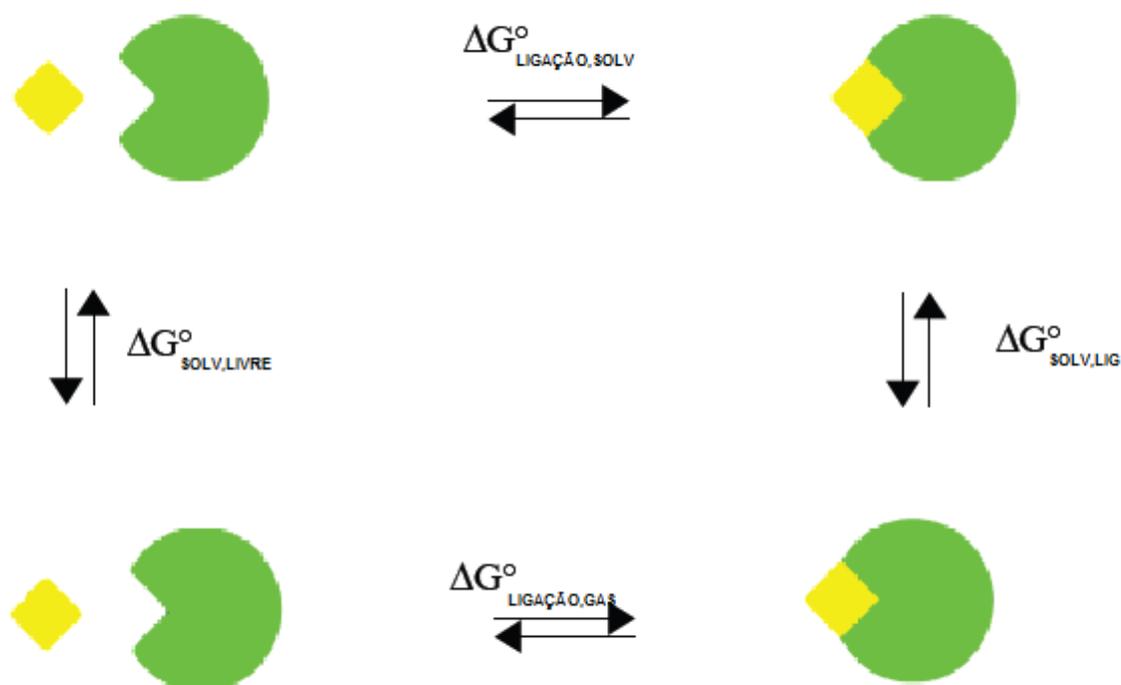


Figura 3 - Representação esquemática do ciclo termodinâmico envolvido para o cálculo de energia de ligação. Fonte: Miller et al. (2003).

Formalismo matemático:

$$\Delta G_{\text{LIGAÇÃO}} = \Delta G_{\text{SOLV,COM}} - \Delta G_{\text{SOLV,LIVRE}} + \Delta G_{\text{LIGAÇÃO,GAS}}$$

$$\Delta G_{\text{LIGAÇÃO}} = \Delta G_{\text{SOLV,COM}} - (\Delta G_{\text{SOLV,REC}} + \Delta G_{\text{SOLV,LIG}}) + (\Delta E_{\text{MM}} - T\Delta S)$$

$$\Delta G_{\text{LIGAÇÃO}} = \Delta E_{\text{MM}} + (\Delta G_{\text{SOLV,COM}} - \Delta G_{\text{SOLV,REC}} - \Delta G_{\text{SOLV,LIG}}) - T\Delta S \quad (9)$$

Onde:

ΔE_{MM} : É a média da energia calculada para o sistema em fase gasosa utilizando os ter MM do campo de força;

$\Delta G_{SOLV,COM}$, $\Delta G_{SOLV,REC}$, $\Delta G_{SOLV,LIG}$: São os termos da energia livre de solvatação para o complexo, receptor e ligante, respectivamente;

T: Temperatura absoluta;

ΔS : Entropia do sistema.

No cálculo de energia livre de solvatação, dois termos são considerados, um polar – estimado por um modelo de solvente implícito – e outro não-polar, que surge da energia requerida para a formação da cavidade do soluto dentro do solvente (no inglês, *Surface Area* – SA).

O principal custo computacional para se aplicar o método MM-GBSA é devido as simulações iniciais para se construir cada *ensemble*, ou seja, é preciso uma simulação para cada estado analisado. Entretanto, para se reduzir este custo, todos os três *ensembles* podem ser obtidos de uma simples simulação a partir da técnica denominada de protocolo de trajetória simples (MILLER et al., 2012).

Esta técnica subestima a energia livre de ligação (predizendo uma energia relativamente baixa), uma vez que os estados complexados do receptor e ligante será menos estável na conformação complexada do que quando eles estão livres em solução, neste caso negligenciando o cálculo do termo entrópico já que este exige um maior custo computacional. Entretanto, aplicando-se esta aproximação para uma família de receptores e ligantes relacionados (estruturalmente), os erros sistemáticos em cada cálculo de estado final serão similares. Portanto, o método MM-GBSA é útil na função de pontuar (ranquear) um conjunto de inibidores propostos para uma específica enzima calculando a energia livre de ligação relativa (sem o termo entrópico) (HOMEYER; GOHLKE, 2012).

2.4.1.4 Energia de Decomposição por Resíduo

O principal objetivo é decompor a energia de interação eletrostática global total em uma energia de interação permanente (ΔE_{PERM}), correspondente a interação do ligante não polarizado em fase gasosa com a enzima, e a energia de polarização (ΔE_{POL} como resultado da mudança da função de onda molecular no sítio ativo da enzima (HENSEN et al., 2004).

Então, a energia de interação eletrostática global total entre o inibidor e a enzima pode ser escrito como:

$$\Delta E_{EL} = \Delta E_{PERM} + \Delta E_{POL} \quad (10)$$

Na equação (23), a energia de interação permanente é computada usando a função de onda do inibidor em fase gasosa através do Hamiltoniano de interação eletrostática, também chamada de energia de perturbação de primeira ordem:

$$\Delta E_{PERM} = \langle {}^0 | \hat{H}_{QM/MM} | {}^0 \rangle \quad (11)$$

A energia de polarização pode ser decomposta em um termo de estabilização polarizado e um termo de distorção eletrônica do inibidor:

$$\Delta E_{POL} = \Delta E_{ESTAB} + \Delta E_{DIST} \quad (12)$$

A energia de estabilização polarizada indica o aumento na energia de interação do inibidor com uma nova distribuição de cargas no sítio ativo. Portanto, esse termo é sempre igual ou menor que zero, enquanto que a energia de distorção eletrônica refere-se à penalidade pela reorganização da distribuição eletrônica do inibidor no sítio ativo da enzima. O termo de estabilização polarizado é definido por:

$$\Delta E_{DIST} = \langle | \hat{H}_{QM}^0 | \rangle - \langle {}^0 | \hat{H}_{QM}^0 | {}^0 \rangle \quad (13)$$

E a distorção eletrônica é dada por:

$$\Delta E_{ESTAB} = \langle | \hat{H}_{QM/MM} | \rangle - \langle {}^0 | \hat{H}_{QM/MM} | {}^0 \rangle \quad (14)$$

Essa aproximação tem sido recentemente validada e utilizada com sucesso no estudo de reações e interações de sistemas enzima-substrato e enzima-inibidor.

3 METODOLOGIA

3.1 ESTRUTURAS INICIAS E PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS DA PROTEASE DO HIV-1 COMPLEXADA AO INIBIDOR DARUNAVIR NATIVA E MUTANTE

As coordenadas iniciais dos complexos protease do HIV-1 interagindo com o inibidor darunavir foram obtidas do banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) com códigos de acesso 4LL3 (KOZISEK et al., 2014) (Figura 4) para a enzima nativa e 3UCB (AGNISWAMY et al., 2012) (Figura 5) para a enzima mutante PR 20, sendo esta oriunda de isolado clínico apresentando mais de 20 mutações de resíduos. A estrutura 2D do inibidor está representada na Figura 6.

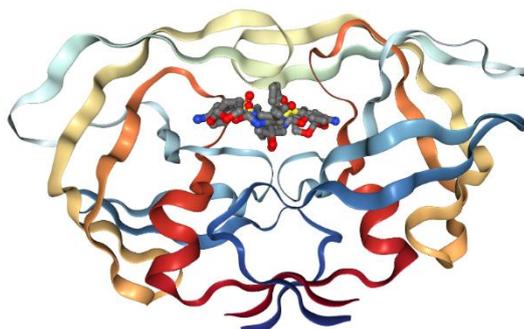


Figura 4-Protease do HIV-1 nativa complexada com o inibidor darunavir. Fonte: *Protein Data Bank*, código. 4ll3.

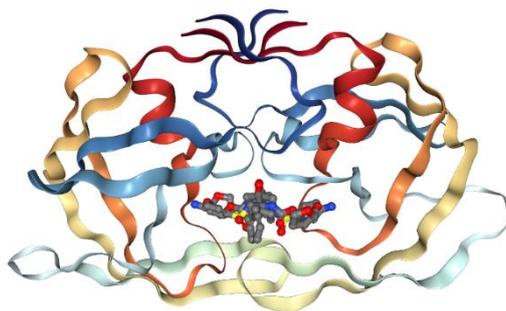


Figura 5 - Protease do HIV-1 mutante complexada com o inibidor darunavir. Fonte: *Protein Data Bank*, código 3UCB.

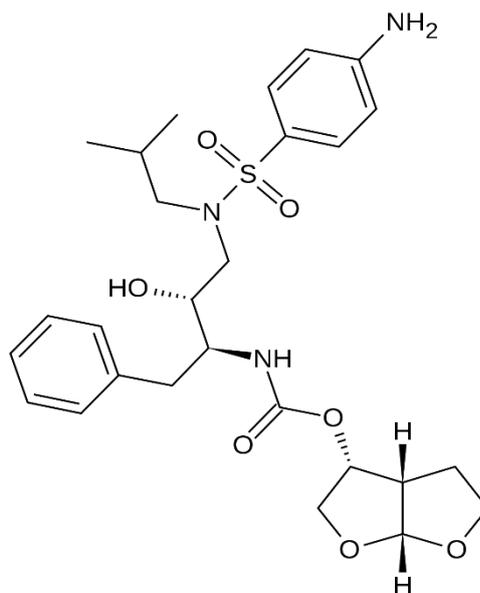


Figura 6- Representação 2D da estrutura do Darunavir. Fonte: *Protein Data Bank*.

Posteriormente foi realizada uma análise dos parâmetros que determinam a qualidade e a confiabilidade das estruturas cristalográficas escolhidas. Os dados utilizados estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros estruturais das proteínas cristalografadas.

