

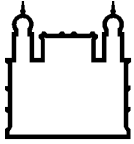
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação Biologia Computacional e Sistemas

AVALIAÇÃO *IN SILICO* DE NOVOS COMPOSTOS BIOATIVOS  
PARA O TRATAMENTO DA SÍNDROME DE IMUNODEFICIÊNCIA  
ADQUIRIDA HUMANA (AIDS): POTENCIAIS INIBIDORES DA  
TRANSCRIPTASE REVERSA (TR) DO HIV-1

VANESSA DOS SANTOS SILVA

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2015



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação Biologia Computacional e Sistemas**

*VANESSA DOS SANTOS SILVA*

Avaliação *in silico* de novos compostos bioativos para o tratamento da síndrome de imunodeficiência adquirida humana (AIDS): Potenciais inibidores da Transcriptase Reversa (TR) do HIV-1

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

**Orientador:** Prof. Dr. Ernesto Raúl Caffarena.

**RIO DE JANEIRO**  
Fevereiro de 2015

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S586 Silva, Vanessa dos Santos

Avaliação *in silico* de novos compostos bioativos para o tratamento da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida Humana (AIDS): potenciais inibidores da transcriptase reversa (Tr) do HIV-1 / Vanessa dos Santos Silva. – Rio de Janeiro, 2015.

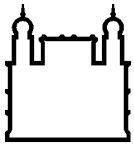
xvii, 140 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas, 2015.

Bibliografia: f. 106-114

1. Transcriptase reversa. 2. Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). 3. Docking molecular. 4. Dinâmica molecular. I. Título.

CDD 616.9792



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação Biologia Computacional e Sistemas**

***AUTOR: VANESSA DOS SANTOS SILVA***

**Avaliação *in silico* de novos compostos bioativos para o tratamento da  
síndrome de imunodeficiência adquirida humana (AIDS): Potenciais  
inibidores da Transcriptase Reversa (TR) do HIV-1**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Ernesto Raúl Caffarena.**

**Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**

### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Ana Carolina Ramos Guimarães. IOC/Fiocruz - Presidente e Revisor**

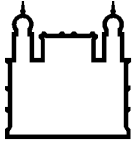
**Prof. Dra. Priscila Capriles. UFJF**

**Prof. Dr. Mauricio Garcia Costa. PROCC/Fiocruz**

**Prof. Dr. Gabriel Limaverde. INCA - Suplente**

**Prof. Dr. Floriano Paes Jr. IOC/Fiocruz - Suplente**

Rio de Janeiro, 11 de fevereiro de 2015



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.**

Dedico essa dissertação ao meu querido avô materno Moacyr (*in memoriam*). Cada conselho e toda forma de ajuda foi de grande importância. Obrigada por todo amor e incentivo que me deu.

## AGRADECIMENTOS

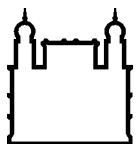
- Um agradecimento mais que especial aos meus pais, pelo suporte incondicional que me proporcionam em todos os momentos da minha vida, sempre me incentivando até nos momentos mais difíceis. Obrigada as minhas filhas caninas, Minnie, Dengosa, Jade e Magali.
- Meu sincero agradecimento e minha gratidão ao meu orientador Ernesto Raúl Caffarena pela orientação, paciência, atenção e ensinamentos durante a realização deste projeto.
- Aos amigos do GBCMM e do Grupo Crachá Azul, Janaina Cruz, Rafael Ferreira, Lucianna Helene, Deborah Antunes, Amanda Sutter, Felipe Durval, Gisele Vieira, Artur Brandt, André Torres, Lucas Machado, Vanessa Sinatti e Ricardo Espinosa (Shakira). Obrigada por toda ajuda!
- Aos pesquisadores Dr. Paulo Ricardo Batista e Dr. Mauricio Costa que sempre estiveram disponíveis.
- À Dr. Ana Carolina Guimarães, pela revisão da tese.
- Aos membros da banca, por terem gentilmente aceitado o convite para participar da avaliação desse trabalho.
- Ao Núcleo de Computação Científica da Universidade Estadual Paulista pela realização das simulações do programa Gaussian09.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro.
- A todos que direta ou indiretamente colaboraram para que esse trabalho se tornasse possível, meus mais sinceros agradecimentos.

*“Pois quando a sabedoria entrar no teu coração,  
e o conhecimento for agradável à tua alma,  
o bom siso te guardará e a inteligência te conservará”.*

*Provérbios 2:10-11*

**Bíblia Sagrada**





Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

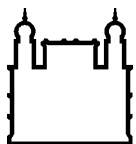
### AVALIAÇÃO *IN SILICO* DE NOVOS COMPOSTOS BIOATIVOS PARA O TRATAMENTO DA SÍNDROME DE IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA HUMANA (AIDS): POTENCIAIS INIBIDORES DA TRANSCRIPTASE REVERSA (TR) DO HIV-1

RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA COMPUTACIONAL E SISTEMAS

**Vanessa dos Santos Silva**

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida Humana (AIDS) é causada pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Existem dois tipos de vírus: HIV-1 e HIV-2, sendo o primeiro prevalente na maior parte do mundo. No ciclo biológico, o vírus utiliza três enzimas para a sua replicação: a Transcriptase Reversa (TR), a Integrase e a Protease. A TR é crucial no início do ciclo, dado que converte o RNA viral em DNA viral, se transformando em um alvo importante para o planejamento de novos inibidores. Os inibidores da TR disponíveis no mercado são limitados, tóxicos e apresentam diversos efeitos colaterais indesejáveis, o que favorece a interrupção do tratamento causando resistência aos medicamentos. Este fato ressalta a urgência de novos fármacos mais eficientes e menos agressivos. O objetivo deste estudo é avaliar o modo de ligação de oito compostos derivados de dois inibidores nucleosídeos conhecidos da TR, o Abacavir (ABC) e a Lamivudina (3TC). Para atingir este objetivo, utilizamos metodologias computacionais como, *Docking* Molecular, ADME-Tox e Dinâmica Molecular. As técnicas computacionais propostas oferecem informação estrutural sobre o reconhecimento molecular de complexos receptor-ligante permitindo a realização de experimentos de desenho racional de fármacos para a obtenção de novos compostos. A estrutura tridimensional da TR escolhida está disponível no banco de dados PDB em complexo com o Tenofovir, inibidor nucleotídeo da transcriptase reversa. Os resultados obtidos nos ajudam a propor os compostos 2 - (5 - chloro - 2 - acetamidophenyl) - N - [6 - (cyclopropylamino) - 9 - [3 - (hydroxymethyl) cyclopent - 1 - en -1 - yl] -1,6 - dihydropurin - 2 - yl] - 2,2 - difluoroacetamide e 2 - (2 - acetamidophenyl) - 2,2 - difluoro - N - {1 - [2 - (hydroxymethyl) - 1,3 - oxathiolan - 5 - yl] - 2 - oxopyrimidin - 4yl} acetamide análogos do Abacavir e da Lamivudina respectivamente, como os mais promissores. Paralelamente, foi identificado o modo de ligação da Lamivudina na TR por meio da Dinâmica Molecular, avaliando a evolução temporal de sua estrutura. A partir disso, torna-se possível analisar o modo de ligação de compostos que apresentem esse mesmo arcabouço.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **EVALUATION IN SILICO OF NEW BIOACTIVE COMPOUNDS FOR THE TREATMENT OF ACQUIRED IMMUNO DEFICIENCY SYNDROME (AIDS): POTENTIAL INHIBITORS OF REVERSE TRANSCRIPTASE (RT) OF HIV-1**

#### **ABSTRACT**

#### **MASTER DISSERTATION IN COMPUTATIONAL BIOLOGY AND SYSTEMS**

**Vanessa dos Santos Silva**

The Acquired Immuno Deficiency Syndrome (AIDS) is caused by the human immunodeficiency virus (HIV). There are two types of virus: HIV-1, the most predominant in the world, and HIV-2. The HIV-1 cycle involves the use of three enzymes for its replication: reverse transcriptase, integrase and protease. The reverse transcriptase enzyme converts viral RNA into viral DNA, a crucial step in the beginning of the cycle, making it an important target for the design of new inhibitors. The reverse transcriptase inhibitors available on the market are limited, toxic and have many undesirable side effects, which favors interruption of treatment cause resistance in drugs. These facts highlight the urgent need for new, more efficient and less harmful drugs. The aim of this study is to evaluate the binding mode of eight analogues compounds derived from two known nucleoside reverse transcriptase inhibitors, Abacavir and Lamivudine. To achieve this, we use the computational methods of molecular docking, ADME-Tox and molecular dynamics. The proposed computational techniques provide structural information about the receptor-ligand complex molecular recognition, allows the achievement the rational drug design experiments to obtain novel compounds. The three-dimensional structure of the TR chosen available in PDB database in complex with Tenofovir, a known nucleotide reverse transcriptase. The results obtained help us to propose the compounds 2 - (5 - chloro - 2 - acetamidophenyl) - n - [6-(cyclopropyl amino) - 9 - [3 -hydroxymethyl) cyclopent - 1 - en - 1 - yl] - 1,6 - dihydropurin - 2 - yl] - 2,2 - difluoroacetamide and 2 - (2 - acetamidophenyl) - 2,2 - difluoro - n - {1 - [2 - (hydroxymethyl) - 1,3 -oxathiolan - 5 - yl] - 2 - oxopyrimidin4yl} acetamide Abacavir and Lamivudine analogues, respectively, as the most promising. At the same time, was analyzed the binding mode of Lamivudine through molecular dynamics to assess the evolution of her structure. From this, it becomes possible to analyzed the binding mode of compounds that have the same scaffold.

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>1.1. AIDS/HIV</b> .....	<b>18</b>
1.1.1. Histórico .....	18
1.1.2. Epidemiologia do HIV.....	19
1.1.3. Estrutura do HIV .....	21
1.1.4. Ciclo biológico do HIV .....	24
1.1.5. Infecção e tratamento do HIV .....	26
1.1.6. Estrutura molecular da Transcriptase reversa .....	31
1.1.7. Mecanismos de resistência dos NRTIs .....	34
<b>1.2. Modelagem Molecular no Desenvolvimento de Fármacos</b> .....	<b>36</b>
1.2.1. Docagem Molecular (Docking Molecular) .....	37
1.2.2. Estudos de ADME-Tox.....	39
1.2.3. OSIRIS Property Explorer .....	43
1.2.4. Molinspiration Property Calculator .....	44
1.2.5. Superpred Web Server .....	45
1.2.6. ProTox .....	46
1.2.7. Mcule .....	47
1.2.8. Chemicalize .....	48
1.2.9. Parametrização dos ligantes.....	48
1.2.10. Dinâmica Molecular.....	49
<b>1.3 Justificativa</b> .....	<b>50</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>52</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>53</b>
<b>3.1. Docking Molecular</b> .....	<b>53</b>
3.1.1. Preparação do receptor .....	54
3.1.2. Preparação dos ligantes .....	54
3.1.3. Grade de simulação .....	56
3.1.4. Docking.....	57
<b>3.2. Predição de propriedades ADME-Tox</b> .....	<b>59</b>
<b>3.3. Parametrização do ligante 3TC (Lamivudina)</b> .....	<b>60</b>
<b>3.4. Dinâmica Molecular</b> .....	<b>62</b>

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>64</b>
<b>4.1. Docking Molecular</b> .....	<b>64</b>
4.1.1. Redocking .....	64
4.1.2. Cross-Docking .....	67
4.1.3. Simulações de Docking.....	69
<b>4.2. Predição de propriedades ADME-Tox</b> .....	<b>79</b>
4.2.1. Osiris Property Explorer .....	80
4.2.2. Molinspiration Property Calculator .....	81
4.2.3. Superpred Web Server .....	83
4.2.4. ProTox .....	84
4.2.5. Mcule .....	85
4.2.6. Chemicalize .....	86
4.2.7. Análise dos programas/servidores de ADME-Tox .....	88
<b>4.3. Parametrização do 3TC</b> .....	<b>88</b>
<b>4.4. Dinâmica Molecular</b> .....	<b>93</b>
4.4.1. Simulações de Dinâmica Molecular do 3TC .....	93
4.4.2. Análise do RMSD do 3TC .....	95
4.4.3. Análise das ligações de hidrogênio.....	96
4.4.4. Análise da flexibilidade dos resíduos do sítio.....	98
4.4.5. Análise da energia de interação intermolecular .....	102
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>105</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>107</b>
<b>ANEXO A – ARQUIVOS DE ENTRADA PARA SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR</b>	<b>117</b>
<b>ANEXO B – MAPAS DE INTERAÇÕES DOS COMPOSTOS REFERENTE AO PRIMEIRO PROCEDIMENTO DE DOCKING</b>	<b>129</b>
<b>ANEXO C – MAPAS DE INTERAÇÕES DOS COMPOSTOS REFERENTE AO SEGUNDO PROCEDIMENTO DE DOCKING</b>	<b>133</b>
<b>ANEXO D – MAPAS DE INTERAÇÕES DOS COMPOSTOS REFERENTE AO TERCEIRO PROCEDIMENTO DE DOCKING</b>	<b>137</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estimativa do número de pessoas infectadas no mundo, segundo a UNAIDS.....	20
Figura 2: Distribuição percentual de casos de AIDS por região. ....	21
Figura 3: Estrutura morfológica do HIV.....	22
Figura 4: Classificação do HIV-1 de acordo com os grupos, subtipos e a prevalência.....	23
Figura 5: Classificação do HIV-2 de acordo com os grupos, subtipos e a prevalência.....	24
Figura 6: Ciclo de vida do HIV. ....	26
Figura 7: Representação da enzima TR.....	32
Figura 8: Alinhamento das estruturas da TR .....	33
Figura 9: Visualização do sítio da polimerase com o TNV.....	35
Figura 10: Estruturas do ABC e seus derivados análogos.....	55
Figura 11: Estruturas do 3TC e seus derivados análogos.....	56
Figura 12: Representação da <i>grid</i> de (10Å) na TR.....	56
Figura 13: Fluxograma do processo de parametrização.....	61
Figura 14: Visualização do <i>redocking</i> do TNV. ....	64
Figura 15: (a) Mapa de interação do TNV cristalográfico e do TNV <i>redocado</i> . .....	65
Figura 16: Visualização do <i>redocking</i> do AZT. ....	66
Figura 17: (a) Mapa de interação do AZT cristalográfico e (do AZT <i>redocado</i> .....	66
Figura 18: Pose do AZT (Amarelo) e do TNV (verde), ambos na estrutura 1T05 com um RMSD de 1.9 Å. ....	67
Figura 19: Mapas de interações do TNV cristalográfico, (b) mapa de interações do AZT na estrutura 1T05. ....	68
Figura 20: Alinhamento do AZT cristalográfico (PDB ID 3V4I) e do AZT <i>redocado</i> na 1T05. ....	69
Figura 21: Representação da comparação do composto 3 comparado com o TNV cristalográfico.....	71
Figura 22: Mapa de interação do composto 3 no sítio da TR. ....	71
Figura 23: Representação da comparação do composto 1 com o TNV.....	73
Figura 24: Representação da comparação do composto 3 com o TNV.....	74