Código	Protease	*Rfree	*Rfactor	Rfree-Rfactor	*Resolução em angstrom (Å)
4LL3	Nativa	0,230	0,183	0,047	1.95
3UCB	Mutante	0,223	0,162	0,061	1.38

Fonte: *Protein Data Bank*.

O parâmetro *Rfactor* mede a concordância entre o modelo cristalográfico e os dados experimentais, porém está sujeito a superajustes (*overfitting*) e como consequência a geração de modelos não reais. Para amenizar este problema, Brunger introduziu o conceito de validação cruzada no refinamento cristalográfico com a criação do parâmetro chamado *Rfree* (BRUNGER, 1992). O parâmetro *Rfree* tem a mesma definição que o *Rfactor*, porém é calculado para um número bem menor de flexões que não são usados para a construção do modelo final. Com a obtenção do *Rfree* é possível monitorar o processo de refinamento e checar se o *Rfactor* não está sendo diminuído artificialmente devido ao excesso de parâmetros inseridos no modelo.

Tanto *Rfactor* quanto *Rfree* dependem da resolução dos dados experimentais, mas em geral os valores de *Rfree* devem ser aproximadamente a resolução da cristalografia em angstrom dividido por 10. Assim, um conjunto de dados com resolução de 2 Å deve resultar em um *Rfree* de aproximadamente 2 (RUPP, 2009).

Um bom modelo cristalográfico pode ser escolhido baseado na diferença entre os parâmetros *Rfree-Rfactor* que podem ser considerados uma extensão do modelo que se ajusta aos dados experimentais, logo o resultado da diferença entre os dois fatores deve ser pequena, desejando-se que seja inferior a 0,05 unidades.

A resolução dos dados cristalografados também é um parâmetro importante para a avaliação do modelo. Como a resolução é expressa em angstrom (Å), valores pequenos significam uma resolução mais alta, logo mais acurado e preciso é o resultado do modelo gerado. Para avaliação deste parâmetro, baixas resoluções são consideradas a partir de 2,5 Å (DAVIS; TEAGUE; KLEYWEGT, 2003).

Com base nesses fatores podemos concluir que a escolha dos modelos cristalográficos é adequada para o trabalho realizado.

3.2 PREPARO DOS SISTEMAS E SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR

Simulação por Dinâmica Molecular (DM) é uma das técnicas computacionais mais versáteis para o estudo de macromoléculas biológicas. No planejamento racional de fármacos baseado na estrutura do ligante, as simulações de DM têm contribuído exaustivamente em diversos estágios do processo (ALONSO; BLIZNYUK; GREASY, 2006). A metodologia da DM é fundamentada nos princípios da Mecânica Clássica e fornece informações sobre o comportamento dinâmico microscópico, em determinado tempo e dos átomos individuais que compõem o sistema (BURKET; ALLINGER, 1982).

Para início do preparo dos sistemas das proteases nativa e mutante complexadas ao Darunavir, oriundas das cristalografias 4LL3 e 3UCB, foram separados e parametrizados separadamente a proteína e o inibidor de cada cristalografia, com todas as suas coordenadas iniciais preservadas.

No preparo dos sistemas para a dinâmica molecular, foi necessário o cálculo empírico dos valores de pKa dos resíduos de aminoácidos da protease utilizando o servidor ProPka (LI; ROBERTSON; JENSEN, 2005). Posteriormente foram adicionados os átomos de hidrogênio utilizando o módulo *tleap* implementado no Amber18. Os complexos então foram solvatados e neutralizados com a adição de contra íons em uma caixa octaédrica composta por moléculas de água descritas pelo modelo TIP3P (JORGENSEN et al., 1983) entendendo-se 12 Å entre o limite da caixa e o complexo.

Nas simulações de DM as enzimas foram descritas pelo campo de força AMBER ff99SB (HARNAK et al., 2006), enquanto que o ligante foi descrito pelo campo de força AMBER geral (*General AMBER Force Field – GAFF*) (WANG, et al., 2004). O método de cargas RESP foi utilizado para assinalar as cargas do ligante, utilizando-se o método HF/6-31G* no programa Gaussian09 e extraíndo-as com o módulo *antechamber* do Amber18.

Após a montagem dos sistemas foram minimizadas as cadeias laterais e principal da proteínas e o substrato, respectivamente, aplicando restrições de energia (10 kcal/mol) nos átomos do sistema para não haver superaquecimento e desnaturação das estruturas secundárias (250 ps), em seguida a energia dos sistemas (proteína + substrato + contra-ions + águas) foi minimizada sem restrições durante um tempo de 250 ps. Então foram feitos aquecimentos dos sistemas até 298 K, aplicando restrições regressivas de 50% a cada 50 K (250 ps) nos carbonos alfas de cada resíduo e no substrato até alcançar restrição de 1 kcal/mol

para o último passo do aquecimento, por fim, os sistemas foram equilibrados com 500 ps a temperatura constante de 298 K sem restrições (LUQUE; PAMPLONA, 2012).

3.3 ENERGIA LIVRE DE LIGAÇÃO E DECOMPOSIÇÃO POR RESÍDUO

A energia livre do sistema foi calculada por meio do método MM-GBSA (*Mechanics Generalized Born Surface Area*) onde se aplica solvente implícito em seu modo de solvatação, sendo amplamente utilizado para o cálculo de energia livre de ligação para complexos não-ligados covalentemente. Este método calcula a energia livre de ligação via o ciclo termodinâmico, onde os termos de energia livre de solvatação são calculados utilizando o modelo de solvente implícito. A energia total calculada dentro do ciclo é obtida sobre a média do *ensemble* obtido de uma trajetória simulada. Os *ensembles* são obtidos para cada um dos três estados – complexo (receptor + ligante), receptor e ligante livre (MILLER et al., 2012).

A decomposição por resíduo que é feita com o objetivo decompor a energia de interação eletrostática global total em uma energia de interação permanente (ΔE_{PERM}), correspondente a interação do ligante não polarizado em fase gasosa com a enzima, e a energia de polarização (ΔE_{POL} como resultado da mudança da função de onda molecular no sítio ativo da enzima (HENSEN et al., 2004).

3.4 PACOTES COMPUTACIONAIS UTILIZADOS

i. AMBERTOOLS: Pacote computacional de programas para simulações e análises biomoleculares. Dentre os programas que compõe este pacote destacamos os utilizados nesta dissertação: antechamber, tleap, cpptraj e MMPBSA.py;

ii. AMBER: Conjunto de programas dividido em duas partes principais: AMBERTOOLS e AMBER, ambos na versão 18, utilizada nesta dissertação. Denominamos Amber18 para referir-se a parte responsável pelas simulações de DM e energia livre de ligação. Dentre os módulos que compõe o Amber18 destacamos o módulo sander que foi utilizado para as simulações MM;

iii. GAUSSIAN: Pacote computacional utilizado para os cálculos de mecânica quântica (MQ). A versão utilizada nesta dissertação foi a 09 (Gaussian09);

iv. *Visual Molecular Dynamics* (VMD): Programa utilizado para a visualização das estruturas 3D e suas respectivas trajetórias das simulações por DM;

v. *USC CHIMERA*: é um programa altamente extensível para visualização interativa e análise de estruturas moleculares e dados relacionados, incluindo mapas de

densidade, montagens supramoleculares, alinhamento de sequências, resultados de docking, trajetórias e conjuntos conformacionais.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizada uma análise simples nas sequências fasta dos dois pds das proteases, com a finalidade de verificar quais as mutações presentes na mutante PR20 (3UCB) em relação protease nativa (4LL3). Na tabela 1 estão elencadas a mutações encontradas.

Tabela 2– Mutações encontradas na protease mutante 3UCB, nas cadeias A e B, em comparação com a protease nativa 4LL3. Em vermelho estão as mutações que estão mais relacionadas ao desenvolvimento de resistência ao darunavir.

Ordem	Posições Cadeia A	Posições Cadeia B	Aminoácidos
01	Q07K	Q07K	Gly/Lys
02	L10F	L10F	Leu/Phe
03	I13V	I13V	Ile/Val
04	I15V	I15V	Ile/Val
05	D30N	D30N	Asp/Asn
06	V32I	V32I	Val/Ile
07	L33F	L33F	Leu/Phe
08	E35D	E35D	Glu/Asp
09	M36I	M36I	Met/Ile
10	I47V	I47V	Ile/Val
11	I54L	I54L	Ile/Leu
12	Q58E	Q58E	Gly/Glu
13	I62V	I62V	Ile/Val
14	L63P	L63P	Leu/Pro
15	C67A	C67A	Cys/Ala
16	A71V	A71V	Ala/Val
17	I84V	I84V	Ile/Val
18	N88D	N88D	Met/Asp
19	L89T	L89T	Leu/The
20	L90M	L90M	Leu/Met
21	C95A	C95A	Cys/Ala

Fonte: Autoria própria.

Foram detectadas 21 mutações de aminoácidos na protease mutante 3UCB em relação a protease nativa 4LL3, e dentre elas as mutações V32I, I47V, I54L e I84V estão mais relacionadas ao desenvolvimento de resistência ao inibidor darunavir segundo o banco de dados de mutações da universidade de Stanford (2018). Segundo o banco de dados estas mutações de resistência podem levar a redução da susceptibilidade do ligante ao inibidor ou a uma resposta virológica. É importante ressaltar que uma das principais mutações de resistência associada perda de afinidade a maioria dos inibidores da protease do HIV-1, a I50V, não está presente no conjunto de mutações identificadas na protease mutante oriunda de isolado clínico (3UCB) analisada neste estudo (AGNISWAMY et al., 2012; STANFORD, 2018).

4.1 DINÂMICA MOLECULAR E RMSD

Os cálculos de dinâmica molecular para os sistemas formados pela protease do HIV-1 nativa e mutante com o seu inibidor darunavir, permitiram a obtenção de diferentes conformações ao longo do tempo de simulação. A partir das conformações atribuídas pelos átomos e a estabilidade conformacional no decorrer da simulação de 100 ns (nano segundos), foram obtidos os gráficos de desvio quadrático médio (RMSD ou do inglês *Root Mean Square Deviation*), que indicam o quanto a estrutura se modifica ao longo da simulação computacional, em relação a estrutura de partida.

Os resultados de RMSD para a protease nativa complexada com o darunavir evidenciaram que o inibidor se manteve em equilíbrio durante boa parte da trajetória da dinâmica molecular. O RMSD do ligante se manteve equilibrado durante toda a dinâmica ficando na faixa de 1,5 Å (Figura 7), enquanto que o RMSD da proteína mostrou algumas oscilações, mas sempre se mantendo numa faixa de 1,7 Å (Figura 8). Já o RMSD do sítio ativo não mostrou quase nenhuma oscilação se mantendo na faixa de 1,9 Å (Figura 9).