<b>Figura 25: Mapa de interações do composto 3 com os resíduos do sítio ativo da TR. ....</b>	<b>75</b>
<b>Figura 26: Representação da comparação com a pose do composto 6 com o TNV. ....</b>	<b>76</b>
<b>Figura 27: Mapa de interações do composto 6 com os resíduos do sítio ativo da TR. ....</b>	<b>76</b>
<b>Figura 28: Representações das interações com os aminoácidos do Composto 5 e do AZT.....</b>	<b>77</b>
<b>Figura 29: Representações do composto 5 comparando com o TNV .....</b>	<b>78</b>
<b>Figura 30: Estruturas do 3TC. ....</b>	<b>89</b>
<b>Figura 31: Representação do composto 3TC interagindo com a água TIP3P. ....</b>	<b>90</b>
<b>Figura 32: Representações em CPK dos diedros do 3TC.....</b>	<b>92</b>
<b>Figura 33: Estrutura do complexo TR- ligante com uma camada de solvatação.....</b>	<b>94</b>
<b>Figura 34: Visualização do 3TC e do íon <math>Mg^{+2}</math> na TR. ....</b>	<b>95</b>
<b>Figura 35: Gráfico do RMSD do ligante 3TC.....</b>	<b>96</b>
<b>Figura 36: Formação de ligações de hidrogênio entre o 3TC com os resíduos vizinhos ao longo da simulação.....</b>	<b>97</b>
<b>Figura 37: Porcentagem em diferentes tempos que os resíduos formaram ligação hidrogênio com o ligante.....</b>	<b>97</b>
<b>Figura 38: Visualização do 3TC com os resíduos num raio de 4 Å do 3TC... ..</b>	<b>99</b>
<b>Figura 39: RMSD dos resíduos num raio de 4Å do 3TC.....</b>	<b>100</b>
<b>Figura 40: RMSD dos resíduos num raio de 4Å do 3TC.....</b>	<b>101</b>
<b>Figura 41: Valores médios de RMSD dos resíduos vizinhos do 3TC localizados a 4 Å.....</b>	<b>102</b>
<b>Figura 42: Gráfico da energia de interação do 3TC com a TR.....</b>	<b>103</b>
<b>Figura 43: Valores de distância do íon <math>Mg^{+2}</math> com os oxigênios .....</b>	<b>104</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Medicamentos NRTI disponíveis no mercado .....	29
Tabela 2. Relação das estruturas dos NRTIs. ....	30
Tabela 3. Relação de alguns programas de <i>Docking</i> . ....	39
Tabela 4. Classificação dos compostos de acordo com os parâmetros de saída do programa Glide.....	70
Tabela 5. Relação dos compostos de acordo com os parâmetros de saída do programa Glide. ....	73
Tabela 6. Relação dos compostos de acordo com os parâmetros de saída do programa Glide. ....	78
Tabela 7. Relação dos compostos-protótipos de acordo com os parâmetros do OSIRIS.....	80
Tabela 8. Relação dos compostos-protótipos segundo o risco toxicológico. ....	81
Tabela 9. Relação dos compostos de acordo as características físico-químicas do programa <i>Molinspiration</i> .....	82
Tabela 10. Relação dos compostos de acordo com o <i>score</i> de bioatividade do programa <i>Molinspiration</i> . ....	82
Tabela 11. Relação dos compostos de acordo com as propriedades físico-químicas do servidor Superpred.....	83
Tabela 12. Relação dos compostos de acordo com a predição de ATC. ....	83
Tabela 13. Relação dos compostos quanto às propriedades físico-químicas, segundo o ProTox. ....	84
Tabela 14. Classificação dos compostos de acordo com a predição toxicológica.....	85
Tabela15. Relação dos compostos quanto aos parâmetros da regra de Lipinski, segundo o Mcule.....	86
Tabela 16. Relação dos compostos de acordo com o <i>Chemicalize</i> .....	87
Tabela 17. Relação dos compostos de acordo com os filtros de biodisponibilidade oral. ....	87
Tabela 18. Relação dos átomos do 3TC de acordo com a carga inicial e com a carga final.....	91
Tabela 19: Relação dos diedros do 3TC com o <i>root-mean-square error</i> (RMSE).....	92

**Tabela 20: Relação dos átomos que realizam ligação de hidrogênio..... 98**



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABC	Abacavir
ADME-Tox	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARVs	Medicamentos antirretrovirais
AZT	Zidovudina
CGenFF	<i>CHARMM General Force Field</i>
DM	Dinâmica molecular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
ffTK	<i>Force Field Toolkit</i>
GAFF	<i>General AMBER force field</i>
HAART	<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IN	HIV-1 Integrase
INTI	<i>Integrase inhibitors</i>
IP	Inibidores da protease
LogP	Logaritmo do coeficiente de partição
mRNA	RNA mensageiro
nON	Número de aceitadores de ligação de hidrogênio
nOHNH	Número de doadores de ligação de hidrogênio
NRTI	<i>Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors</i>
NNRTI	<i>Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors</i>
OPLS2005	<i>Optimized Potential for Liquid Simulations</i>
P & D	Pesquisa e Desenvolvimento
PME	<i>Particle mesh Ewald</i>
PR	HIV-1 Protease
PSA	<i>Polar Surface Area</i>
RMSD	<i>Root-mean-square deviation</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNaseH	Ribonuclease H
TARV	Terapia antirretroviral
TIP3P	<i>Transferable Intermolecular Potentials 3</i>

TNV	Tenofovir
TP	Cadeia trifosfatídica
TPSA	<i>Topological Polar Surface Area</i>
TR	Transcriptase Reversa
SIV	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
SIVsm	<i>Sooty mangabey</i>
UNAIDS	<i>United Nations Joint Programme on HIV/AIDS</i>
vdW	<i>van der Waals</i>
VMD	<i>Visual Molecular Dynamics</i>
3TC	Lamivudina

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. AIDS/HIV

### 1.1.1. *Histórico*

A enfermidade conhecida como síndrome da imunodeficiência adquirida humana (AIDS, do inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome*) é decorrente do vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*) que acomete o sistema imunológico. Os primeiros relatos da AIDS foram notificados no início da década de 80 (Heeney 2006, Lee 2009).

A origem do vírus ainda é discutível. Dois tipos de HIV acometem à humanidade: a do tipo 1 (HIV-1) e a do tipo 2 (HIV-2). Dentre as teorias existentes, as análises de filogenia molecular demonstraram que o HIV-1 teve como ancestral o vírus da imunodeficiência símia (SIV, do inglês *Simian Immunodeficiency Virus*), que infecta os chimpanzés da subespécie *Pan troglodytes troglodytes* (Sharp 2001). Entretanto, o HIV-2 é resultante de uma cepa do SIV que infecta os macacos da espécie *Sooty mangabey* (SIVsm) (Papadopulos 2003).

Segundo as evidências quanto à origem do HIV, há relatos que em virtude do processo de caça e abatimento do chimpanzé e do macaco, a transmissão do SIV na espécie humana ocorreu pela exposição do sangue desses animais, ocasionando a adaptação do SIV no organismo humano dando origem ao HIV (Gao *et al.* 1999).

O HIV-1 foi isolado e identificado em 1983 pelas equipes do professor Jean Luc Montagnier, do Instituto Pasteur de Paris e do professor Robert Charles Gallo, do Instituto Nacional de Saúde nos EUA (Montagnier 2002). O HIV-2 foi descoberto em 1986 por equipes do Instituto Pasteur e da Universidade de Harvard, quando constataram um vírus semelhante ao HIV-1 presente na África Central (Montagnier 2002).

Os primeiros casos da epidemia da AIDS se relatam do início da década de 1980, nos EUA. Eles se manifestaram em um grupo específico de homens homossexuais e usuários de drogas. Até esse momento, era considerada uma

enfermidade rara, pois os pacientes apresentavam o sistema imunológico comprometido, com sintomas de pneumonia causada por *Pneumocystis carinii*, Sarcoma de Kaposi, Candidíase, Citomegalovirose (Muegge 2003, Mandell 2010), entre outros. O governo e as autoridades sanitárias naquela época permaneceram de maneira omissa e imobilizados, não dando importância aos casos relatados, porque consideravam a AIDS como uma doença infecciosa típica da pobreza, que só acometia grupos limitados (Bastos 1993).

Devido ao crescente número de casos e mortes, a população apresentava um sentimento de medo, pânico e preconceito quanto à AIDS. O governo dos EUA foi pressionado pelas organizações não governamentais a conscientizar a população sobre a prevenção da doença. Desta forma, iniciou-se a busca para identificar o agente infeccioso e determinar o seu mecanismo de atuação na espécie humana (Bastos 1993, Francis 2012).

Em 1982 foi constatado o primeiro caso de AIDS no Brasil, no estado de São Paulo (Ministério da Saúde 2013). Algumas organizações não governamentais, como Grupo de Apoio e Prevenção à AIDS (Gapa), Associação Brasileira Interdisciplinar de AIDS (ABIA), o Grupo Pela Valorização, Integração e Dignidade do Doente de AIDS (Pela Vidua) e o Apoio Religioso Contra AIDS/Instituto de Estudos da Religião (ARCA/ISER) se mobilizaram para dar assistência aos pacientes infectados e divulgar informações sobre a prevenção (Bastos 1993, Pereira 2011).

### **1.1.2.        *Epidemiologia do HIV***

Desde o início da epidemia até os dias atuais, o HIV se espalhou de forma repentina, devido ao número crescente de indivíduos infectados no mundo. No entanto, há uma mobilização global em evitar o surgimento de novas infecções. Apesar da intenção no âmbito da pesquisa, em melhorar o tratamento e o diagnóstico, novas infecções ocorrem, em torno de 2,3 milhões em todo o mundo, segundo o relatório da UNAIDS (*United Nations Joint Programme on HIV/AIDS*)

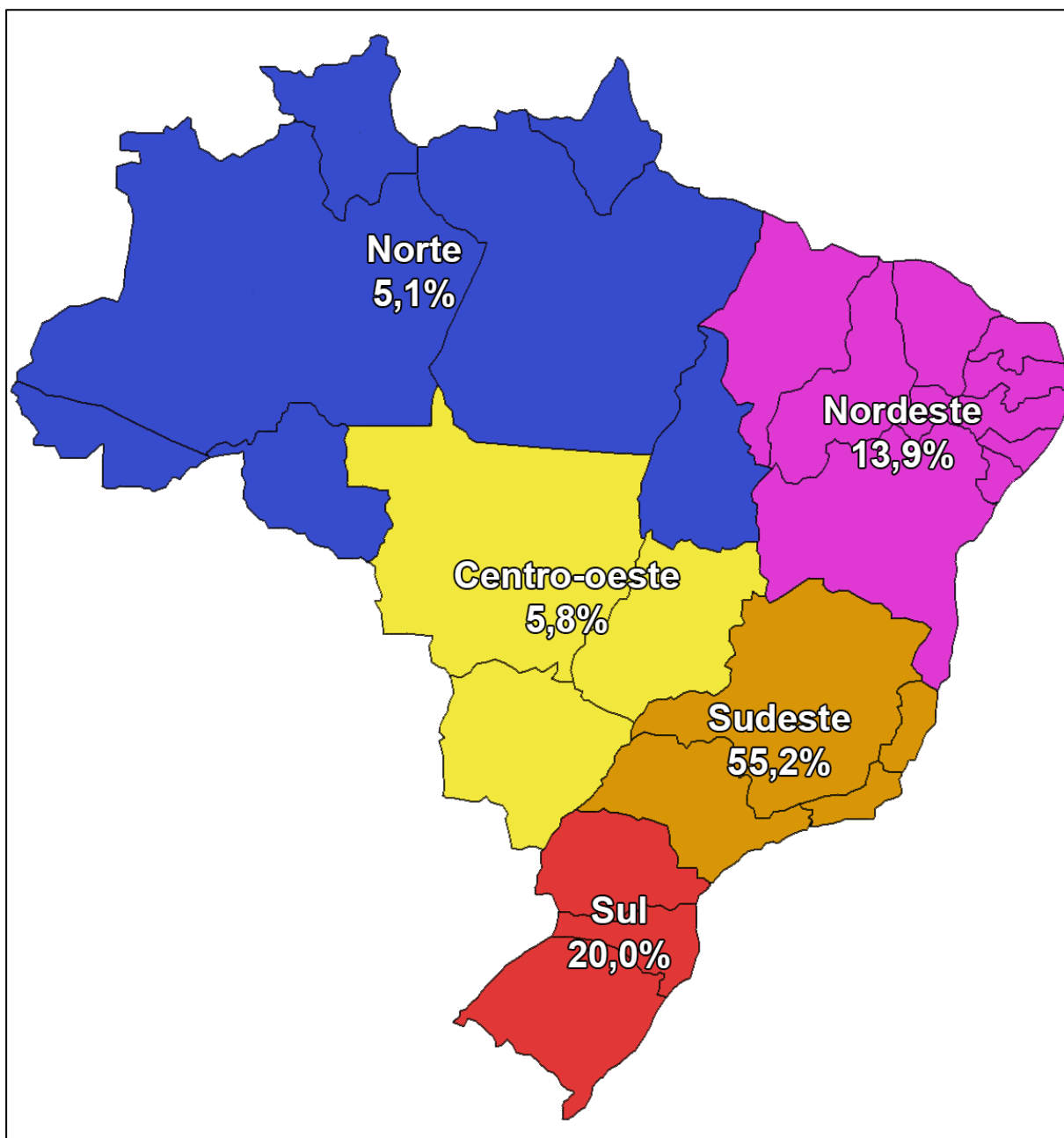
de 2013. Embora com esse número alarmante, 9,7 milhões de pessoas têm acesso à terapia antirretroviral em todo o mundo (Bastos 1993).

Atualmente, há 35,3 milhões de pessoas infectadas no mundo, segundo o relatório da *UNAIDS* de 2013 (*UNAIDS* 2013). Nesse relatório também é mencionado um decréscimo no número de mortes em decorrência da AIDS, em torno de 1,6 milhões, nos últimos anos. Em geral, a região mais afetada no mundo pelo HIV é a África Subsaariana com 25 milhões pessoas infectadas, seguida do Sul e Leste da Ásia com 3,9 milhões e da América Latina com 1,5 milhões de pessoas (*UNAIDS* 2013) (Figura 1).



**Figura 1:** Estimativa do número de pessoas infectadas no mundo, segundo a *UNAIDS*.  
Fonte: <http://www.unaids.org/>, adaptado por Silva, VS.

No Brasil, a infecção se mantém controlada, apesar de terem sido notificados 39.185 novos casos em 2013, totalizando aproximadamente 718 mil casos de pessoas infectadas. (Ministério da Saúde 2013) Os estados com maiores taxas de detecção de casos de AIDS são o Rio Grande do Sul (41,4%), Santa Catarina (33,5%), Amazonas (29,2%) e Rio de Janeiro (28,7%), segundo boletim epidemiológico de 2013 (Figura 2)(Ministério da Saúde 2013).



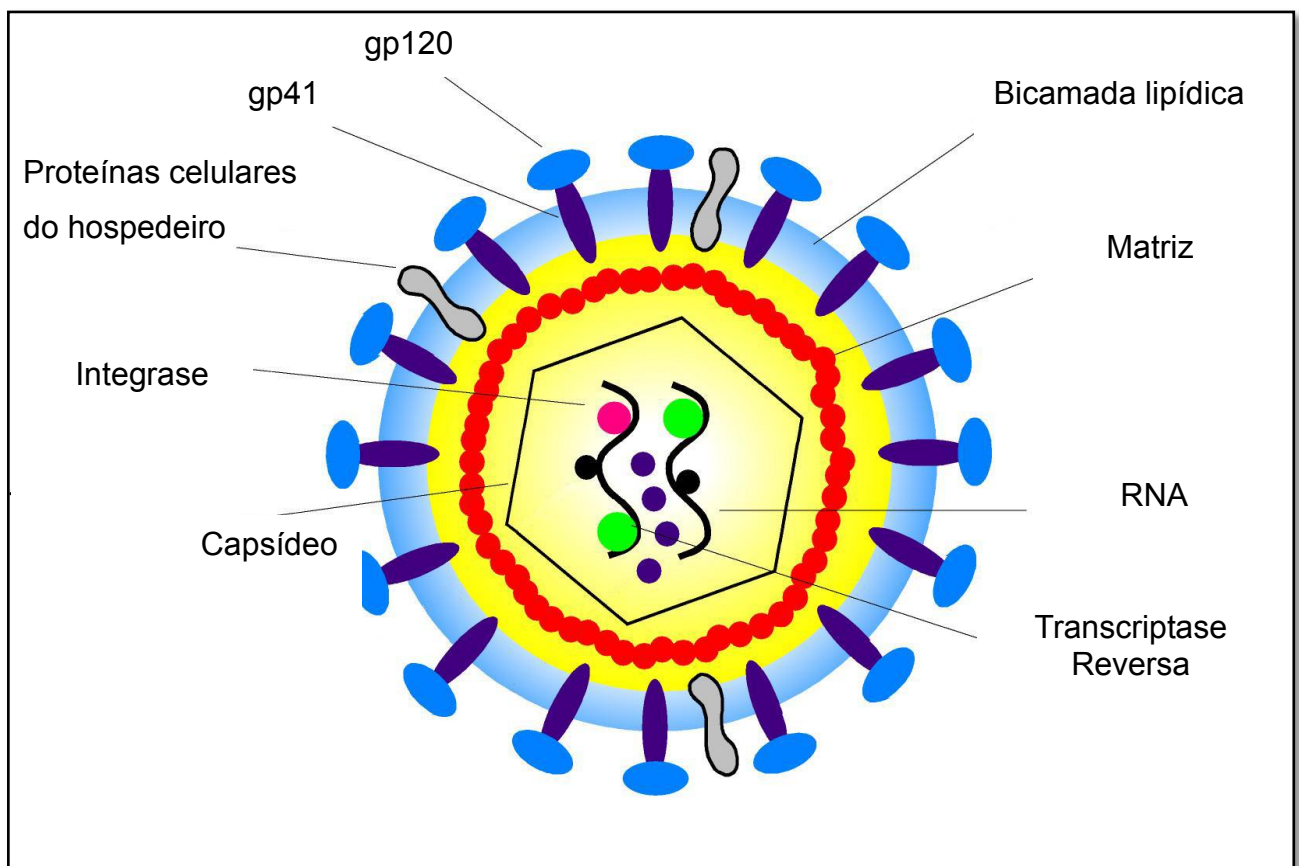
**Figura 2:** Distribuição percentual de casos de AIDS por região.  
 Fonte: Boletim epidemiológico 2013, adaptado por Silva, VS.

### 1.1.3. Estrutura do HIV

O HIV trata-se de um retrovírus com genoma de RNA, pertencente à Família *Retroviridae* (retrovírus) e ao gênero *Lentivirinae*. Existem dois tipos de HIV que podem ocorrer em humanos: tipo 1 (HIV-1) está presente na maior parte

do mundo, sendo o mais virulento, e o tipo 2 (HIV-2), descoberto após três anos do HIV-1, pode ser encontrado na África Ocidental e em algumas regiões da Europa, sendo menos virulento e sua transmissão é menor quando comparada com a do HIV-1 (Boyer 2012).

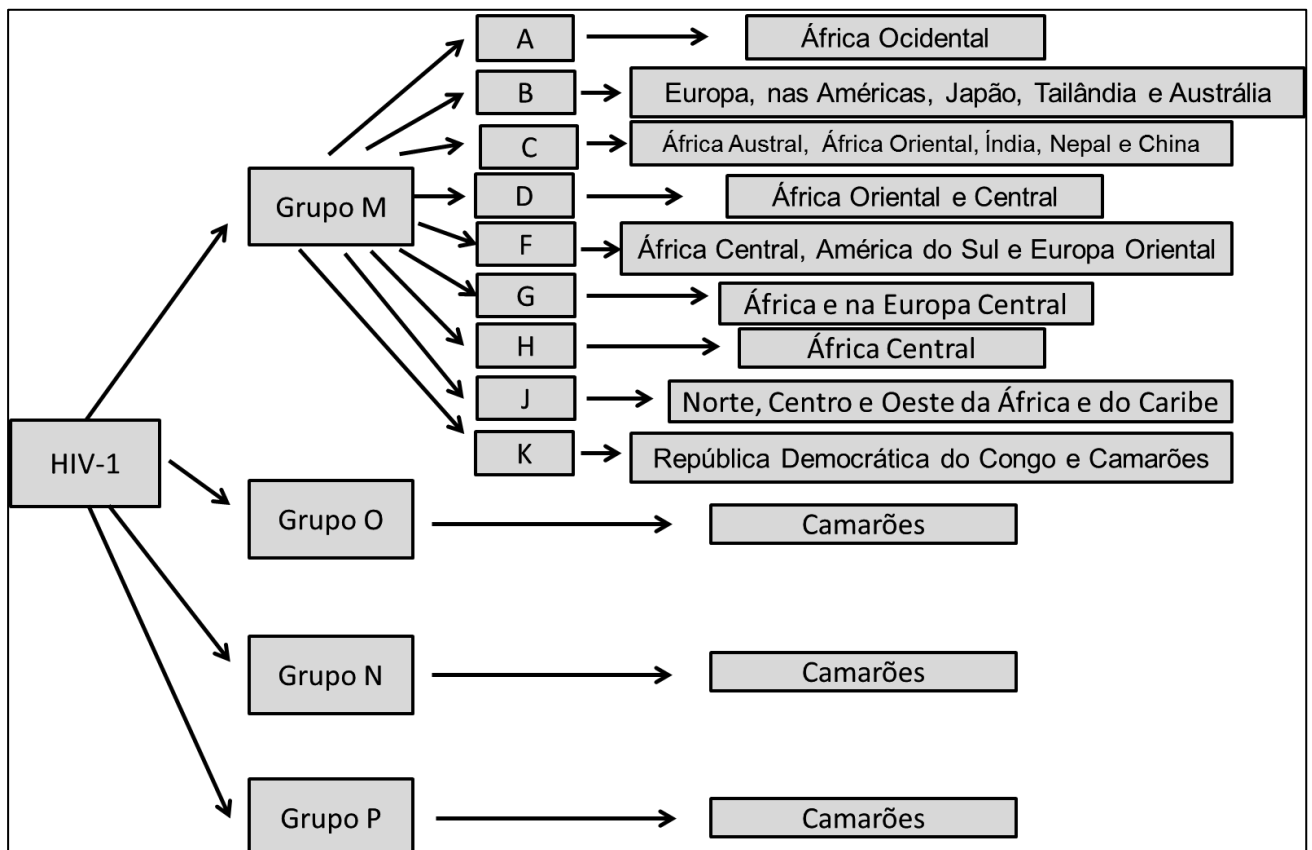
O vírus é uma partícula com formato esférico de tamanho em torno de 100 a 200 nm de diâmetro. Seu interior apresenta um capsídeo cilíndrico, matriz com duas cópias de fita simples de ácido ribonucleico (RNA) com polaridades positivas e as enzimas Transcriptase Reversa (TR), Integrase (IN) e Protease (PR), necessárias para a sua replicação (Ferreira 2010). Possui três tipos de genes estruturais *gag*, *env* e *pol*, fundamentais para a formação da estrutura (Sundquist 2012). A membrana do vírus é composta por uma bicamada lipídica formada por alguns lipídios, como a esfingomiéline, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e o colesterol, decorrentes da membrana da célula alvo, quando o vírus do HIV adentra na célula (Til *et al.* 2008, Sundquist 2012). Além disso, a membrana apresenta as glicoproteínas gp120 e gp41, responsáveis pelos processos de fixação e fusão na célula alvo (Figura 3).



**Figura 3:** Estrutura morfológica do HIV.

Fonte: <http://hivbook.com/tag/life-cycle-of-hiv/>, adaptado por Silva, VS.

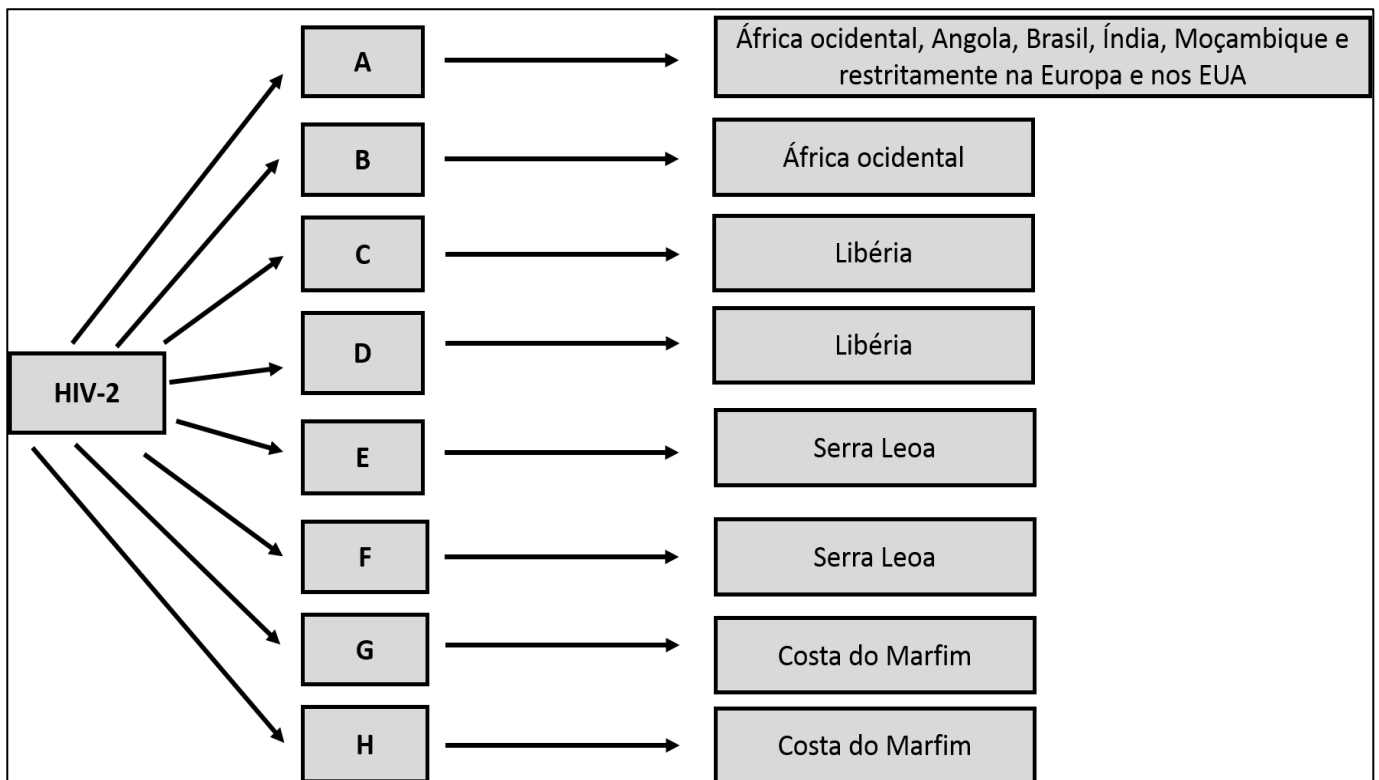
De acordo com a variabilidade genética, o HIV-1 é dividido em quatro grupos: M (*main*), O (*outlier*), N (*non-M/non-O*) e o P (*pending the identification of further human cases*). O grupo M, responsável pela pandemia mundial, é subdividido em nove subtipos, (A, B, C, D, F, G, H, J e K). A figura 4 mostra um fluxograma dessa classificação e indica em quais países e regiões do mundo cada grupo ou subtipo é prevalente (Figura 4) (Pinto 2006).



**Figura 4:** Classificação do HIV-1 de acordo com os grupos, subtipos e a prevalência. Autor: Silva, VS.

O HIV-2 apresenta oito subtipos, (A, B, C, D, E, F, G e H), no entanto, os subtipos A e B estão se alastrando na África Ocidental. O subtipo A ainda é encontrado na Angola, Brasil, Índia, Moçambique e restritamente na Europa e nos EUA (Figura 5) (Santiago *et al.* 2005, Borrego 2013).





**Figura 5:** Classificação do HIV-2 de acordo com os grupos, subtipos e a prevalência.  
Autor: Silva, VS.

#### 1.1.4. Ciclo biológico do HIV

O ciclo do HIV se inicia a partir de um vírion maduro na corrente sanguínea, que contém as subunidades proteicas gp120 e gp41 que se ligam aos linfócitos CD4. A interação da proteína gp120 com o linfócito CD4 gera mudanças conformacionais na proteína gp120, permitindo a interação com os correceptores das quimiocinas CCR5 e CXCR4 do linfócito T do sistema imunológico, macrófagos e células dendríticas (Lazzarotto 2010).

Em seguida, tais interações conduzem mudanças conformacionais na proteína gp41, fazendo com que ela exponha um peptídeo de fusão que adentra na célula hospedeira, ocasionando a fusão do envelope viral. Dentro do citoplasma, ocorre o desnudamento do vírus com a introdução do capsídeo viral no meio. Nesse ambiente, verifica-se a liberação do genoma viral com

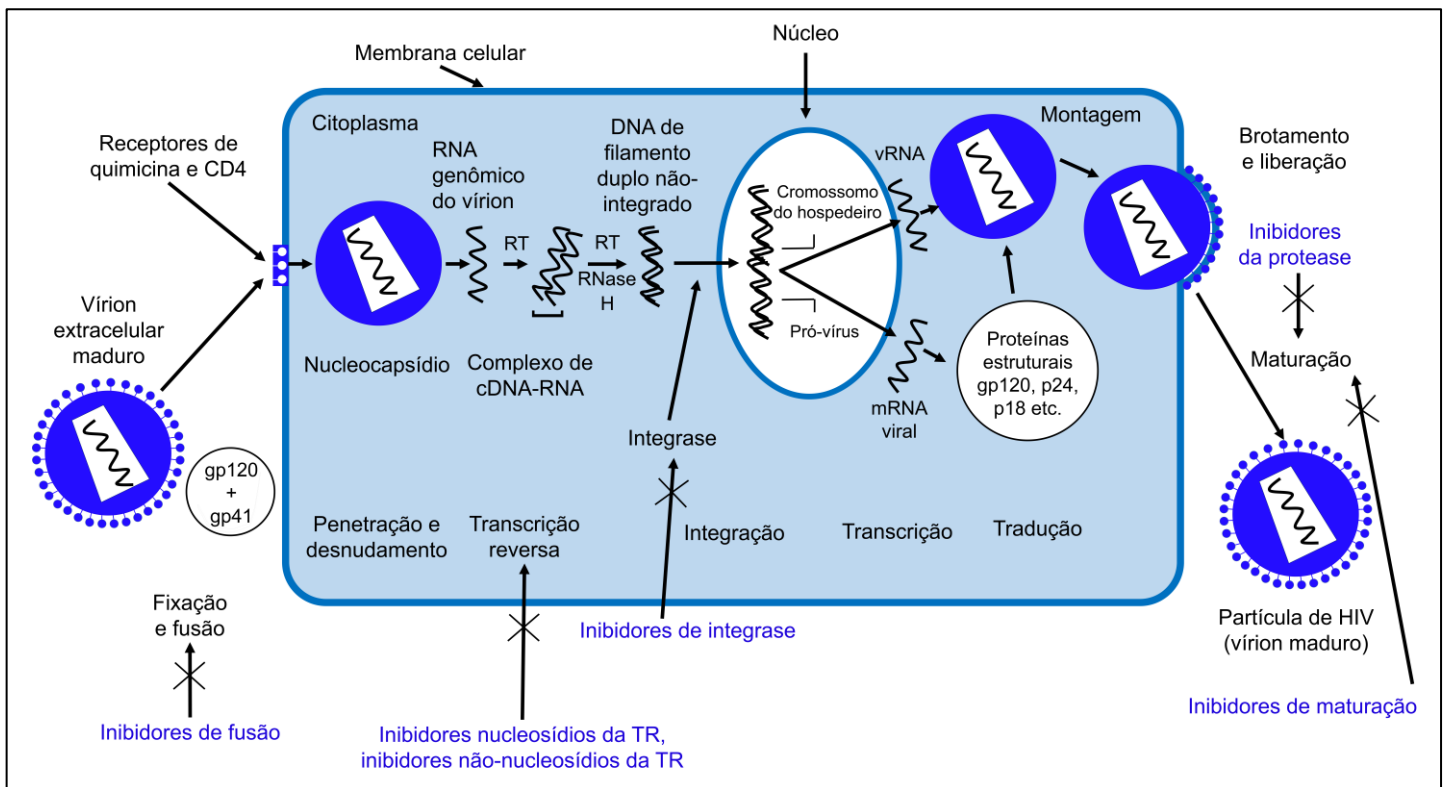
incorporação das enzimas TR, IN, IP, as quais se tornam ativas dando início à replicação (Cunico 2008, Younai 2013).