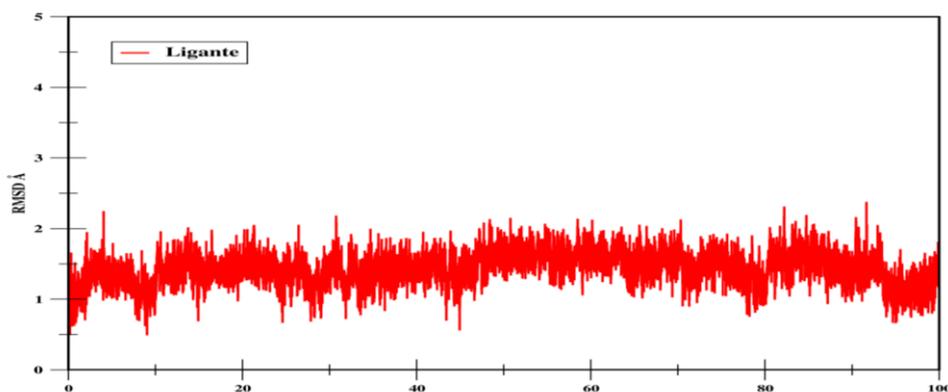


Figura 7 - RMSD do ligante do complexo 4LL3. Fonte: Autoria Própria

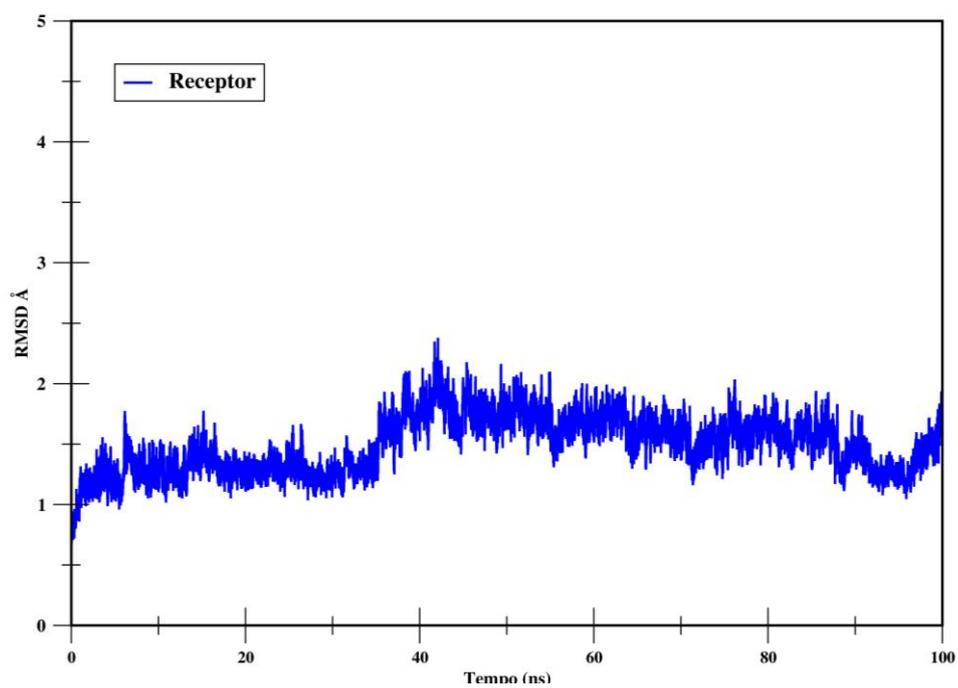


Figura 8- RMSD do receptor do complexo 4LL3. Fonte: Autoria Própria

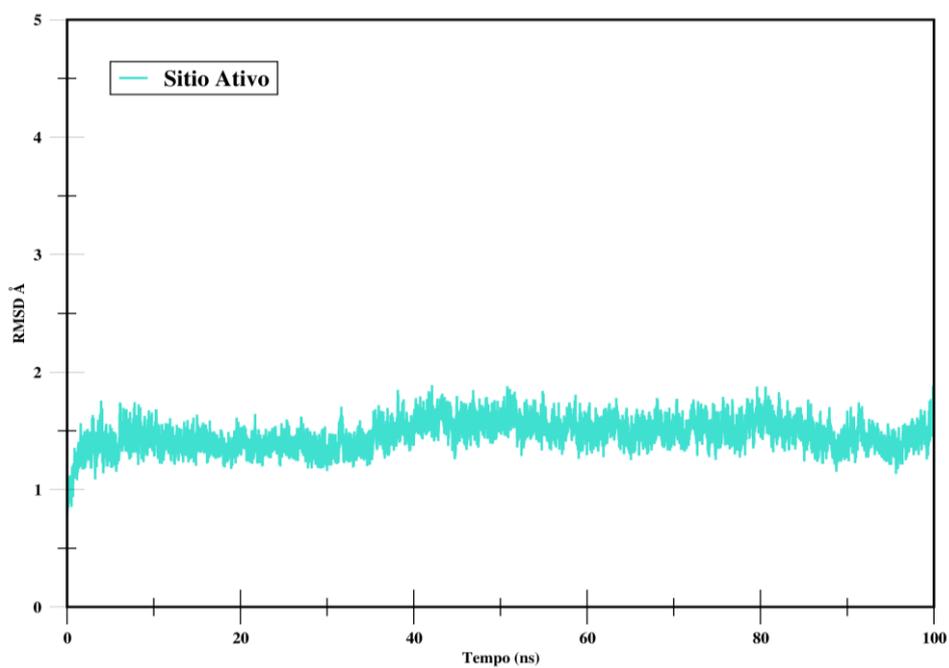


Figura 9- RMSD do sítio ativo do complexo 4LL3. Fonte: Autoria Própria.

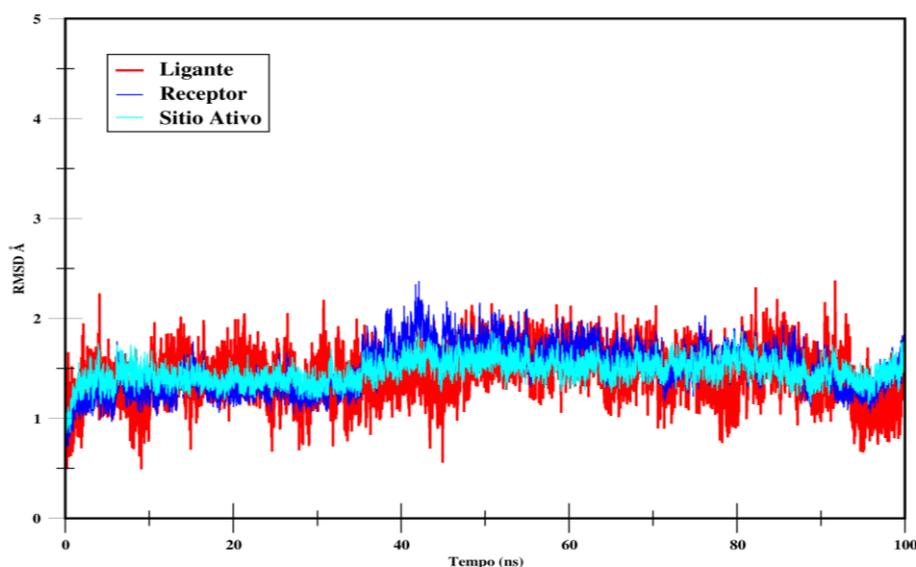


Figura 10- RMSD da proteína, sítio ativo e ligante sobrepostos do complexo 4LL3. Fonte: Autoria Própria.

O complexo darunavir e a protease mutante 3UCB também se manteve estável ao longo da maior parte de sua trajetória. O RMSD do ligante demonstrou uma oscilação maior entre 10 e 20 ns, chegando a um pico de 3,4 Å e durante o restante do tempo computacional se manteve equilibrado ficando na faixa de 1,7 Å (Figura 11). Já os RMSDs da proteína e do sítio ativo não apresentaram muitas oscilações, sempre se mantendo numa faixa de 1,5 Å (Figuras 12 e 13).

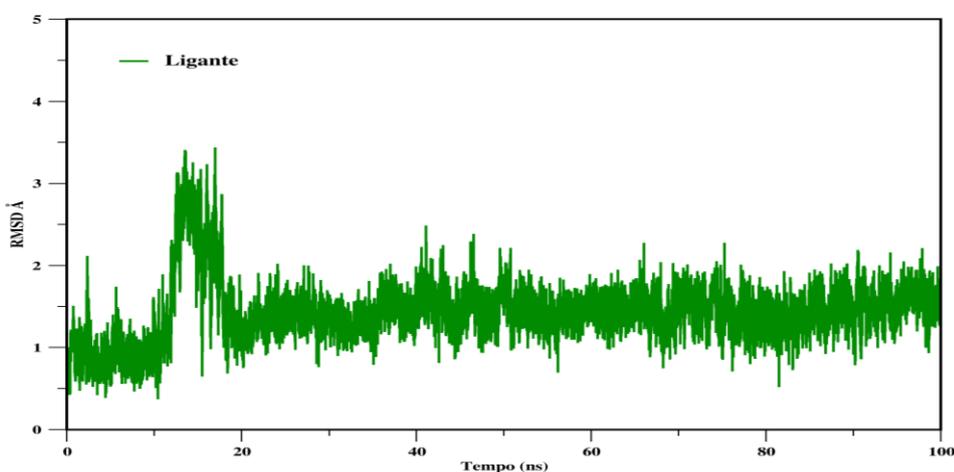


Figura 11- RMSD do ligante do complexo 3UCB. Fonte: Autoria Própria.