A etapa de replicação se inicia com a ação da enzima TR, que realiza a transcrição reversa do RNA viral em DNA (ácido desoxirribonucleico) viral, dando origem a uma molécula híbrida de RNA/DNA. A Ribonuclease H (RNaseH) tem a função de clivagem da fita de RNA presente na molécula híbrida (Cunico 2008, Younai 2013). Com a formação da dupla fita de DNA, o DNA pró-viral terá agregação de proteínas virais e será transportado para o núcleo, e por meio da enzima IN, insere o DNA viral no DNA da célula (Cunico 2008, Younai 2013).

Nessa etapa do ciclo, conhecida como etapa tardia, ocorrem dentro do núcleo a ativação do pró-vírus e a transcrição do DNA da célula hospedeira, contendo o DNA viral, em RNA mensageiro (mRNA). Durante a síntese do mRNA, são produzidos dois tipos de RNA, um RNA genômico, que auxiliará na formação do vírus maduro e o RNA transcrito que servirá para a criação de poliproteínas virais, através de processos de *splicing*. Em seguida, esse RNA transcrito será transportado para fora do núcleo, onde ocorrerá a tradução (Freed 1995, Cunico 2008, Younai 2013).

O processo de tradução se inicia com a codificação das proteínas virais. No citoplasma, a enzima protease tem a função de clivar proteínas virais em subunidades para a formação de novas partículas virais. Cada subunidade contém uma das proteínas necessárias para a construção da nova partícula de HIV (Cunico 2008, Younai 2013).

Posteriormente, ocorrem os processos de montagem a partir de um complexo de nucleoproteínas, devido ao excesso de RNA transcritos. Com isso, é formado um nucleocapsídeo, que é revestido por uma membrana plasmática provida pela célula alvo. Em seguida, processos de brotamento e liberação ocorrem por meio de gemulação. A nova partícula de HIV sai da célula hospedeira causando a sua morte através dos linfócitos T CD8+ que reconhecem as células infectadas como invasoras. O vírion recém-formado entra na circulação sanguínea podendo infectar novas células ou ficar circulando no meio extracelular (Cunico 2008, Lazzarotto 2010)(Figura 6).



**Figura 6:** Ciclo de vida do HIV.  
 Fonte: Godman & Gilman, 2011, adaptado por Silva, VS.

### 1.1.5. Infecção e tratamento do HIV

As formas de contágio do HIV se dá pelo contato com fluidos corporais contaminados com o vírus através de transmissão sexual, transmissão vertical (mãe para o filho), transfusão de sangue, o uso de agulhas ou seringas contaminadas e a não esterilização de instrumentos contaminados que cortam ou perfuram (Borrego 2013).

A infecção pelo HIV pode ser dividida em infecção aguda, infecção assintomática e infecção sintomática. A infecção aguda surge depois da transmissão viral, através do contato com fluidos corporais de uma pessoa

infectada. Essa infecção persiste em até 14 dias após a exposição com o HIV e a janela imunológica dura até 6 meses (Lazzarotto 2010, UNAIDS 2013).

Cerca de 50% a 90% dos indivíduos apresentam manifestações clínicas, evidenciadas como gripe ou uma síndrome mononucleose. Pacientes apresentam no início da infecção, um aumento rápido da carga viral e queda dos linfócitos T CD4+. Em seguida, os linfócitos se normalizam e a carga viral regride (Lazzarotto 2010, UNAIDS 2013).

A infecção assintomática acontece após a infecção aguda e é definida como a ausência de sintomas, em média do sexto mês após a infecção. Em alguns casos, o indivíduo infectado pode apresentar uma linfadenopatia persistente. Nesse tipo de infecção, a contagem de linfócitos pode apresentar-se estável e progressivamente, apresentar uma redução à medida que a carga viral aumenta (Lazzarotto 2010, UNAIDS 2013).

Na etapa de infecção sintomática, o indivíduo infectado apresenta elevação da viremia e contagem dos linfócitos T CD4+ abaixo de 200 células/mL. Nessa fase da infecção o indivíduo apresenta vários sintomas, tais como: sudorese noturna, fadiga, emagrecimento. O indivíduo infectado apresenta o seu sistema imunológico comprometido, ficando susceptível às infecções oportunistas decorrentes de vírus, bactérias, protozoários e fungos, como tuberculose, toxoplasmose, além das neoplasias, como por exemplo, o sarcoma de Kaposi (Lazzarotto 2010).

Para controle da infecção por HIV foram desenvolvidos medicamentos com o propósito de reduzir o número de óbitos e aumentar a expectativa de vida dos pacientes infectados. Os medicamentos antirretrovirais (ARVs) contra o HIV agem em diversas etapas da replicação do vírus (Lazzarotto 2010).

Os ARVs são divididos em cinco classes: (i) inibidores de fusão; (ii) inibidores da transcriptase reversa, subdividida em inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa (NRTI) e inibidores não-nucleosídeos da transcriptase reversa (NNRTI), (iii) inibidores da integrase (INTI); (iv) inibidores de protease (IP) e; (v) inibidores de maturação. Atualmente existem 20 medicamentos usados no tratamento da AIDS (Ferreira 2010).

A terapia antirretroviral (TARV) é baseada em fármacos antirretrovirais, sendo administrados ao paciente quando apresenta contagem de linfócitos T CD4+ igual ou abaixo de 500 cel/mm<sup>3</sup> (Lorscheider 2012, Ministério da Saúde 2014). Essa terapia tem como objetivo reduzir a carga viral e aumentar o número

de linfócitos T CD4+. Segundo o relatório da UNAIDS de 2013, 9,7 milhões de pessoas de baixa renda fazem uso da terapia antirretroviral em todo o mundo (UNAIDS 2013).

No Brasil, a terapia antirretroviral altamente ativa (HAART, do inglês *Highly Active Antiretroviral Therapy*), conhecida como “coquetel” foi implementada em 1996. A execução da terapia resultou em um aumento da quantidade de comprimidos a serem administrados, visto que são dois ou mais fármacos, o que necessita de um empenho do paciente, quanto à aderência ao tratamento (Kumari 2012). O sucesso dessa terapia propicia a redução da carga viral, diminuindo a probabilidade do surgimento de mutações, evitando a resistência contra os medicamentos administrados (Arts 2012).

O coquetel consiste na combinação de dois inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa com um inibidor não-nucleosídeos da transcriptase reversa ou dois inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa com um inibidor da protease ou ainda, outras combinações (de Souza 2003). No Brasil, foi adotado o esquema de combinação com inibidores da transcriptase reversa com inibidor da protease, sendo distribuído gratuitamente aos portadores de HIV por meio da Lei 9.313 (Brito 2011).

Devido ao alto custo dos medicamentos e outras necessidades por paciente, o governo brasileiro começou a adotar uma estratégia em produzir os medicamentos em vários laboratórios públicos e estaduais (do Lago 2010). Atualmente o Brasil produz 10 medicamentos, tais como a zidovudina; didanosina; combinação de zidovudina e lamivudina; lamivudina; estavudina; indinavir; nevirapina; ritonavir; efavirenz; e tenofovir (Ministério da Saúde 2014).

Como o foco desse projeto é a busca por medicamentos que possam ser mais eficazes do que os já existentes no mercado, cujos medicamentos serão distribuídos gratuitamente. As estruturas desses medicamentos foram cedidas por Farmanguinhos, no qual serão elaborados.

Dentre os ARVs, devemos destacar a classe dos NRTIs (Tabela 1), que são análogos desoxinucleótidos, adicionados à cadeia crescente de DNA viral. O processo de adição acontece no sítio ativo da polimerase da enzima, atuando como um inibidor competitivo (Ferreira 2010, Boyer 2012).

**Tabela 1. Medicamentos NRTI disponíveis no mercado**

Nome Comercial	Princípio Ativo	Fabricante
Combivir	Lamivudina e zidovudina	GlaxoSmithKline
Emtriva	Emtricitabina, FTC	Gilead Sciences
Epivir	Lamivudina, 3TC	GlaxoSmithKline
Epzicom	Abacavir a Lamivudina	GlaxoSmithKline
Hivid	Zalcitabina, Dideoxicitidina (não mais comercializado)	Hoffman-La Roche
Retrovir	Zidovudina, azidotimidina, AZT, ZDV	GlaxoSmithKline
Trivizir	Abacavir, zidovudina e lamivudine	GlaxoSmithKline
Truvada	Tenofovir disoproxil fumarato e Emtricitabina	Gilead Sciences, Inc
Videx EC	Didanosina entérico, ddl EC	Bristol Myers-Squibb
Videx	Didanosina, dideoxinosina, ddl	Bristol Myers-Squibb
Viread	Tenofovir disoproxil fumarato, TDF	Gilead
Zerit	Estavudina, d4T	Bristol Myers-Squibb
Ziagen	Sulfato de Abacavir	GlaxoSmithKline

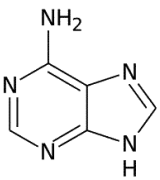
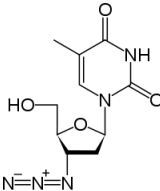
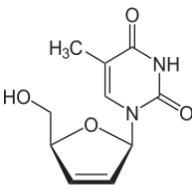
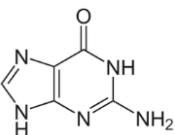
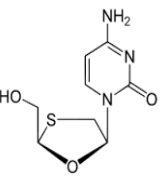
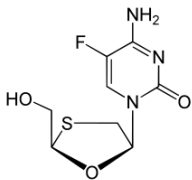
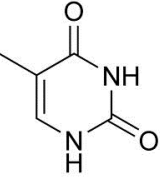
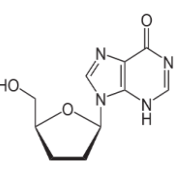
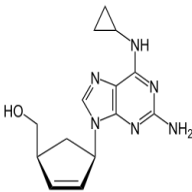
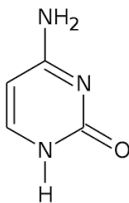
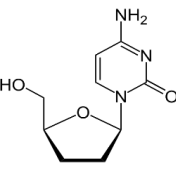
Os NRTIs precisam ser fosforilados por enzimas quinases celulares para que assim, estejam na sua forma ativa e realizem sua ação terapêutica (Sarafianos 2009, Lugassy 2010, Kumari 2012).

A TR os reconhece como nucleotídeos falsos, devido à ausência do grupo hidroxila (3'-OH), presente na porção do açúcar, fundamental para a ligação do próximo nucleotídeo, e assim, a cadeia de DNA viral não é alongada, paralisando a replicação (Sarafianos 2009, Lugassy 2010, Kumari 2012).

O primeiro medicamento anti-HIV da classe dos NRTIs a ser utilizado foi a Zidovudina (AZT), um análogo nucleosídeo à timina, aprovado em 1987, pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Atualmente, há sete fármacos aprovados da classe dos NRTIs: zidovudina (3'-azido-2',3'-deoxythymidine, AZT), didanosina (2',3'-deoxyinosine, ddl), lamivudina (2',3'-dideoxy-3'-tiacitidina, 3TC), zalcitabina

(2',3'-deoxycytidine, ddC), estavudina (2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine, d4T), abacavir (ABC) e emtricitabina (FTC) (Tabela 2) (Kumari 2012).

**Tabela 2. Relação das estruturas dos NRTIs.**

Nucleosídeo	Estrutura	Fármaco	Estrutura	Fármaco	Estrutura
Adenina		Zidovudina		Estavudina	
Guanina		Lamivudina		Emtricitabina	
Timina		Didanosina		Abacavir	
Citosina		Zalcitabina			

Somente em 1992 os medicamentos antirretrovirais passaram a ser disponibilizados no Brasil. Apesar disso, em 1985, o Brasil tinha criado o Programa Nacional da AIDS, em virtude dos inúmeros casos diagnosticados, no qual divulgava condutas e orientações ao combate, atestando a gravidade da AIDS (Geoczze *et al.* 2010, Souza 2010).

Atualmente, o Brasil oferece serviços de prevenção e tratamento com distribuição gratuita de medicamentos para pacientes portadores do HIV, sendo um dos países precursores a aderirem às políticas de saúde para o tratamento de pacientes portadores do vírus HIV (Souza 2010). Essas políticas de saúde têm como objetivo reduzir o número de óbitos e o surgimento de novas infecções, além de melhorar a qualidade de vida do paciente e colaborar com novas políticas de adesão aos medicamentos (Ministério da Saúde 2010).

Como esses medicamentos antirretrovirais são tóxicos e apresentam inúmeros efeitos adversos e colaterais, o que dificulta a qualidade de vida dos pacientes e, por isso, muitos acabam abandonando o tratamento. O surgimento de efeitos adversos, colaterais ou com algum grau de toxicidade depende do regime da HAART e do tempo que esse paciente faz uso desses medicamentos (Paruthi 2013). Dentre os efeitos adversos destacam-se lipodistrofia (Valente 2007), hiperlipidemia (Carr 1998), aumento de doenças coronarianas (Barbaro 2009), candidíase (Moylett 2002), Herpes (Moylett 2002), dentre outros.

#### **1.1.6. Estrutura molecular da Transcriptase reversa**

Estruturalmente, a proteína TR se apresenta em forma de heterodímero com duas cadeias polipeptídicas, a p66 (66kDa) com 560 aminoácidos e a p51 (51kDa) com 440 aminoácidos e apresenta dois sítios ativos (Esposito 2012, Das 2013).

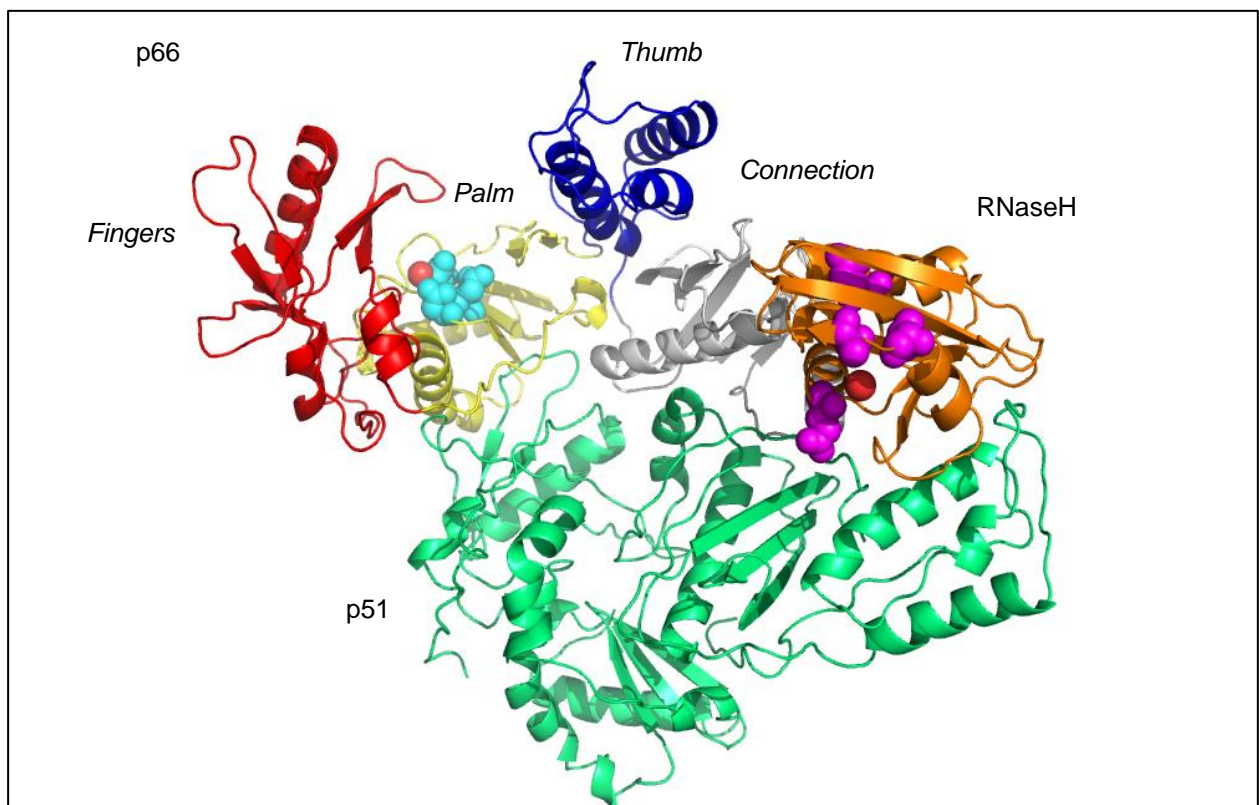
O sítio da polimerase na p66, contém uma tríade catalítica de ácidos aspárticos (D110, D185 e D186), interagindo com os cofatores iônicos divalentes  $Mg^{+2}$ , onde ocorre a replicação e a ligação dos NRTIs, situado entre os subdomínios *palm*, *fingers* e *thumb* da p66 (Esposito 2012, Das 2013).

O sítio da ribonuclease tem quatro resíduos catalíticos de carboxilato (D443, E478, D498 e D549), e também interage com o cofator iônico divalente  $Mg^{+2}$ , localizando-se no C- terminal da cadeia p66, que tem como função clivar o RNA (Esposito 2012, Das 2013).



A p66 contém os subdomínios *fingers* (resíduos 1–85 e 118–155), *palm* (resíduos 86–117 e 156–237), *thumb* (resíduos 238–318) e *connection* (resíduos 319–426). Os subdomínios *fingers* e *thumb* são flexíveis, adquirindo várias conformações de acordo com a funcionalidade da enzima para que ocorra a replicação (Esposito 2012, Das 2013).

A p51 contém os mesmos subdomínios *fingers*, *palm*, *thumb* e *connection*; porém, são relativamente rígidos e atuam como suporte para a proteína p66. A TR desempenha um papel importante na replicação do vírus, pois é responsável pela transcrição do RNA viral em DNA viral. A proteína TR com os seus subdomínios e seus sítios ativos (Esposito 2012, Das 2013) é mostrada na figura 7.



**Figura 7:** Representação da enzima TR, usando o programa Pymol (Schrodinger), destacado em *cyan*, o sítio da polimerase e o sítio da RNaseH em *magenta*. Os íons  $Mg^{+2}$  estão situados próximos aos sítios ativos, destacados em *vermelho*.

Fonte: Adaptado do site: <http://www.rcsb.org/>

No início da replicação, a TR altera a sua conformação da sua forma “fechada” para a “aberta” (Figura 8), permitindo que a fita de RNA passe pelos subdomínios *fingers*, *palm* e *thumb* da p66. Antes do início da replicação, o subdomínio *thumb* se movimenta para conter os ácidos nucleicos. A síntese do DNA é iniciada no final da fita 3' do RNA, a TR usa um RNA transportador (RNAt) presente no nucleocapsídeo como um iniciador (*primer*) acoplado, que são até o final da fita 5', localizado no sítio P (*priming site*), formando uma molécula híbrida de RNA/DNA. Essa molécula híbrida sofre a ação da enzima Ribonuclease (RNaseH) que cliva a fita de RNA por hidrólise, permitindo o retorno da fita simples de DNA ao sítio da polimerase para formar a dupla-fita pela própria TR (Sarafianos *et al.* 2002, Sarafianos *et al.* 2009).



**Figura 8:** Alinhamento das estruturas da TR, com a conformação “aberta” (vermelho), sob o código PDB 1T05 (Tuske 2004) e com a conformação “fechada” (ciano), sob o código PDB 3DLK (Bauman JD 2008). Expressam um RMSD de 1.5 Å. Fonte: Adaptado do site: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>.

Com a entrada do DNA no sítio da polimerase, o subdomínio *fingers* da proteína p66 altera a sua conformação, ficando numa conformação “aberta” para

acondicionar o ácido nucléico. Os desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP) são adicionados, formando um complexo enzima/DNA/dNTPs, no sítio N (*nucleotide-binding site*). Os nucleotídeos incorporados apresentam em sua estrutura uma cadeia de trifosfato (TP), essa cadeia TP é responsável por ligar o grupo hidroxila presente na extremidade da fita 3' um nucleotídeo ao grupo fosfato presente na extremidade da fita 5' do nucleotídeo adjacente. Essa interação entre os nucleotídeos é conhecida como ligação fosfodiéster (Sarafianos *et al.* 2002, Sarafianos *et al.* 2009).

Posteriormente, com a finalização da incorporação dos nucleotídeos, o subdomínio *fingers* altera a sua conformação para “fechada”, liberando o pirofosfato (PPi). Em seguida, ocorre a translocação do DNA alongado do sítio N para o sítio P (Sarafianos *et al.* 2002, Sarafianos *et al.* 2003).

#### 1.1.7. Mecanismos de resistência dos NRTIs

A resistência aos NRTIs é decorrente dos erros na replicação (transcrição reversa) na TR. Dado que a enzima não dispõe de um mecanismo corretivo, surge as mutações. A mutação na enzima é causada pela troca de aminoácidos, tornando-a resistente aos fármacos (Siliciano 2013). Geralmente, os aminoácidos envolvidos na resistência do sítio dos NRTI estão presentes nos subdomínios *fingers* ou *palm* (Sarafianos *et al.* 2009, Adamson 2010, Das 2013).

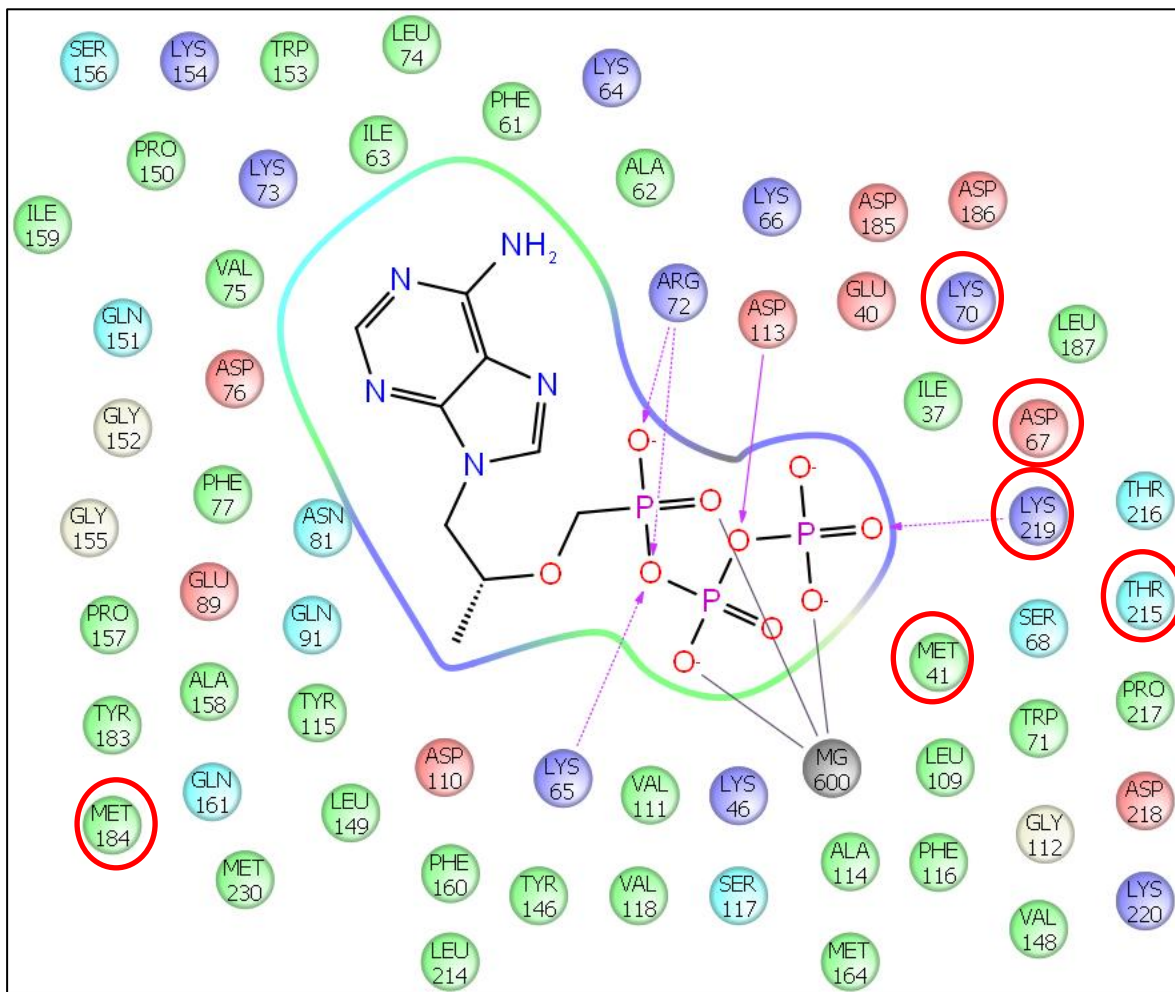
Essa resistência é decorrente da alta diversidade genética do HIV, pois o vírus se replica muito rápido, deixando-o predisposto a possíveis mutações. A TR ainda apresenta como habilidade, considerada também como resistência, a capacidade de retirar os NRTI incorporados ao *primer*, que são nucleotídeos, realizando uma inversão do início da reação de polimerização (Sarafianos *et al.* 2009, Adamson 2010, Das 2013).

Foram verificados dois tipos de resistência:

(i) de exclusão, que consiste na expulsão do NRTI no instante em que são incorporados, sendo um exemplo desse tipo de resistência a mutação M184V, na região do loop  $\beta 3$  e  $\beta 4$  do subdomínio *fingers*, onde ocorre uma diminuição

seletiva de incorporação dos fármacos Lamivudina (3TC) e a emtricitabina (FTC) através de impedimento estérico do anel oxatiolano dos fármacos (Figura 9) (Sarafianos *et al.* 2009, Das 2013).

(ii) de excisão, baseado na retirada do NRTI após ser incorporado no final da 5' da fita DNA viral, por meio de um ataque nucleofílico do pirofosfato. A resistência ocorre a partir de movimentos de translocação do NRTI incorporado, fazendo com que o NRTI se desloque do sítio N para o sítio P próximo ao sítio ativo da polimerase (Sarafianos *et al.* 2002). Com o NRTI no sítio P, acontece o processo de pirofosforólise, no qual é removido o último átomo de fósforo da cadeia do pirofosfato, o que desfavorece a interação do AZT com o sítio da polimerase e a polimerização do DNA continua (Sarafianos *et al.* 2002). Um exemplo é a resistência produzida pelo fármaco AZT, que é análogo à timina. As mutações M41L, D67N, K70R, T215Y, K219Q são exemplos das mais frequentes desse tipo de resistência (Figura 9) (Sarafianos *et al.* 2009, Veloso 2010).



**Figura 9:** Visualização do sítio da polimerase com o TNV. Os resíduos destacados são os resíduos que sofrem mutações.

## 1.2. Modelagem Molecular no Desenvolvimento de Fármacos

A modelagem molecular consiste no estudo do comportamento de moléculas e átomos, avaliando suas propriedades moleculares e físico-químicas através de métodos computacionais. Com o advento do uso de programas para computadores, a modelagem molecular tem sido considerada uma metodologia muito útil para analisar sistemas biológicos (Guido 2010). Programas computacionais e a existência dos bancos de dados permitem uma investigação mais profunda do sistema estudado, das interações entre moléculas, da estimativa da atividade biológica de compostos, dentre outras análises (Carvalho 2002).

A modelagem molecular pode ser empregada no planejamento racional de fármacos seguindo duas abordagens: indireta e direta. A primeira é utilizada quando a estrutura do receptor é desconhecida; no entanto, os ligantes conhecidos são empregados para prever o sítio farmacofórico necessário para interagir com o receptor. A segunda abordagem baseia-se no conhecimento da estrutura do receptor, mas a conformação do ligante dentro do sítio do receptor é desconhecida (Guido 2010).

A utilização de programas computacionais permite a visualização da estrutura tridimensional do receptor e do ligante, possibilitando uma compreensão da interação entre eles (Carvalho 2002).

Para que um medicamento chegue ao mercado leva em torno de 15 a 20 anos, e durante esse tempo são realizados vários testes para verificar a eficácia e a segurança do candidato a fármaco. Os testes são desde a identificação de atividade da molécula até a fase III. No entanto, a indústria farmacêutica investe muito dinheiro no desenvolvimento do candidato a fármaco, em torno de milhões de dólares. Por conta disso, o preço do medicamento no mercado é decorrente dos gastos dos testes pré-clínicos e clínicos, dado que a indústria farmacêutica visa o lucro (Calixto 2008, Ferreira 2009).