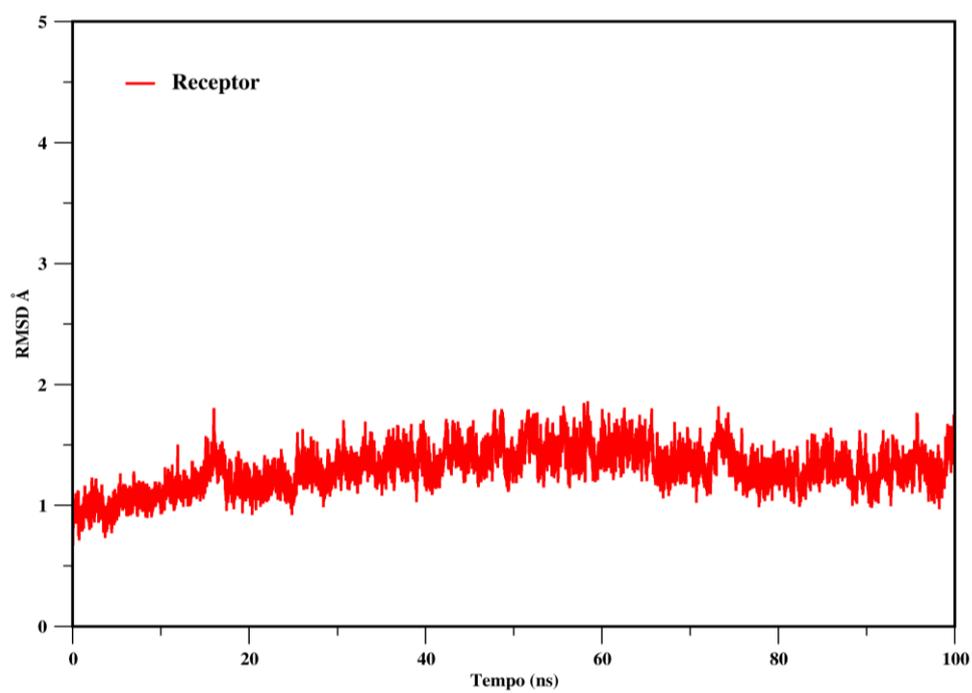


Figura 12- RMSD do receptor. Fonte: Autoria Própria

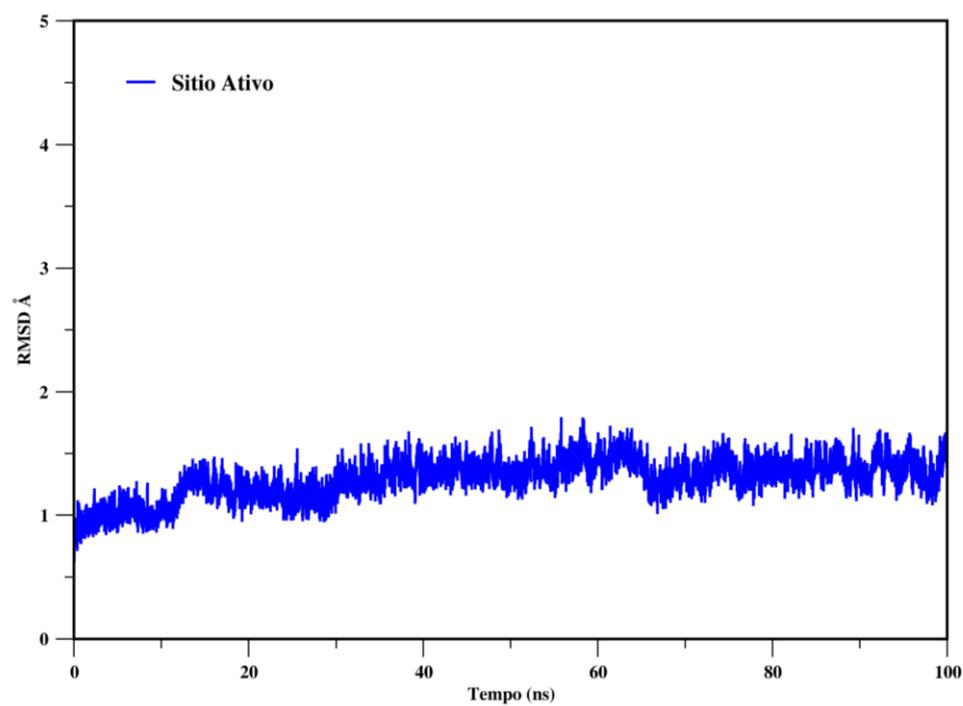


Figura 13- RMSD do sítio ativo. Fonte: Autoria Própria.

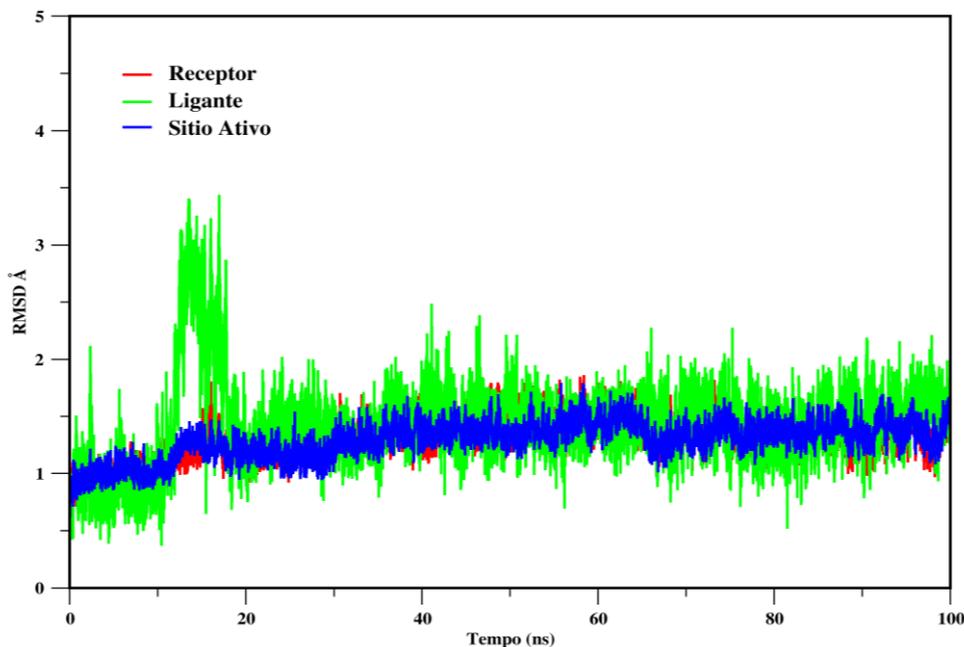


Figura 14- RMSD da proteína, sítio ativo e ligante sobrepostos. Fonte: Autoria Própria.

Os gráficos de RMSD mostraram que o ligante foi o componente dos complexos em estudo que mais sofreu alterações de conformação ao longo da trajetória de 100ns. Tal comportamento é compreensível, pois o darunavir é um potente inibidor de segunda geração da protease do HIV-1, planejado estruturalmente com a finalidade de aumentar o número de interações favoráveis com os átomos do sítio ativo. Por meio da formação de enantiômeros pela inversão do nitrogênio do grupo sulfonamida o darunavir é capaz de ligar simultaneamente a dois sítios na enzima protease: um no próprio sítio ativo e outro em um dos flaps móveis do dímero (Figura 15) (CUNICO et al., 2008).

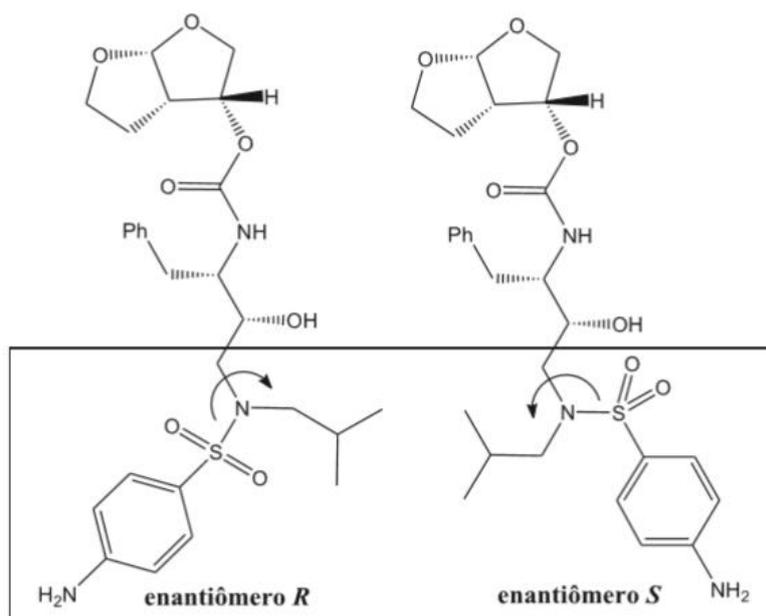


Figura 15- Enantiômeros pela rotação no nitrogênio da sulfonamida do darunavir. Fonte: Adaptado de Cunico et al., 2008.

Levando em consideração as características do darunavir é possível dizer que a maior variação de conformações observadas nos gráficos de RMSD dos dois complexos se deve a movimentação do ligante no sítio ativo em busca de interações mais favoráveis para se estabilizar na cavidade enzimática (AGNISWAMY et al., 2012; STANFORD, 2018).

Ao contrário dos gráficos de RMSD do ligante os gráficos das proteínas nativa 4LL3 e mutante 3UCB se mostraram bastante estáveis, com variações conformacionais menos expressivas. Este comportamento se deve ao fato de a cavidade enzimática dos sistemas já estar ocupada com o ligante, o que confere uma rigidez maior a proteína. Os resíduos de sítio ativo também não esboçaram variações de conformações que alterassem a estabilidade dos gráficos dos dois complexos.

4.2 FLUTUAÇÕES QUADRÁTICAS MÉDIAS (RMSF)

A comparação e análise das flutuações quadráticas médias (RMSF) ou do inglês *Root Mean Square Fluctuations* dos carbonos alfa ($C\alpha$) da protease nativa e mutante podem revelar informações importantes sobre a dinâmica de inibição da protease. Os perfis de flutuações dos sistemas em estudo durante o tempo total de simulação de 100 ns podem ser observados nas figuras 16 e 17.

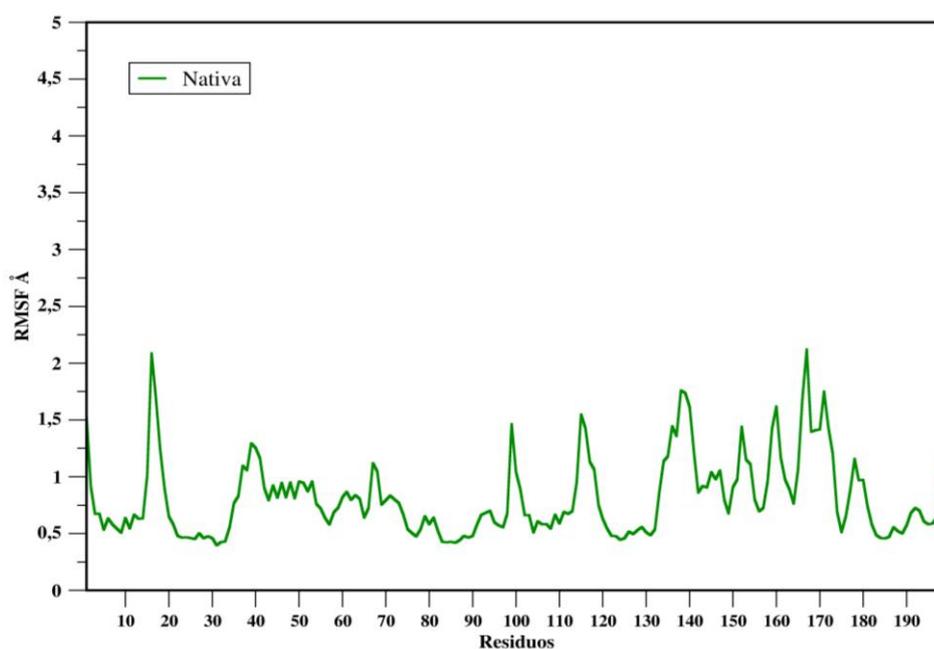


Figura 16- Gráfico de RMSF dos C α da protease nativa.