A modelagem molecular tem papel crucial nessa etapa no processo de descobrimento visando reduzir esse tempo, além de diminuir custos com testes *in*

*vitro* e *in vivo*. A modelagem molecular dispõe de várias metodologias aplicáveis ao planejamento de fármacos (Carvalho 2002). É necessário o surgimento de novos antivirais para atender a urgência com que a AIDS dizima os indivíduos infectados, além da alta capacidade da TR de sofrer mutações (Sarafianos *et al.* 2009). Dessa forma, as metodologias de *Docking* Molecular e Dinâmica Molecular foram empregadas neste trabalho para compreender a interação de compostos análogos ao Abacavir e à Lamivudina no sítio da polimerase da TR.

### **1.2.1. Docking Molecular (Docagem Molecular)**

O *Docking* Molecular é uma metodologia computacional que consiste na predição da interação entre moléculas (Kastritis *et al.* 2010, Friesner *et al.* 2004, Halgren *et al.* 2004, Friesner *et al.* 2006). Essa interação pode ser compreendida pelo paradigma “chave-fechadura” estabelecido por Emil Fischer em 1894 (Fischer 1894, Hugo Verli 2005).

As interações do ligante com o receptor são decorrente da complementaridade, ou seja, o receptor reconhece o ligante, em virtude das interações eletrostáticas, de *van der Waals*, ligações de hidrogênio, e outras, que os átomos do ligante realizam com o sítio ativo ou alostérico de uma proteína (Gschwend 1996).

Atualmente há diversos programas livres e outros comerciais, além de alguns servidores *online*, que possibilitam ao usuário utilizar o programa ou servidor apropriado ao seu estudo de *docking* (Garrett 2008). Dentre os programas disponíveis ressaltamos os seguintes: AutoDock (Morris *et al.* 1998, Åsterberg *et al.* 2002), Dock (Kuntz *et al.* 1982, Gschwend 1996, Ewing 1997), FlexX (Rarey 1996), Glide (Friesner *et al.* 2004, Halgren *et al.* 2004, Friesner *et al.* 2006, Kroemer 2007) e o GOLD (Verdonk 2003), além de servidores *online*, como o DockThor (de Magalhães *et al.* 2014).

Alguns dos parâmetros avaliados no processo de *docking* são: (i) a energia do complexo receptor-ligante, classificados por funções de pontuação; (ii) a conformação do ligante, medida por uma função de pontuação (*score*); e (iii) as poses do ligante geradas, diferenciando na interação com os aminoácidos do sítio ativo (Alonso 2006).

A maioria dos programas de *docking* é desenvolvida, normalmente por associação de uma função de pontuação e de um algoritmo de minimização (Verdonk 2003). A partir disso, é possível realizar o *docking* entre duas moléculas (Halperin 2002).

O *scoring* é uma função de pontuação que mede a afinidade do ligante com o receptor de acordo com o algoritmo de busca. Esta função tenta distinguir as poses prováveis das improváveis (Meng 2011). Na realização do *docking*, é necessário determinar a grade de simulação (*Grid*), que irá propor o espaço no qual o ligante deve percorrer e alcançar a melhor solução (Halperin 2002).

As funções de pontuação são fundamentadas em três possíveis aproximações: métodos de campo de força, métodos de força empírica e métodos de conhecimento (Huang 2010). Alguns dos campos de força utilizados para se obter a função de *scoring* são o Amber (Pearlman *et al.* 1995), OPLS-AA (Jorgensen 1996), e o CHARMM (Vanommeslaeghe *et al.* 2010), MMFF94 (Halgren 1996) de acordo com o tipo de molécula a ser estudado.

Os algoritmos de *docking* podem considerar as moléculas como corpos rígidos ou flexível. O *docking* de corpos rígidos não considera a flexibilidade apenas a complementariedade entre o ligante e o receptor. Já o *docking* flexível considera a flexibilidade do ligante, o que permite que o ligante adquira várias conformações no receptor (Dias 2008). Os algoritmos mais utilizados em programas de *docking*, são: o algoritmo genético (Davis 1991), Monte Carlo (Metropolis 1949), construção incremental (Ausiello 1991).

Os programas e servidores expõem uma particularidade quanto à forma de *docking* citadas acima, como por exemplo, o AutoDock (Morris *et al.* 1998, Åsterberg *et al.* 2002), e o FlexX (Rarey *et al.* 1996), permite a rigidez do receptor e a flexibilidade do ligante, visando uma redução do custo computacional (Goodsell 1996, Mukesh 2011). No entanto, o Dock considera a rigidez do receptor e o ligante pode ser rígido ou flexível, ficando a critério do usuário

escolher a forma de *docking* mais apropriada. Já o Glide considera a flexibilidade do receptor e do ligante, possibilitando uma maior precisão no resultado da pose gerada (Meng 2011).

A Tabela 3 mostra alguns programas de *docking*, o algoritmo e o campo de força utilizado por cada um.

**Tabela 3. Relação de alguns programas de *Docking*.**

<b>Programas</b>	<b>Algoritmo de busca</b>	<b>Campo de forças</b>
AutoDock	Algoritmo genético Lamarckiano (Morris <i>et al.</i> 1998)	Amber (Pearlman <i>et al.</i> 1995)
Dock	Algoritmo geométrico (Schwartz 1988)	Amber (Pearlman <i>et al.</i> 1995)
Glide	Monte Carlo (Metropolis 1949) e Incremental (Ausiello 1991)	OPLS2005 (Jorgensen 1996)
FlexX	Incremental (Ausiello 1991)	Tripes (Clark <i>et al.</i> 1989)
GOLD	Algoritmo genético (Davis 1991)	Tripes (Clark <i>et al.</i> 1989)
DockThor	Algoritmo genético (Davis 1991)	MMFF94S (Halgren 1996)

### **1.2.2. Estudos de ADME-Tox**



O sucesso na descoberta de fármacos depende que estes apresentem atividade biológica contra o seu alvo e que passem pelas fases pré-clínica e clínicas. No entanto, a proporção de candidatos a fármacos que ficam suspensos em cada fase ainda se apresenta com índice elevado. Os principais fatores que impedem que esses candidatos a fármacos cheguem ao mercado são a falta de absorção oral, rápido metabolismo, grau de toxicidade decorrente do fármaco, dentre outros (Lin *et al.* 2003, Meanwell 2011).

A predição de propriedades ADME-Tox (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) é uma metodologia que vem sendo muito utilizada na descoberta de fármacos devido ao decréscimo de produtividade na indústria farmacêutica (Meanwell 2011). Os estudos de ADME-Tox permitem estimar quais compostos devem avançar na pesquisa e quais devem ser descartados (Lipinski 2004).

Durante o processo de Pesquisa e Desenvolvimento (P & D) de fármacos é praxe realizar um estudo de predição de propriedades ADME-Tox *in silico* com o intuito de avaliar o perfil farmacocinético, grau de toxicidade, reduzir os gastos com os ensaios biológicos e otimizar o tempo de produção (Lin *et al.* 2003).

Após a comprovação de atividade biológica de um composto, por meio dos testes na fase pré-clínicas, esse composto é encaminhado para a fase clínica até que chegue ao mercado (Dainesi 2006)(Anvisa). A fase clínica é dividida em quatro fases, são elas:

- Fase I: Nessa fase é verificada a segurança do fármaco em um pequeno grupo de pessoas sadias voluntárias (em torno de 20 a 100 pessoas). Analisa-se a farmacocinética e a farmacodinâmica do candidato a fármaco, além do surgimento de efeitos colaterais;
- Fase II: Nessa fase é avaliada a eficácia e possível toxicidade do fármaco em pessoas portadoras de determinada enfermidade em estudo. É testado com um grupo de 100 a 200 pessoas. Avalia-se qual formulação farmacêutica é a mais apropriada e a relação dose-resposta;
- Fase III: Nessa fase é avaliada a segurança e a eficácia do medicamento. O teste é realizado com amplo número de pessoas portadoras de determinada enfermidade em estudo (por volta de 800 pessoas de diferentes partes do mundo). É determinado o perfil

terapêutico do medicamento, como doses, contraindicações, dentre outras; bem como o seu registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa);

- Fase IV: É conhecida também como farmacovigilância, onde o medicamento já presente no mercado é acompanhado. Esse medicamento é investigado para comprovar a sua eficácia e havendo várias notificações de reações adversas já manifestadas ou não, esse medicamento pode ser suspenso do mercado.

Como as propriedades de uma molécula estão relacionadas à sua estrutura química, faz-se necessário o planejamento de um 'drug-like'. Este 'drug-like' tem como finalidade apresentar propriedades físico-químicas compatíveis e perfis de toxicidade que não o suspenda na etapa de Fase I dos testes clínicos (Lin *et al.* 2003).

Os parâmetros analisados no estudo de ADME-Tox (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) para predizer a eficácia de um candidato a fármaco são:

- **Absorção do fármaco:** que pode ser entendida pela passagem do fármaco na bicamada lipídica, por meio de uma via de administração até chegar à circulação sanguínea. Para um fármaco atravessar a bicamada ele deve dispor de características lipofílicas em sua estrutura, entretanto precisa também apresentar características hidrofílicas para que seja distribuído (Brunton 2011);
- **Distribuição do fármaco:** ao ser absorvido, o fármaco será distribuído na circulação sanguínea até alcançar o seu local de ação.
- **Metabolismo:** após, o fármaco será biotransformado chegando no fígado pelo complexo enzimático citocromo P450 (CYP);
- **Excreção:** os resíduos do fármaco decorrentes do metabolismo são eliminados pelo organismo. Essa eliminação ocorre geralmente pelos rins;
- **Toxicidade:** porém, se os resíduos do fármaco decorrentes do metabolismo forem tóxicos, podem produzir efeitos indesejáveis ao paciente (Brunton 2011).

A lipofilicidade da molécula é expressada pelo coeficiente de partição (logP) definido como a relação entre as concentrações de n-octanol e a água. Esse coeficiente serve para estimar a solubilidade de um fármaco, o que significa que se o valor de logP for menor que 1, essa molécula é hidrofílica, mas se o valor for maior que 1, essa molécula é hidrofóbica (Equação 1). A quantidade potencial de ligações de hidrogênio doadores ou aceptadores que o ligante pode formar interfere na permeabilização desse candidato a fármaco na bicamada lipídica (Equação 1) (Lipinski 2001).

$$P = [\text{composto}]_{\text{octanol}} / [\text{composto}]_{\text{água}} \times (1 - \alpha)$$

onde  $\alpha$  é o grau de ionização do composto em água.

Com a finalidade de otimizar o tempo na pesquisa de compostos e ter um direcionamento, foram desenvolvidas ferramentas para acelerar esse processo. A regra dos cinco de Lipinski foi criada por Christopher A. Lipinski em 1997 (Lipinski 1997), e consiste na investigação de propriedades moleculares de um fármaco com administração por via oral em quatro parâmetros. São eles, logP, peso molecular, número de doadores de hidrogênio e número de aceptadores de hidrogênio (Lipinski 2001).

Tais parâmetros apresentam um raio de corte de múltiplos de cinco. Para serem identificados como bons fármacos, o logP não deve ser maior que cinco, o número de doadores de hidrogênio no ligante não deve ser maior que cinco, o número de aceptadores de hidrogênio não deve ser maior que dez e o peso molecular não deve ultrapassar 500 Daltons (Lipinski 2001, Lipinski 2004). O fármaco que se enquadrar nesses parâmetros apresentaria uma boa biodisponibilidade oral.

No entanto, Lipinski considera compostos que agem como substratos de transportadores biológicos como exceções à regra. Tais compostos são vitaminas, antibióticos, antifúngicos e glicosídeos cardíacos (Lipinski 2001).

Outras regras de biodisponibilidade oral também são relevantes, como a regra de Veber, que atesta que o composto deve apresentar ligações rotacionais menor ou igual a 10 e a área de superfície polar deve ser menor ou igual a  $140\text{\AA}^2$  (Veber *et al.* 2002). A regra de Ghose define que o composto deve apresentar um peso molecular de 160Da a 480Da, o logP deve ser entre -0.4 a 5.6 e o número total de átomos do composto deve ser de 20 a 70 (Ghose 1999). Já a regra de

Muegge afirma que o composto deve apresentar um peso molecular entre 200Da a 600Da, o logP deve ser menor ou igual a 5, o número de aceitadores de ligação de hidrogênio deve ser menor ou igual a 10, o número de doadores de ligação de hidrogênio deve ser menor ou igual a 5, o número de ligação rotacionais deve ser menor ou igual a 15 e a área de superfície polar deve ser menor ou igual a 150Å<sup>2</sup> (Muegge 2003).

Atualmente, existem programas livres e outros que necessitam de licença para a sua utilização; bem como servidores *online* que possibilitam a análise de características físico-químicas do composto. Alguns dos programas utilizados são: OSIRIS Property Explorer (Portal), Molinspiration (Cheminformatics 2002), SuperPred (Nickel *et al.* 2014), ProTox (Drwal *et al.* 2014), Mcule (Kiss 2012) e Chemicalize (ChemAxon, Southan 2013). Destacando que, cada programa ou servidor utiliza um banco de dados de fragmentos para realizar uma busca por similaridade para determinar esses parâmetros físico-químicos.

### **1.2.3. OSIRIS Property Explorer**

O programa *OSIRIS Property Explorer* (Portal), desenvolvido pela empresa farmacêutica *Actelion Pharmaceuticals Ltd.*, permite que o usuário que desenhe a estrutura química em 2D, e a partir disso, o programa mensura as características físico-químicas através da comparação com o banco de dados Fluka®, constituído de fragmentos de compostos não *drug-like* e o perfil toxicológico que compara com uma base de dados de Registro de Efeitos Tóxicos de Substâncias Químicas (RTCES).

Os parâmetros avaliados são: cLogP, solubilidade, peso molecular, *Drug-likeness* (relação de similaridade a fármacos presentes no mercado), *Drug-Score* (calcula a possibilidade de se tornar um fármaco); além do risco toxicológico, indicando se o composto é mutagênico, tumorigênico, irritante ou reprodutivo eficaz, por meio de cores: vermelho (alto risco), amarelo (médio risco) e verde (baixo risco). Encontra-se disponível no site <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo> (Portal).

O parâmetro *Drug-Score* é baseado na combinação dos valores de *Drug-likeness*, cLogP, solubilidade, peso molecular e o risco de toxicidade. Para determinar o *Drug-Score* é utilizada uma escala de 0 a 1, quanto mais próximo a 1 significa que o composto tem maior chance a vir se tornar um fármaco. E o parâmetro *Drug-likeness* é mensurado por meio de valores de fragmentos de fármacos conhecidos (Equação 2) (Magalhães 2009).

$$ds = \prod \left( \frac{1}{2} + \frac{1}{2} s_i \right) \cdot \prod t_i$$

$$s = \frac{1}{1 + e^{ap+b}}$$

onde o ds é o *drug-score*; Si são contribuições calculadas pelo logP, solubilidade, peso molecular e *drug-likeness*;  $\pi$  é responsável pela descrição da curva *spline*; a e b são parâmetros (1, -5), (1, 5), (0.012, -6) e (1, 0) para logP, solubilidade, peso molecular e *drug-likeness*, respectivamente; ti são contribuições decorrentes do risco de toxicidade do tipo 4, no qual são atribuídos alguns valores, para nenhum risco é atribuído o valor 1,0; para médio risco é atribuído o valor 0,8; e para alto risco é atribuído o valor 0,6.

Conforme o usuário desenha o composto, o programa cria fragmentos, ou seja, rompe as ligações simples desse composto e a partir disso realiza uma busca por similaridade de fragmentos de fármacos conhecidos ou por fragmentos de compostos que apresentem propriedades de ADME-Tox que persistiram aos ensaios clínicos de Fase II (Lipinski 2001, Walters 2002).

Dado que o OSIRIS salienta esses parâmetros, o utilizamos para avaliar os melhores compostos preditos pela metodologia de *docking*.

#### **1.2.4. Molinspiration Property Calculator**

O *Molinspiration Cheminformatics* é um programa *online* que permite ao usuário desenhar a estrutura química da molécula estudada ou a introduza em formato *smiles*<sup>1</sup>, e está disponível no site <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>. Esse programa tem como função calcular propriedades físico-químicas tais como, logP, área de superfície polar topológica (TPSA) e os descritores da regra dos cinco de Lipinski (Cheminformatics 2002).

O TPSA é um parâmetro que descreve a absorção do fármaco, ou seja, avalia a absorção intestinal, a biodisponibilidade e a permeabilidade hematoencefálica (Cheminformatics 2002).

O programa calcula ainda um *score* de bioatividade da molécula carregada para seis alvos: ligantes de GPCR, moduladores de canais de íons, inibidores de quinase, ligantes de receptores nucleares, inibidores de protease e outros alvos de enzima. Se o valor do *score* for maior que 0, a atividade da molécula é maior contra aquele determinado alvo. Mas se o valor do *score* for entre -5.0 a 0.0 é considerado moderadamente ativo, porém se o valor do *score* for menor que -5.0, significa que a molécula é inativa (Cheminformatics 2002).

### **1.2.5. Superpred Web Server**

O *Superpred* é um servidor *online* que avalia o composto de acordo com o sistema de classificação *Anatomical Therapeutic Chemical* (ATC) por meio de códigos que servem para classificar os compostos, além de propriedades físico-químicas fundamentadas na regra dos cinco de Lipinski. Esse servidor encontra-se disponível no site <http://prediction.charite.de/> (Nickel *et al.* 2014).

A classificação de ATC é dividida em cinco níveis: o nível 1, corresponde ao grupo anatômico principal, o nível 2 corresponde ao grupo terapêutico principal, o nível 3 corresponde a um subgrupo terapêutico/farmacológico, o nível 4 corresponde a um subgrupo terapêutico/farmacológico/químico e o nível 5 é referente a substâncias químicas (Dunkel *et al.* 2008).

---

<sup>1</sup> É uma notação para descrever moléculas, apresentam conectividade para representar moléculas em 2D e em 3D.

A predição é baseada em um pipeline em 3 métodos, busca por similaridade 2D, por similaridade por fragmento e por similaridade 3D. A combinação desses métodos possibilita um estudo mais preciso quanto às características estruturais do composto analisado (Dunkel *et al.* 2008, Nickel *et al.* 2014).

O servidor apresenta a facilidade de carregar a molécula, de acordo com uma das três maneiras que o dispõe e reporta o resultado em torno de 5 a 10 minutos (Dunkel *et al.* 2008, Nickel *et al.* 2014).

O resultado contém a acurácia da predição de ATC e informa o grupo ao que o composto submetido pertence, a sua classe e os parâmetros da regra de Lipinski, e ainda a área de superfície polar (PSA), as ligações rotacionais, a quantidade de anéis presentes no composto, o total de ligações referentes aos átomos do composto e a carga total do composto (Dunkel *et al.* 2008, Nickel *et al.* 2014).

### **1.2.6. ProTox**

O ProTox é um servidor que prediz a toxicidade oral em roedores e mensura doses letais médias orais. Esse servidor analisa os compostos submetidos por intermédio de similaridade 2D de compostos já conhecidos que apresentam doses letais médias (LD50), através da detecção de fragmentos tóxicos contidos no banco de dados SuperToxic (Schmidt *et al.* 2009). Ele ainda sinaliza possível toxicidade contra alvos por intermédio de um conjunto de grupamentos farmacofóricos conhecidos como toxicofóricos. Encontra-se disponível no site <http://tox.charite.de/tox/> (ProTox , Drwal *et al.* 2014).

A predição de LD50 é classificada em seis classes de toxicidade segundo o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS):

- Classe I: Fatal ao ser ingerido ( $LD50 \leq 5 \text{ mg / kg}$ );
- Classe II: Fatal ao ser ingerido ( $5 < LD50 \leq 50 \text{ mg/kg}$ );

- Classe III: Tóxico ao ser ingerido ( $50 < LD50 \leq 300$  mg/kg);
- Classe IV: Prejudicial ao ser ingerido ( $300 < LD50 \leq 2000$  mg/kg);
- Classe V: Pode ser prejudicial ao ser ingerido ( $2000 < LD50 \leq 5000$  mg/kg);
- Classe VI: Não tóxico ( $LD50 > 5000$  mg/kg).

Esse servidor oferece três maneiras de carregar a molécula em estudo. Ao ser carregada a molécula de estudo, o servidor concede em torno de segundos o resultado com as propriedades físico-químicas, a área de superfície polar (PSA), as ligações rotacionais, a quantidade de anéis presentes no composto, o total de ligações referentes aos átomos do composto e a carga total do composto (ProTox, Drwal *et al.* 2014).

Além disso, no resultado consta também a predição de LD50, a predição da classe de toxicidade, uma média de similaridade entre os compostos do banco de dados, gráficos de comparação do peso molecular e de LD50, e indica o fragmento tóxico presente na molécula de estudo (ProTox, Drwal *et al.* 2014).

### 1.2.7. **Mcule**

O Mcule (Kiss 2012) é uma plataforma de desenvolvimento de fármacos gratuita. O *Mcule property calculator* (Mcule 2013) é um servidor *online* que estima as características físico-químicas dos compostos. Esse servidor permite que o usuário desenhe o composto ou introduza em formatos *smiles*, mcule ID, gerando o resultado em segundos. Ele realiza uma busca no banco de dados Mcule para mensurar tais propriedades.

Esse servidor avalia os parâmetros da regra de Lipinski e ligações rotacionais que o composto apresenta. Por exemplo, caso o composto apresente anéis, determina centros de quiralidade R/S, se a molécula possui heteroátomos, átomos inorgânicos, halogênios, e ainda menciona se houve alguma violação quanto à regra de Lipinski (Lipinski 2001) e quanto à regra de Veber (Veber *et al.* 2002).



### **1.2.8. Chemicalize**

O Chemicalize.org é um servidor *online* desenvolvido pelo ChemAxon que estima as características físico-químicas dos compostos. Esse servidor permite que o usuário busque pelo nome do composto, introduza em formato *smiles* ou faça o *upload* do composto (ChemAxon , Southan 2013).

O Chemicalize avalia os parâmetros segundo a regra de Lipinski (Lipinski 2001), bem como a carga total do composto, em qual pH o composto estará na forma protonada, o volume do composto e calcula a quantidade de solvente acessível à área de superfície do composto (ChemAxon , Southan 2013). Ainda, fornece estruturas similares a estrutura em estudo e faz testes em alguns filtros específicos para avaliar a biodisponibilidade oral, tais como o Lipinski (Lipinski 2001), Veber (Veber *et al.* 2002), Ghose (Ghose 1999), Muegge (Muegge 2003).

### **1.2.9. Parametrização dos ligantes**

A parametrização consiste em um conjunto de parâmetros topológicos e observáveis para a completa descrição das interações intra e intermoleculares de um ligante. É realizada usando campos de forças, no entanto, devido à ampla variedade de estruturas químicas, alguns campos de força não possuem os parâmetros para descrevê-los. Para tal, é necessária a parametrização para definir os parâmetros de ligações, cargas, ângulos do ligante em estudo (Vanommeslaeghe *et al.* 2010).

Os campos de força se baseiam na mecânica molecular, semi-empírico ou *ab initio*. Entretanto é necessário o conhecimento para saber qual destes é o mais adequado para a parametrização de seu determinado ligante (Sant'Anna 2009).

Essa parametrização pode ser feita usando programas e servidores *online* baseados em campos de força, como por exemplo, o *general AMBER force field* (GAFF), *CHARMM General Force Field* (CGenFF), PRODRG (Schüttelkopf 2004) que utiliza o campo de força Gromos (Christen *et al.* 2005), dentre outros (Vanommeslaeghe *et al.* 2010).

### **1.2.10. Dinâmica Molecular**

A Dinâmica Molecular (DM) é uma metodologia que auxilia na determinação das características dinâmicas e termodinâmicas do sistema a ser estudado. Associada às equações de movimento de Newton, avalia a evolução temporal da alteração da posição de todos os átomos do sistema. A DM permite mensurar propriedades microscópicas (posições e velocidades dos átomos) e relacioná-las com propriedades macroscópicas (por exemplo, temperatura, pressão) e microscópicas (por exemplo, energia de interação)(Namba 2008).

As simulações de DM necessitam de um campo de força para definir a interação das moléculas presentes no sistema. Para cada sistema é aconselhável analisar qual campo de força é o mais apropriado, porque cada um contém um conjunto de potenciais empíricos específicos para cada sistema, como por exemplo, carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos, ligantes orgânicos, etc (Leach 2001, Namba 2008).

O campo de força é um conjunto de parâmetros que definem as interações para os átomos do sistema estudado, através da definição de uma função de energia potencial. Podendo considerar todos os átomos ou apenas átomos de interesse (Monticelli 2013).

Os campos de forças utilizados nas simulações são o Amber (Pearlman *et al.* 1995), CHARMM (Vanommeslaeghe *et al.* 2010), Gromos (Christen *et al.* 2005), diferindo na parametrização e forma funcional, além de serem específicos para

determinadas classes de moléculas (Durrant 2011). Entretanto, quando o ligante apresenta alguma diferenciação de ligações ou ângulos dos valores estabelecidos pelo campo de força, é atribuído uma penalidade energética (Sant'Anna 2009).

O início da simulação da DM consiste na atribuição de posições e velocidades a todos os átomos e no deslocamento das posições desses átomos no decorrer do tempo, gerando assim as trajetórias conforme o tempo da simulação é prosseguido (Durrant 2011).

A DM é empregada no planejamento de fármacos para avaliar o comportamento das moléculas em estudo ao longo do tempo e sua exposição ao solvente (Alonso 2006, Namba 2008). Por exemplo, permite a análise de um ligante no sítio ativo da proteína, verificando se quando ocorre a ligação do ligante a conformação da proteína se estabiliza ou se altera devido à presença desse ligante. Também é possível verificar por quanto tempo o ligante ficará ligado à proteína, a rede de interações intermoleculares, específicas e não específicas, dentre outras análises (Durrant 2011).

### **1.3 Justificativa**

A busca por novos fármacos que sejam mais eficazes e que tenham menos efeitos adversos é cada vez mais constante no âmbito na pesquisa. A AIDS é considerada uma epidemia, pois atinge milhares de pessoas há mais de 30 anos e está amplamente disseminada no mundo. No decorrer do tempo, as pesquisas contra o HIV têm avançado, mas não o suficiente quanto a capacidade do vírus de se multiplicar e mutar.

Os fármacos NRTIs atualmente presentes no mercado oferecem muitos efeitos adversos, sendo bem agressivos ao paciente, dificultando a sua qualidade de vida. As mutações da proteína no sítio de ligação dos NRTI também têm influência na eficácia do medicamento, visto que a TR apresenta importante variabilidade genética.

Apesar do avanço da tecnologia e da pesquisa com novas técnicas, ainda não foi possível encontrar uma terapia eficiente contra o HIV-1 ao ponto de poder eliminar o vírus do organismo do paciente. Como resultado, são gerados custos elevados por parte do Sistema único de Saúde (SUS) com medicamentos usados na terapia, já que alguns são importados.

Com o auxílio das técnicas computacionais torna-se possível identificar e discernir características estruturais do complexo receptor-ligante. Desse modo, podemos compreender a interação do ligante com o receptor.

Esse projeto tem como foco o estudo de compostos que possam inibir a enzima TR, visto que essa proteína tem uma estrutura muito flexível e é crucial para ciclo do HIV.

A pesquisa por novos candidatos a fármacos para o HIV-1 é um objetivo primordial de pesquisa e desenvolvimento (P&D) em centros de pesquisa, bem como, em Farmanguinhos/Fundação Oswaldo Cruz. Nesse projeto iremos estudar análogos derivados de dois compostos já existentes no mercado: Lamivudina e Abacavir. É importante destacar que não existe até o momento na base de dados *Protein Data Bank* (PDB) (Berman 2000) nenhuma estrutura cristalográfica do Abacavir e/ou da Lamivudina em complexo com a TR.

A colaboração com o laboratório de síntese de Farmanguinhos abre perspectivas promissoras para a identificação de novos compostos protótipos que possam ser utilizados como base para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento quimioterápico da AIDS.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O foco principal desse projeto de dissertação é compreender os possíveis modos de ligação de uma série de ligantes análogos aos fármacos abacavir e lamivudina no sítio ativo da TR.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Determinar as poses dos ligantes da lamivudina e do abacavir e análogos no sítio ativo da TR.
- Analisar as características físico-químicas e possíveis graus de toxicidade dos compostos protótipos.
- Analisar a estabilidade termodinâmica e energética da lamivudina.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. *Docking* Molecular

A metodologia de *Docking* Molecular foi aplicada para prever a interação de possíveis ligantes com a TR. Nesse caso, foi utilizado o programa Glide (Friesner *et al.* 2004, Halgren 2004, Friesner *et al.* 2006, Kroemer 2007) para as simulações.

O programa Glide empregado na realização do *docking* foi fundamental para a TR, dado que trata-se de uma enzima com alto grau de flexibilidade. O programa Glide disponibiliza várias opções de *docking* de maneira eficaz e possui um algoritmo próprio, sendo uma combinação de Monte Carlo e um algoritmo de incremento (Friesner *et al.* 2004, Halgren 2004, Friesner *et al.* 2006, Kroemer 2007).

O programa apresenta uma função de pontuação chamada de *soft docking*, utilizada pelo um algoritmo, permitindo a flexibilidade do ligante e mantendo o receptor rígido (Alonso 2006). O encaixe do ligante no sítio do receptor é avaliado por intermédio de interações interatômicas de *van der Waals*, aumentando a eficácia computacional (Sheng-You 2010).

No cálculo das poses dos ligantes, o programa oferece dois tipos de precisão: SP (*standard precision*) que informa os possíveis encaixes do ligante no sítio da proteína e XP (*extra precision*) que refina esses encaixes, diminuindo a proporção dos falsos-positivos (Cross *et al.* 2009). O programa Glide está incluído no programa Maestro (*A powerful, all-purpose molecular modeling environment*) que é uma interface gráfica que contém vários programas para a visualização, manejo e elaboração de estruturas químicas (Maestro 2012).

### **3.1.1. Preparação do receptor**

A TR foi obtida do banco de dados PDB (PDB ID 1T05) (Tuske *et al.* 2004) e preparada no módulo *Protein Preparation Wizard* (Maestro 2012) do Maestro, que é aplicado para otimizar a estrutura da proteína, cujo pH foi de 7,0. Com a integração do programa *Epik* (Shelley *et al.* 2007), foram analisados os estados de ligação com o íon de magnésio ( $Mg^{+2}$ ), que são possíveis estados de ligação com o ligante. A partir da análise dos estados foi escolhido aquele com menor penalidade energética para compensar as ligações de hidrogênio formadas (Maestro 2012).