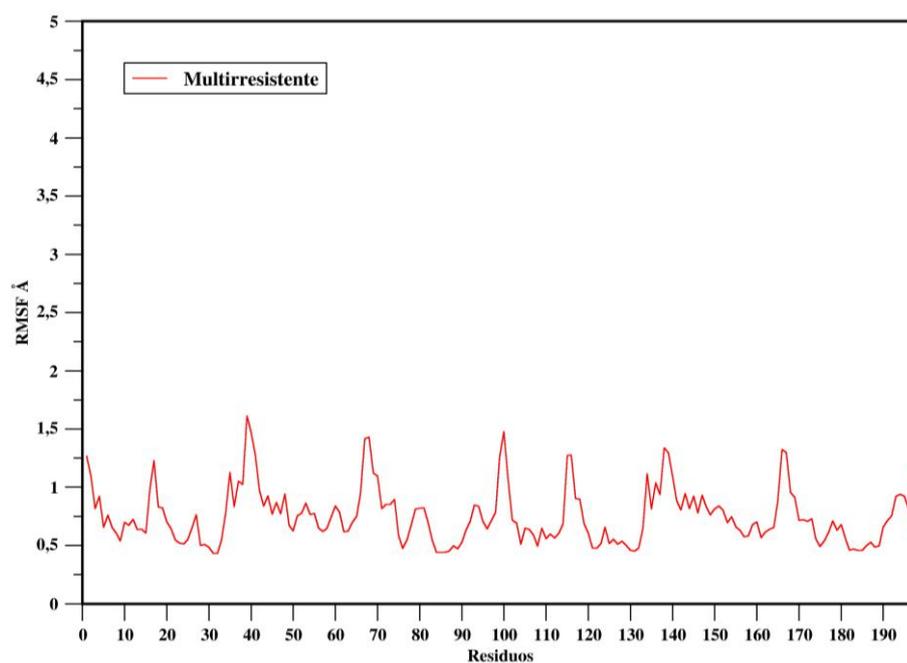


Figura 17- Gráfico de RMSF dos C α da protease mutante.

Por meio do RMSF podemos avaliar as regiões de maior flexibilidade das proteases em estudo durante o tempo computacional de 100 ns, sendo esta característica essencial para a manutenção de suas atividades biológicas (FIGUEIREDO, 2013). A maioria dos picos de

flutuação observados nos gráficos tanto da protease nativa quanto na mutante são referentes as regiões de alça da proteína, que correspondem aos resíduos 2-10, 15-18, 34-41, 48-53, 66-69, e 93-96 das cadeias A e B. Entretanto é possível notar que os picos de flutuações são maiores na protease nativa e que o perfil de flutuação da protease mutante é ligeiramente mais estável.

Análises estruturais realizadas por Agniswamy et al. (2012) com proteases mutantes (PR20) mostraram uma grande variação estrutural na região do *flap*, que corresponde aos resíduos 34-43 das cadeias A e B relacionadas as mutações E35D, M36I e S37N. A protease mutante 3UCB analisada neste estudo é oriunda do mesmo estudo realizado por Agniswamy et al. (2012) e contém as mutações E35D, M36I. Entretanto a mutação S37N não foi localizada durante a análise das mutações presentes na 3UCB.

Outra mutação dada como altamente relevante para o aumento da variação estrutural na região do *flap* da protease é a mutação I50V, a qual não está presente na protease mutante estudada. A mutação I50V é dada como uma das principais mutações que podem levar a resistência da protease do HIV ao inibidor darunavir (AGNISWAMY, et al.,2012; KOZISEK et al., 2014; STANFORD,2018).

Partindo do princípio que as mutações E35D, M36I e S37N, presentes na mutante 3UCB em estudo, deveriam gerar uma grande variação estrutural na região do *flap* fizemos o recorte do início e do fim da dinâmica das proteínas nativa e mutante afim de verificar se houve alguma perturbação na conformação da 3UCB em relação a 4LL3 (Figuras 18,19,20 e 29).

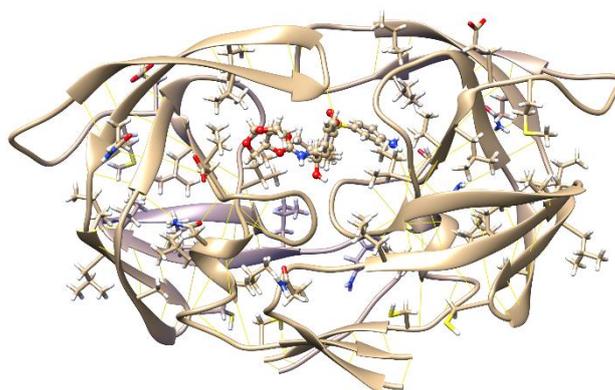


Figura 18- Protease do HIV-1 nativa 4LL3 antes da dinâmica. Fonte: Autoria própria.

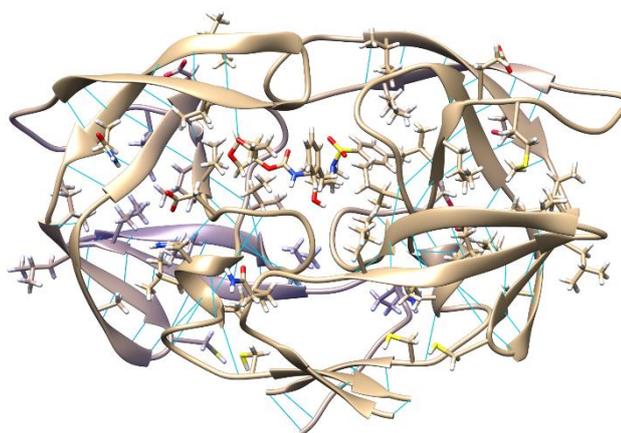


Figura 19- Protease do HIV-1 nativa 4LL3 depois da dinâmica. Fonte: Autoria própria.

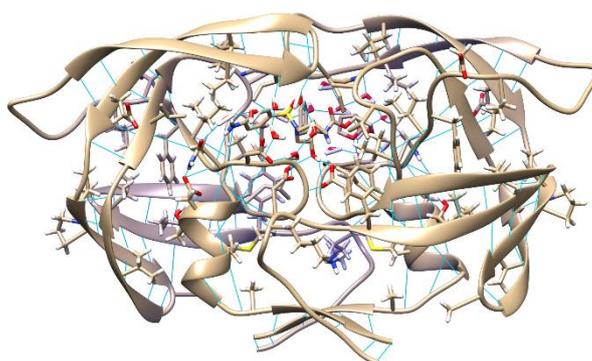


Figura 20- Protease do HIV-1mutante 3UCB antes da dinâmica. Fonte: Autoria própria.

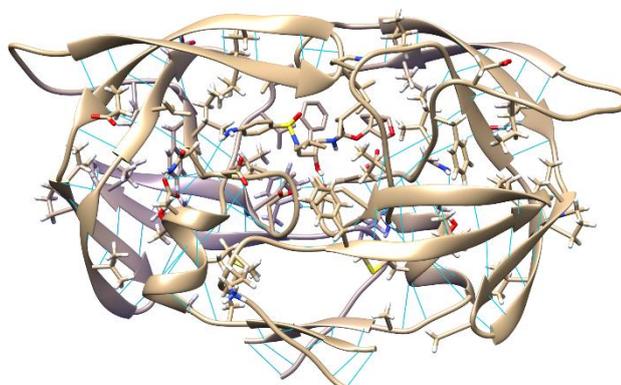


Figura 21- Protease do HIV-1mutante 3UCB depois da dinâmica. Fonte: Autoria própria.

De modo geral os resultados de nossas dinâmicas não demonstram grandes variações estruturais nas regiões de *flap* das proteínas estudadas quando comparamos os recortes de início e o fim do tempo computacional de 100ns. Como pode ser observado nas figuras acima o *flap* continuou fechado tanto na nativa como na mutante, sendo esta a conformação normal quando o sítio ativo está ocupado pelo ligante. Cabe aqui considerar que talvez se houvesse a presença da mutação I50V a variação das estruturas nessa região fosse maior, em estudos anteriores a presença dessa mutação foi associada a um rearranjo na conformação do *flap* culminando na abertura desta região, o que facilitaria a saída do inibidor do seu sítio de ligação (AGNISWAMY, et al., 2012; KOZISEK et al., 2014).

Scott e Schiffer (2000) descreveram como ocorre o movimento da região do *flap* ao redor do sítio ativo da protease de HIV-1. Em suas simulações verificaram a abertura da região do *flap* em 5 ns para a enzima livre, sendo que o mesmo não foi observado nas simulações com a protease complexada com um inibidor, deixando claro que a flexibilidade da enzima é influenciada pelo ligante.

4.3 ANÁLISE DAS DISTÂNCIAS MÉDIAS DE LIGAÇÃO E INTERAÇÕES DE HIDROGÊNIO

Para avaliar as mudanças na interação do darunavir no sítio ativo das proteases nativa e mutante foi realizado um estudo das distâncias médias de ligação e das interações de hidrogênio durante o tempo de 100 ns de dinâmica molecular. Os resultados estão sumarizados nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3- Distâncias médias de ligação e interações de hidrogênio existentes entre o darunavir e a protease nativa.

Interações de Hidrogênio			Protease Nativa	
Doador	Aceptor	Distância Média (Å)	Ocupação (%)	Total de Ocupação (%)
DRV	ASP25A	2.7099	99%	99,7%
DRV	ASP25A		0,7%	
ASH25B	DRV	2.6229	99%	99%
DRV	ASP30A	2.8502	57%	60,3%
DRV	ASP30A		1%	
DRV	ASP30A		1%	
DRV	ASP30A		0,9%	

DRV	ASP30A		0,4%	
ASP29B	DRV		32%	
ASP29B	DRV	2.8952	4%	36%
ASP30A	DRV	2.9307	12%	12%
ASP30B	DRV	2.9261	4%	4%
DRV	GLY27B	2.9167	2%	2%
GLY48B	DRV	2.9037	0,4%	0,4%
ILE50A	DRV	2.9364	0,2%	0, 2%
ASP29A	DRV	2.9363	0,2%	0,2%
ILE50B	DRV	2.9126	0,1%	0,1%

Fonte: Autoria própria.

Tabela 4 - Distâncias médias de ligação e interações de hidrogênio existentes entre o darunavir e a protease mutante.

Interações de Hidrogênio			Protease Mutante	
Doador	Aceptor	Distância Média (Å)	Ocupação (%)	Total de Ocupação (%)
DRV	ASP25A		97%	
DRV	ASP25A	2.7450	3%	100%
DRV	ASP25A		2%	
ASH25B	DRV	2.6733	51%	51%
DRV	ASN30B		33	
DRV	ASN30B		13%	
DRV	ASN30B	2.8655	0,2%	46,3%
DRV	ASN30B		0,1%	
ASN30B	DRV	2.9326	6%	6%
ASP29A	DRV		5%	
ASP29A	DRV	2.8976	0,8%	5,8%
ASN30A	DRV		5%	
ASN30A	DRV		2%	
ASN30A	DRV	2.8906	1%	8,85%
ASN30A	DRV		0,8%	
ASN30A	DRV		0,05%	
ILE50B	DRV	2.9061	4%	4,05%

ILE50B	DRV		0,04%	
ILE50B	DRV		0,01%	
DRV	ASH25B	2.7747	1%	1%
DRV	GLY27A	2.9039	0,4%	0,4%
GLY47A	DRV	2.9183	0,1%	0,1%
DRV	ASP29B	2.8490	0,09%	0,09%
ASP29B	DRV	2.9534	0,03%	0,03%
ALA28B	DRV	2.8821	0,02%	0,02%

Fonte: Autoria própria.

Ao contrário do que se esperava para protease mutante em comparação com a nativa observamos em nosso estudo das interações de hidrogênio que a 3UCB (mutante) realizou um maior número de interações que a 4LL3 (nativa), 13 e 11 respectivamente.

No estudo de Kosisek et al. (2014) todas as proteases mutantes analisadas perderam uma parte de suas interações de hidrogênio com o inibidor quando comparadas com a protease nativa complexada ao inibidor. Desta forma, os resultados obtidos em nosso estudo vão na contramão do foi verificado no estudo do autor em questão.

Ao avaliar as principais interações de hidrogênio estabelecidas observamos que os aspartatos 25 da cadeia A e B foram os resíduos que tiveram as interações mais estáveis durante o tempo computacional de 100ns. O Asp25A dos dois complexos obteve um tempo de interação semelhante com cerca de 100% no total de ocupação, o mesmo não foi verificado para o Ash25B, aspartato protonado dos sistemas, que apresentou um tempo total de ocupação na nativa de 99%, e 51% na mutante.

Observamos também que a mutação D30N, que substitui um aspartato por uma asparagina, impactou no perfil de interação entre a protease mutante e o darunavir. Na protease nativa o darunavir, como doador, formou interações de hidrogênio com o Asp30A que chegaram a um tempo total de ocupação de 60,3% e o Asp30A, como doador, também formou uma interação com tempo de ocupação de 12%. Enquanto que, na protease mutante o darunavir, como doador, formou interações de hidrogênio com resíduo multado Asn30B com um tempo total de ocupação de 46,3% e o Asn30B, como doador, também formou uma interação com tempo de ocupação de 6%.

Ao analisar os resultados das interações de hidrogênio que foram formadas nos complexos da protease nativa e mutante ligadas ao inibidor darunavir uma razoável diferença

no perfil de interação. A mutante obteve uma quantidade maior de interações de hidrogênio, 13, em relação a nativa, 11, ao passo que algumas interações que a nativa fez principalmente na região do sítio ativo mantiveram um tempo de ocupação maior comparado com a mutante (ASP25A, ASP25A, ASP30A, ASN30A).

4.4 ANÁLISE DE ENERGIA LIVRE DE LIGAÇÃO

Para análise da energia livre do sistema foi utilizado o tempo computacional total produzido, 100 ns, para a análise através do método MM-GBSA utilizando o pacote 16 (MILLER et al., 2016).

Tabela 5 – Valores de energia livre de ligação obtidos para o sistema em estudo

Protease	ΔE_{ele}	ΔE_{vdW}	ΔG_{polar}	$\Delta G_{n\grave{a}opolar}$	ΔG_{lig}
Nativa	-54,79	-60,50	50,67	-115,30	-64,62
Mutante	-54,32	-63,27	48,81	-117,59	-68,77

Fonte: Autoria Própria *Valores em kcal/mol.

As interações que favorecem a ligação do Darunavir com a proteína são as interações não-polares ($\Delta G_{n\grave{a}opolar}$) e principalmente as interações de *Van de Waals* (ΔE_{vdW}). Apesar das interações eletrostáticas (ΔE_{ele}) também serem favoráveis a interação do ligante com a proteína, essas interações são contrabalanceadas pela energia de solvatação polar que é mais forte e desfavorável (ΔG_{polar}), gerando uma interação polar total desfavorável ($\Delta G_{ele+polar}$).

Quando comparadas as energias de ligação, interação não polar e de *Van de Waals* dos sistemas em estudo notamos que o sistema da protease mutante (ΔG_{lig} -68,77, $\Delta G_{n\grave{a}opolar}$ -117,59, ΔE_{vdW} -63,27) apresentou-se levemente mais estável que o sistema da protease nativa (ΔG_{lig} -64,62, $\Delta G_{n\grave{a}opolar}$ -115,30, ΔE_{vdW} -60,50) (Tabela 5).Kosisek et al. (2014) após a análise de variantes de proteases mutantes verificou uma energia de ligação ligeiramente menos estável para as mesmas,e propôs que existe um tipo de compensação, onde, quandoas PR20 apresentam valores de energias entálpicas menos favorável as contribuições entrópicas se apresentam mais favoráveis trazendo um certo equilíbrio entres as contribuições de energia entrópica e entálpica dos sistemas.

Em nosso estudo ao contrário do que foi mostrado por Kosisek et al. (2014) a energia de ligação da mutante (ΔG_{lig} -68,77) obteve um valor menor que o da nativa (ΔG_{lig} -64,62), o que denota um melhor perfil de estabilidade para a mutante. Vale lembrar que o inibidor

darunavir foi um fármaco estruturalmente planejado para suportar um maior número de mutações sem desenvolver resistência procurando se adaptar de melhor maneira ao seu sítio de ligação (CLOTET et al., 2007).

4.5 ANÁLISE DE ENERGIA DE DECOMPOSIÇÃO POR RESÍDUO

Os resultados dos cálculos de MM-GBSA, quando comparamos o sistema das proteases nativa e mutante, demonstraram perdas e ganhos de interações que ocorrem dos dois sistemas em estudo. Nas figuras abaixo estão as interações de *Van der Waals* mais relevantes para os sistemas (Figuras 22 e 23).

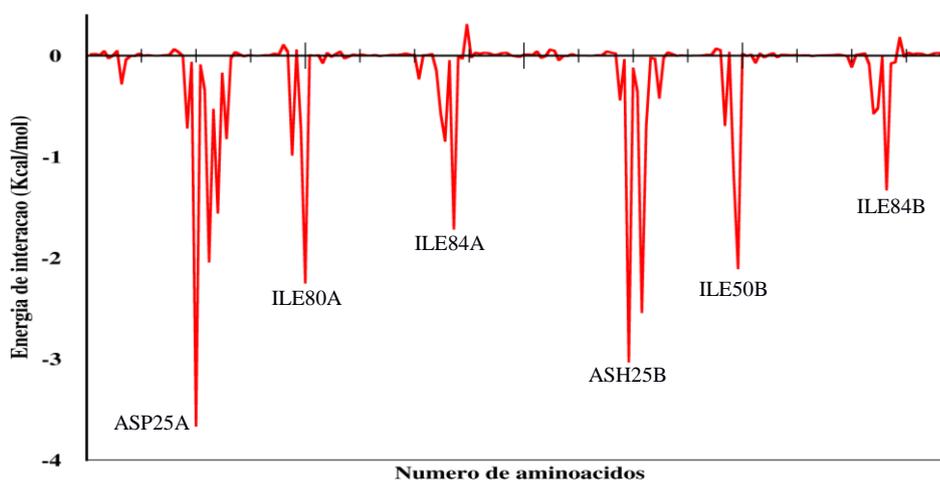


Figura 22 - Interações de *Van de Waals* por resíduo da protease nativa. Fonte: Autoria Própria.

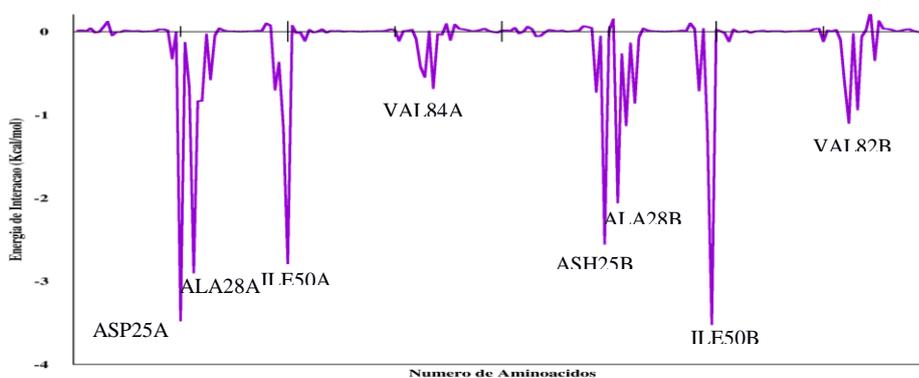


Figura 23 - Interações de *Van de Waals* por resíduo da protease mutante. Fonte: Autoria Própria.

Na tabela 6 estão listados mais detalhadamente os resíduos com as interações mais estáveis para cada sistema estudado.

Tabela 6- Resíduos com energias de interação mais estáveis para sistemas 4LL3 e 3UCB.

4LL3 Nativa			3UCB Mutante		
Posição	Resíduo	Energia	Posição	Resíduo	Energia
8	ARG	-0.276	23	LEU	-0.326
23	LEU	-0.712	25	ASP	-3.473
25	ASP	-3.660	28	ALA	-2.898
28	ALA	-2.037	32	ILE	-0.576
30	ASP	-1.553	47	VAL	-0.701
32	VAL	-0.817	50	ILE	-2.786
47	ILE	-0.980	54	LEU	-0.111
50	ILE	-2.245	76	LEU	-0.111
76	LEU	-0.227	82	VAL	-0.546
82	VAL	-0.843	84	VAL	-0.680
84	ILE	-1.711	88	ASP	-0.103
122	LEU	-0.435	122	LEU	-0.726
124	ASH	-3.026	124	ASH	-2.552
127	ALA	-2.537	127	ALA	-2.056
146	ILE	-0.686	129	ASN	-1.129
148	GLY	-1.178	131	ILE	-0.857
149	ILE	-2.103	149	ILE	-3.518
180	PRO	-0.571	175	LEU	-0.119
183	ILE	-1.324	181	VAL	-1.100
-	-	-	183	VAL	-0.938
-	-	-	187	ASP	-0.345

Fonte: Autoria Própria. *Valores em kcal/mol ** Em vermelho estão as energias de menor energia.

Os resíduos que apresentaram diferenças de energias mais expressivas quando comparadas as proteases nativa e mutante foram Asp25A, Ala28A, Ile50A, Ile84A, Ash5B, Ala28B e Ile50B. A perda de interação mais relevante que ocorreu na mutante ocasionada por uma mutação se deu no resíduo Ile84A, que na nativa apresentou uma energia de interação de -1.711kcal/mol e na mutante esse valor aumentou para -0.680, o que representa uma energia

de interação menos estável para este resíduo. Em contrapartida os resíduos Ala28A, Ile50A e Ile50B apresentaram valores de energia mais favoráveis na mutante, sendo eles de -2.898kcal/mol, -2.786kcal/mol e -3.518kcal/mol, respectivamente.

No estudo de Kosisek et al. (2014) observaram resultados que demonstraram a perda de interação de hidrogênio e de *Van de Waals* entre as PR20 analisadas por eles e o darunavir, sendo necessário o acúmulo de mais de 20 mutações para tornar a protease do HIV-I menos sensível ao inibidor. Diferente do se esperava, no estudo realizado observou-se uma maior quantidade de energias de interação de *Van de Waals* favoráveis para o darunavir complexado com a protease mutante, compensando a perda na energia de interação com os resíduos mutados.

Embora na clínica, as mais de 20 mutações acumuladas na protease do HIV-I tornem esta enzima menos sensível a inibição pelo ligante darunavir, e outros estudos de dinâmica molecular tenham evidenciado a perda de interação entre as PR20 e o darunavir, este perfil resistência não foi observado no estudo aqui realizado, pois o ligante se manteve estável dentro do sítio ativo da mutante e nossos resultados de energias de interação indicam a estabilidade do sistema.

Muitos fatores podem ter influenciado nos resultados obtidos desde os métodos de cristalografia utilizados nos PDBs que foram escolhidos para realizarmos o estudo, os protocolos computacionais aplicados e também a ausência de da mutação I50L, a qual é bastante associada ao desenvolvimento de resistência ao inibidor darunavir por seu impacto na conformação da região do *flap* da enzima.

Cabe agora realizar novas análises com diferentes enzimas PR20 e comparar os resultados para corroborar as informações obtidas neste estudo. Também cabe conduzir uma nova análise sobre os impactos das mutações de forma isolada para observamos se existe uma mutação chave que desencadeie um maior perfil de resistência ao inibidor darunavir

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo podemos concluir que:

- i. A protease 3UCB possui 21 mutações na cadeia A e 21 mutações na cadeia B, nas mesmas posições, são simétricas;
- ii. As mutações encontradas na protease 3UCB (referência protease 4LL3) foram: Q7K, L10F, I13V, I15V, D30N, V32I, L33F, E35D, M36I, I47V, I54L, Q58E, I62V, L63P, C67A, A71V, I84V, N88D, L89T, L90M, C95A;

- iii. Não foi detectada a presença da mutação na posição I50 na protease mutante PR 20 - 3UCB,
- iv. A ausência de da mutação I50L pode ter influenciado na manutenção das interações entre a PR20 e o inibidor darunavir;
- v. A análise de RMSF não mostrou grandes variações estruturais por parte do complexo mutante em relação a nativa. As análises de interação de hidrogênio e interações de *Van de Waals* também apresentaram um perfil levemente mais estável para o complexo mutante.
- vi. Não foi observada perda de interação a PR20 e o darunavir no estudo aqui realizado; O complexo da protease do HIV-1 mutante 3UCB apresentou um perfil de ligação ligeiramente mais estável que complexo da protease do HIV-1 nativa 4LL3, com resultados de energia livre de ligação -68,77 e -64,62 kcal/mol, respectivamente.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARNOUTSE, R. E., WISSEN, C. P. W. G. M. V., UNDERBERG, W. J. M., KLEINNIJENHUIS, J., HEKSTER, Y. A., BURGER, D. M. High-performance liquid chromatography of protease inhibitors in human biological matrices. *Journal of Chromatography B*, 764: 363-384, 2001.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBBER, J. S. *Imunologia Celular e Molecular*. 4º ed. Revinter, 2003, p. 454-467.
- AGNISWAMY, J. et al. HIV-1 Protease with 20 Mutations Exhibits Extreme Resistance to Clinical Inhibitors through Coordinated Structural Rearrangements, *Biochemistry*, v.51, p.2819–2828, 2012.
- ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. *Computer simulation of liquids*, Oxford University Press, New York, 1987.
- ALONSO, H.; BLIZNYK, A. A.; GREASY, J. E. Combining Docking and Molecular Dynamic Simulations in Drug Design. *Med. Res. Rev.*, v.26, n.5, p.531-568, 2006.
- ARAÚJO, A., SHEEHY, N., TAKAHASHI, H., HALL, W.W. Concomitant infections with human immunodeficiency virus type 1 and human T-lymphotropic virus types 1 and 2. In: *Polymicrobial Diseases*. Brogden, K.A., Guthmiller, J.M. (eds). Washington, ASM Press, 2002. p. 75-97.
- BAKER, N. A. Improving implicit solvent simulations: a Poisson-centric view. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, v.15, p.137-146, 2005.
- BEEMAN, D. Some multistep methods for use in molecular dynamics calculations. *J. Comput. Phys.*, v.20, n.2, p.130-139, 1976.
- BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; VAN GUNSTEREN, W. F.; DINOLA, A.; HAAK, J.R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *Molecular dynamics with coupling to an external bath*. *J. Chem. Phys.*, v.81, p.3684, 1984.
- BIZZARRI, A. R.; CANNISTRARO, S. Molecular Dynamics of Water at the Protein–Solvent Interface. *J. Phys. Chem.*, v.106, n.26, p.6617-6633, 2002.
- BLANCO, J., BARRETINA, J., CABRERA, C., GUTIÉRREZ, A., BONAVENTURA, C., ESTE, J.A. CD4+ and CD8+ T cell death during human immunodeficiency virus infection in vitro. *Virology*, 285: 356-365, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico AIDS e DST, Ano IX nº 1. Brasília: MS, 2012. p. 25.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos. 2015. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao>>. Acesso em 10 de jan de 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Recomendações para Terapia Anti-Retroviral em Adultos Infectados pelo HIV 2008. 7ª edição. Brasília: MS, 2008. p. 244.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos. 2015. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao>>. Acesso em 10 de jan de 2017.

BRIK, A.; WONG, C.-H. HIV-1 protease: mechanism and drug discovery. **Org. Biomol. Chem.**, v. 1, n.5, p.29, 2003.

BRUNTON, L. L. et al. Goodman & Gilman: manual de farmacologia e terapêutica. Porto Alegre. AMGH, 2010.

BURKERT, U.; ALLINGER, N. L. Molecular Mechanics, ACS Monograph 177, American Chemical Society, Washington, D. C., p.64-72, 1982.

CASE, D.A.; BEN-SHALOM, I.Y.; BROZELL, S.R., et al. AMBER 2018, University of California, San Francisco, 2018.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Kaposi's sarcoma and pneumocystis pneumonia among homosexual men-New York City and California. Morbidity and Mortality Weekly Report, 30: 305-308, 1981b.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Pneumocystis pneumonia - Los Angeles. Morbidity and Mortality Weekly Report, 30: 250-252, 1981a.

CHEATHAM, T. E.; MILLER, J. L.; FOX, T.; DARDEN, T. A.; KOLMAN, P. A. Molecular Dynamics Simulations on Solvated Biomolecular Systems: The Particle Mesh Ewald Method Leads to Stable Trajectories of DNA, RNA, and Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, v.117, n.14, p.4193-4194, 1995.

CHEN, L.; PERLINA, A.; LEE, C. J. Positive Solution Detection in 40000 Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 Sequences Automatically Identifies Drug Resistance and Positive Fitness Mutations in HIV Protease and Reverse Transcriptase. *Journal of Virology*, v.78, n.7, p.3722-3732, 2004.

COFFIN, J. M. Retroviridae: The Viruses and Their Replication. In: *Fundamental Virology*. Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M. (eds.). Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996. p.763-843.

CUNICO, W; GOMES, C. R. B.; VELLASCO JUNIOR, W. T. HIV- Recentes Avanços na pesquisa de fármacos. *Quim. Nova*, v.31, n.8, p.2111-2117, 2008.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.*, v.98, n.12, p.10089, 1993.

DE CLERCQ, E. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the Discovery of HIV. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.33, p.307-320, 2009.

DE CLERCQ, E. Antiretroviral drugs. *Current Opinion in Pharmacology*, v.10, p.507-515, 2010.

DE MELO, E. B.; BRUNIA, A. T.; FERREIRA, M. M. C. Inibidores da HIV-Integrase: Potencial abordagem farmacológica para o tratamento da AIDS. *Quim. Nova*, v. 29, n.3, p.555-562, 2006.

DELWART, E.L., MULLINS, J.I., GUPTA, P., JR, L.G.H., HOLODNIY, M., KATZENSTEIN, D., WALKER, B.D., SINGH, M.K. Human immunodeficiency virus type 1 in blood and semen. *Journal of Virology*, 72: 617- 623, 2000.

DEWDNEY, T. G., WANG, Y., ZHIGANG, L., SHARMA, S.K., REITER, S. J., BRUNZELLE, J. S., KOVARI, I. A., WOSTER, P. M., KOVARI, L. C. Ligand modifications to reduce the relative resistance of multi-drug resistant HIV-1 protease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.21, p.7430-7434, 2013.

DORSEY B. D.; VACCA, J. P. Em *Protease Inhibitors in AIDS Therapy*; OGDEN, R. C.; FLEXNER, C. W., ed. **Marcel Dekker Inc.: New York**, cap.4, 2001.

ESSMANN, U.; PERERA, L.; BERKOWITZ, M. L.; DARDEN, T.; LEE, H.; PEDERSEN, L. G. A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.*, v.103, n. 19, p.8577-8593, 1995.

FERRARA, P.; APOSTOLAKIS, J.; CAFLISCH, A. Evaluation of a fast implicit solvent model for molecular dynamics simulations. *Proteins Struct. Funct. Genet.*, v.46, n.1, p.24, 2002.

FERREIRA, A. S.; CARDOSO, L. P. V.; STEFANI, M. M. A. Moderate Prevalence of Transmitted Drug Resistance and High HIV-1 Genetic Diversity in Patients From Mato Grosso State, Central Western Brazil. *J. Med. Virol.*, v.83, p.1301-1307, 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. HIV/AIDS – Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection, 2011. Disponível em:
<<http://www.fda.gov/ForConsumers/ByAudience/ForPatientAdvocates/ucm076940.htm>>. Acesso em: 01/08/2017.

FRENKEL, D.; SMIT, B. *Understanding Molecular Simulations: from Algorithms to Applications*, Academic Press, London, 2nd edn., 2002.

GRÄF, A.; PASSAES, C. P. B.; FERREIRA, L. G. E., GRISARD, E. C.; MORGADO, M. G.; BELLO, G.; PINTO, A. R. HIV-1 genetic diversity and drug resistance among treatment naïve patients from Southern Brazil: Na association of HIV-1 subtypes with exposure categories. *Journal of Clinical Virology*, v.51, p.186-191, 2011.

HOCKEY, R. W.; EASTWOOD, L. W. *Computer Simulation using Particles*, McGraw-Hill, New York, 1981.

- HOCKNEY, R. W. The potential calculation and some applications. *Methods Comput. Phys.*, v.9, p.136-211, 1970.
- HOOVER, W. G. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Phys. Rev.*, v.31, n.3, p.1695, 1985.
- HUANG, H., CHOPRA, R., VERDINE, G.L., HARRISON, S.C. Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science*, 282: 1669-1675, 1998.
- HUANG, K. *Statistical Mechanics*, Wiley John & Sons, New York, 2nd edn, 1990.
- IST-AIDS Portal sobre aids, infecções sexualmente transmissíveis e hepatites virais: Banco de Dados. Disponível em: <www.aids.gov.br>. Acesso em 01/09/2016.
- JETZT, A. E., YU, H., KLARMANN, G. J., RON, Y., PRESTON, B. D., DOUGHERTY, J. P. High rate of recombinations throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *Journal of Virology*, v.74, n.3, p.1234-1240, 2000.
- JORGENSEN, W. L.; CHANDRASEKHAR, J.; MADURA, J. D.; IMPEY, R. W.; KLEIN, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.*, v.79, n.2, p.926, 1983.
- KANKI, P. J., HAMEL, D. J., SANKALÉ, J., HSIEH, C., THIOR, I., BARIN, F., WOODCOCK, S. A., GUËYE-NDIAYE, A., ZHANG, E., MONTANO, M., SIBY, T., MARLINK, R., NDOYE, I., ESSEX, M. E., MBOUP, S. Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression. *Journal of Infectious Diseases*, v.179, p.68-73, 1999.
- KASHUBA, A.D.M., DYER, J.R., KRAMER, L.M., RAASCH, R.H., ERON, J.J., COHEN, M.S. Antiretroviral-drug concentrations in semen: implications for sexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.43, p.1817-1826, 1999.
- KOTOV, A., ZHOU, J., FLICKER, P., AIKEN, C. Association of Nef with the human immunodeficiency virus type 1 core. *Journal of Virology*, v.73, p.8824-8830, 1999.
- KOZISEK, M. et al. Thermodynamic and structural analysis of HIV protease resistance to darunavir – analysis of heavily mutated patient-derived HIV-1 proteases. *FEBS Journal*, v.281, p.1834–1847, 2014.
- KRAL, A.H., BLUTHENTHAL, R.N., LORVICK, J., GEE, L., BACCHETTI, P., EDLIN, B.R. Sexual transmission of HIV-1 among injection drug users in San Francisco, USA: risk-factor analysis. *Lancet*, v.357, p.1397-1401, 2001.
- LEACH, A. R. *Molecular Modelling Principles and Applications*, Addison Wesley Longman, Essex, England, 1996.
- LIU, Z., YEDIDI, R. S., WANG, Y., DEWDNEY, T. G., REITER, S.J., BRUNZELLE, J. S., KOVARI, I. A., KOVARI, L. C. Crystallographic study of multi-drug resistant HIV-1

- protease lopinavir complex: Mechanism of drug recognition and resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.437, p.199-204, 2013.
- LUCIWI, P. A. Human immunodeficiency viruses and their replication. In: *Fundamental Virology*. Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M. (eds.). LippincottRaven, Philadelphia, 1996. p.845-916.
- MACÊDO, O.; FERREIRA, L. M.; VASCONCELOS, P. F. C.; SOUSA, R. C. M.; FREITAS, C. A.; ARAÚJO, J. R. M. Genotipagem da resistência genotípica secundária aos antirretrovirais em pacientes com aids nos Estados dos Pará e Amazonas, Brasil: 2002 a 2006. *Ver. Pan-Amaz. Saúde*, v.2, n.3, p.27-34, 2011.
- MENÉNDEZ-ARIAS, L. Molecular basis of human immunodeficiency virus Drug resistance: An update. *Antiviral Research*, v.85, n.1, p.210-231, 2010.
- NOSÉ, S. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Mol. Phys.*, v.52, p.255-268, 1984.
- PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appli. Phys.*, v.52, n.12, p.7182-7190, 1981.
- PEDRAZA, M.A., ROMERO, J., ROLDÁN, F., GARCÍA, S., AYERBE, M.C., NORIEGA, A.R., ALCAMÍ, J. Heterosexual transmission of HIV-1 is associated with high plasma viral load levels and a positive viral isolation in the infected partner. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 21: 120-125, 1999.
- RAFFANTI; HAAS. Antimicrobianos: Anti-Retrovirais. In: *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Hardman, J. G., Limbird, L. E., Gilman, A. G. (eds). 10a ed. Rio de Janeiro, Mc Graw Hill, 2003. p. 1011-1033.
- REDDY, G. S. K. K.; ALI, A.; NALANA, M. N. L.; ANJUM, S. G.; CAO, H.; NATHANS, S. R.; SCHIFFER, C. A.; RANA, T. M. Design and Synthesis of HIV-1 Protease Inhibitors Incorporating Oxazolidinones as p2/p2' Ligands in Pseudosymmetric Dipeptide Isosteres. *Journal of Medical Chemistry*, v.50, n.18, p.1-33, 2007.
- ROUX, B.; SIMONSON, T. Biophys. Implicit solvent models. *Biophys. Chem.*, v.78, p.1-20, 1999.
- SANTOS, L. A.; MONTEIRO-CUNHA, J. P.; ARAUJO, A. F.; BRITES, C.; GALVAO-CASTRO, B.; ALCANTARA, L. C. J. Detection of Distinct Human Immunodeficiency Virus Type 1 Circulating Recombinant Forms in Northeast Brazil. *J. Med. Virol.*, v.83, p.2066-2072, 2011.
- SANTOS, M. L. A.; ALBUQUERQUE, M. C.; BRITO, M. A. Integrase: um no alvo terapêutico importante no combate a infecção HIV/AIDS. *Ver. Virtual Quim.*, v.4, n.6, p.937-954, 2014.
- SCOTT, W. R. P.; SCHIFFER, C. A. Curlingof flap tips in HIV-1 protease as a mechanism for substrateentryandtoleranceofdrugresistance. **Structure**, n.8, p.1259, 2000.
- SHEN, C. H.; CHANG, Y. C.; AGRISWANY, J.; HARRISON, R. W.; WEBER, I. T. Conformational Variation of an Extreme Drug Resistance Mutant of HIV Protease. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, v.62, p.87-96, 2015.
- STANFORD HIV drug resistance database. Disponível em: <<http://hivdb.stanford.edu/pages/drugSummaries.html>>. Acessoem: 16 jan. 2017.
- STERLING, T.R., VLAHOV, D., ASTEMBORSKI, J., HOOVER, D.R., MARGOLICK, J.B., QUINN, T.C. Initial plasma HIV-1 RNA levels and progression to AIDS in women and men. *New England Journal of Medicine*, v.344, p.720-725, 2001.
- STILLINGER, F. H.; RAHMAN, A. Improved Simulation of Liquid Water by Molecular Dynamics. *J. Chem. Phys.* v.60, p.1545-1557, 1974.

TIRONI, I. G.; SPERB, R.; SMITH, P. E.; VAN GUNSTEREN, W. F. J. A generalized reaction field method for molecular dynamics simulations. *J. Chem. Phys.*, v.102, n.13, p.6199, 1995.

TÓTH, G.; BORICS, A. Closing of the flaps of HIV-1 protease induced by substrate binding: a model of a flap closing mechanism in retroviral aspartic proteases. *Biochemistry*, v.45, p.6606-6614, 2006.

TURNER, B.G., SUMMERS, M.F. Structural biology of HIV. *Journal of Molecular Biology*, v.285, p.1-32, 1999.

UNAIDS. AIDS is not over, but it can be. AIDS by the numbers. 2016, p. 3-5. Disponível em: www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/AIDS-by-the-numbers-2016_en.pdf. Acesso em 15/01/2017.

UNAIDS/WHO. Global Report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2012. 2012. 105p.

VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Moleküldynamik-Computersimulationen; Methodik, Anwendungen und Perspektiven in der Chemie. *Angew. Chem.*, v.102, n.9, p.1020-1055, 1990.

VELASCVO-DE-CASTRO, C. A.; GRINSZTEJN, B.; VELOSO, V. G.; BASTOS, F. I.; PILOTTO, J. H.; FERNANDES, N.; MORGADO, M. G. HIV-1 Diversity and Drug Resistance Mutations among People Seeking HIV Diagnosis in Voluntary Counseling and Testing Sites in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS ONE*, v.9, n.1, p.87622, 2014.

VERLET, L. Computer "Experiments" on Classical Fluids I Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Phys. Rev.*, v.159, n.1, p.98.103, 1967.

WU, X., LIU, H., XIAO, H., KAPPES, J.C. Proteolytic activity of human immunodeficiency virus Vpr- and Vpx-protease fusion proteins. *Virology*, 219: 307-313, 1996.

WYATT, R., SODROSKI, J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science*, v.280, p.1884-1888, 1998.

YEDIDI, R. S., PROTEASA, G., MARTIN, P. D., LIU, Z., VICKREY, J. F., KOVARI, I. A., KOVARI, L. C. A multi-drug resistant HIV-1 protease is resistant to the dimerization inhibitory activity of TLF-PafF. *Journal of Graphics and Modelling*, v.53, p.105-111, 2014.

ZHA, W.; ZHA, B. S.; ZHOU, F.; ZHOU, H.; WANG, G. The cellular pharmacokinetics of HIV protease inhibitors: current knowledge and future perspectives. *Current Drug Metabolism*, v.13, n.8, p.1174-1183, 2012.

ZHOU, J., AIKEN, C. Nef enhances human immunodeficiency virus type 1 infectivity resulting from interviral fusion: evidence supporting a role for Nef at the virion envelope. *Journal of Virology*, v.75, p.5851-5859, 2001.

ZOU, X.; SUN, Y.; KUNTS, I. D. Inclusion of solvation in ligand binding free energy calculations using the generalized born model, *J. Am. Chem. Soc.*, v.121, p.8033-8043, 1999.