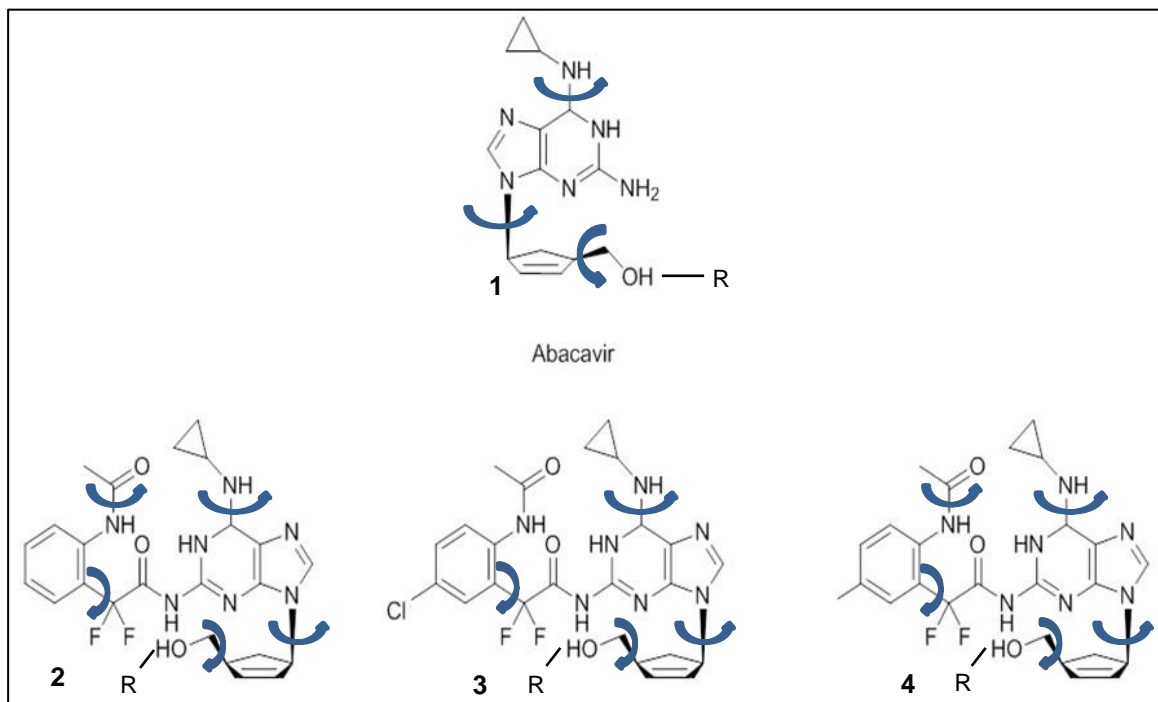
Essa preparação foi feita empregando o campo de força *Optimized Potential for Liquid Simulations* (OPLS2005) (Jorgensen 1988, Jorgensen 1996, Jorgensen 2005) e com uma minimização de convergência de átomos pesados para valores de *root-mean-square deviation* (RMSD) menores que 1Å (Friesner, Banks *et al.* 2004, Halgren, Murphy *et al.* 2004, Friesner, Murphy *et al.* 2006).

### **3.1.2. Preparação dos ligantes**

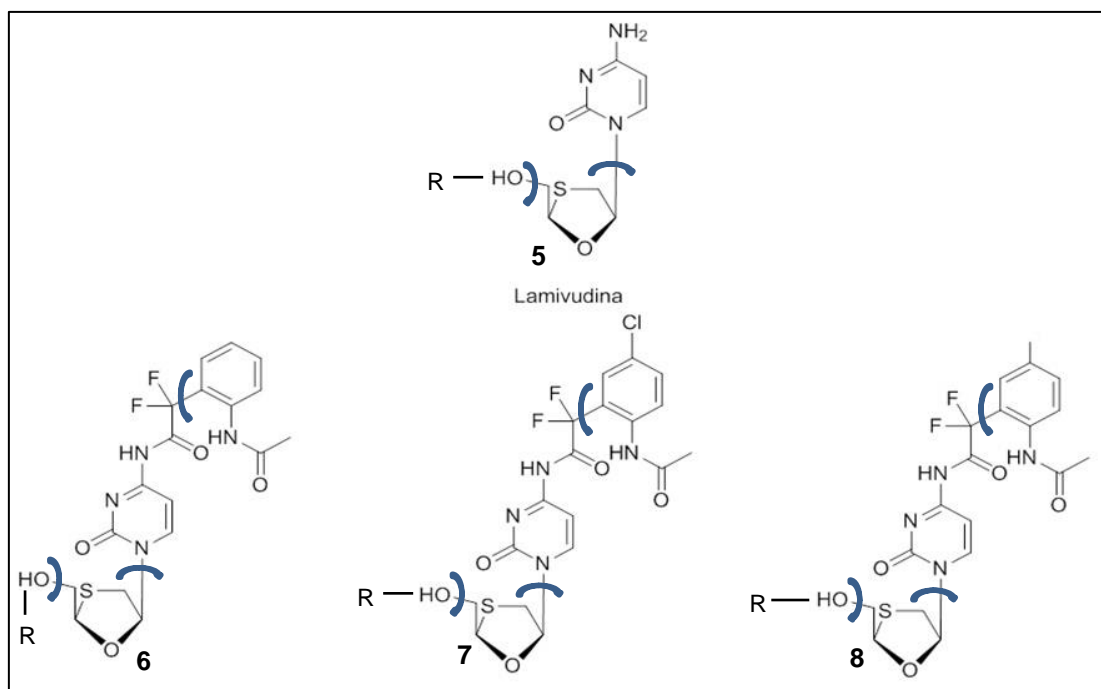
Nesse estudo, as moléculas do Abacavir e da Lamivudina e seus respectivos análogos foram desenhadas no programa Avogadro (Hanwell, Curtis *et al.* 2012) para serem dockadas no sítio nucleosídico da TR.

A preparação dos compostos (1) Abacavir (ABC), (2) ABC-benzeno, (3) ABC-cloro, (4) ABC-metila, (5) Lamivudina (3TC), (6) 3TC-benzeno, (7) 3TC-cloro, (8) 3TC-metila foi realizada no programa *LigPrep* do Maestro, que é designado para corrigir e otimizar a estrutura do ligante, permitindo total flexibilidade (Figuras

10 e 11) (Sundquist 2012). As estruturas dos compostos docados no sítio da TR foram cedidas pelo laboratório de Síntese orgânica de Farmanguinhos.



**Figura 10:** Estruturas do ABC e seus derivados análogos, cedidos por Farmanguinhos, indicando as torções. O radical R é a cadeia trifosfatídica.



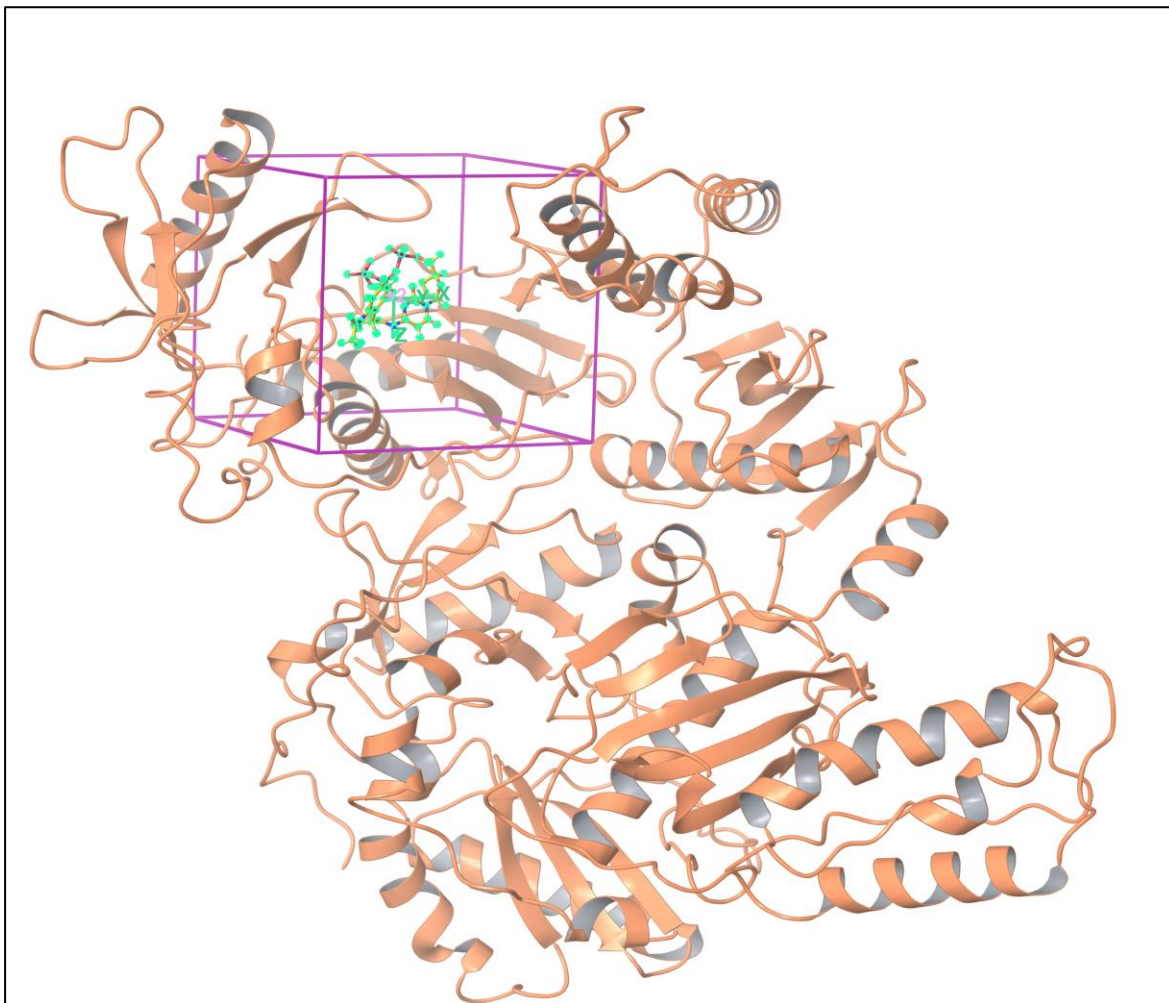


**Figura 11:** Estruturas do 3TC e seus derivados análogos, cedidos por Farmanguinhos, indicando as torções. O radical R é a cadeia trifosfatídica.

### **3.1.3. Grade de simulação**

A grade de simulação foi gerada selecionando como centro dela, o centro geométrico da molécula de Tenofovir, que é o ligante co-cristalizado na estrutura de referência. O programa determina o tamanho da caixa de forma que todos os átomos do ligante e do sítio ativo fiquem incluídos (Figura 12). As dimensões x, y e z da caixa foram de 10Å e o espaçamento da malha foi de 0.25Å.

A grade ainda permite possíveis restrições de átomos, íons ou regiões hidrofóbicas (Friesner *et al.* 2004, Halgren 2004, Friesner *et al.* 2006, Kroemer 2007). Foi utilizado de uma restrição do íon de Magnésio ( $Mg^{+2}$ ) em uma das simulações efetuadas com uma distância de até 3.0Å do íon de magnésio.



**Figura 12:** Representação da *grid* de (10Å) na TR.

### **3.1.4. Docking**

#### **3.1.4.1. Redocking**

Antes de iniciar as simulações de *docking*, foi realizado o *redocking* (Friesner *et al.* 2004) do Tenofovir (TNV) com a estrutura da TR, sob o código 1T05 (Tuske *et al.* 2004) do PDB. Para verificar se a melhor solução do ligante irá se ligar na mesma conformação no sítio ativo conforme se encontra na estrutura cristalográfica. Essa comparação é baseada pelo RMSD, confirmando assim a precisão do programa utilizado.

O *redocking*, que é um protocolo de validação da eficiência do algoritmo do *docking*, é baseado na retirada do ligante do sítio ou local ao qual se interage para recolocá-lo realizando a simulação de *docking*.

#### **3.1.4.2. Cross-docking**

O *cross-docking* (Friesner *et al.* 2004) é baseado na retirada de um ligante de uma estrutura cristalográfica para testá-lo em outra estrutura cristalográfica equivalente, diferente da original onde o ligante foi cristalizado.

Foi empregado o *cross-docking* na análise da estrutura da zidovudina (AZT) em complexo com a TR no sítio nucleosídico (código PDB ID 3V4I) (Martinez *et al.* 2012). Foi observado a semelhança estrutural da lamivudina com a estrutura do AZT, que também apresenta na sua composição a cadeia trifosfatídica (TP) aderida ao grupo hidroxila na posição 3' do anel oxatiolano. Assim, foi realizado o *cross-docking* utilizando a molécula AZT na estrutura da TR (1T05) com o objetivo de verificar se o AZT irá ter o modo de ligação parecido conforme o TNV se liga no sítio.

#### **3.1.4.3. Simulações de Docking**

As simulações de *docking* foram realizadas de acordo com três procedimentos:

i) Sem a inclusão da cadeia TP nos compostos (1) e (5) e nem em seus análogos. Os resultados dessa simulação foram comparados com o modo de ligação do ligante TNV.

A energia de interação receptor-ligante foi determinada através do valor de Emodel e do *Glidescore*. O Emodel promove uma estimativa da energia conformacional do ligante, por meio de uma combinação do *Glidescore*, energia de interação *van der Waals* (vdW) e energia interna. A função de *Glidescore* é uma função de pontuação empírica que consiste na combinação de um conjunto de termos eletrostáticos, de *van der waals*, dentre outros, ideal para ranquear ligantes diferentes. (Friesner *et al.* 2004, Halgren, Murphy *et al.* 2004, Friesner *et al.* 2006)

ii) Adição de uma cadeia de trifosfato às moléculas lamivudina e abacavir e todos os análogos derivados. Nas poses obtidas pelo *docking*, foi calculado o valor de RMSD da cadeia trifosfato da cada análogo com a cadeia TP do TNV.

iii) Restrição de distância do íon Magnésio ( $Mg^{+2}$ ) com os átomos de oxigênio da cadeia TP, visto que é uma ligação eletrostática importante para o modo de ligação da TR. Essa abordagem foi baseada na observação das estruturas experimentais do banco de dados PDB, como o 1T05 (Tuske *et al.* 2004), 1T03 (Tuske *et al.* 2004) e 3V4I (Martinez *et al.* 2012).

Com as simulações de *docking*, foi possível discernir quais foram os melhores ligantes de acordo com os parâmetros de XPscore, RMSD da cadeia TP e a análise da pose do composto.

### 3.2. Predição de propriedades ADME-Tox

Com base nas predições realizadas pelo *docking*, foi feita a predição de propriedades ADME-Tox. Nesse procedimento foram utilizados programas e servidores disponíveis na *web* que predizem os parâmetros físico-químicos do ligante e alguns ainda, predizem a possível toxicidade que o ligante possa apresentar. Assim, os servidores utilizados foram: OSIRIS Property Explorer

(Portal), Molinspiration (Cheminformatics 2002), SuperPred (Nickel *et al.* 2014), ProTox (Drwal *et al.* 2014), Mcule (Kiss 2012) e Chemicalize (ChemAxon , Southan 2013).

Todos os servidores foram empregados utilizando os parâmetros na forma padronizada definidos pelo servidor (*default*).

### 3.3. Parametrização do ligante 3TC (Lamivudina)

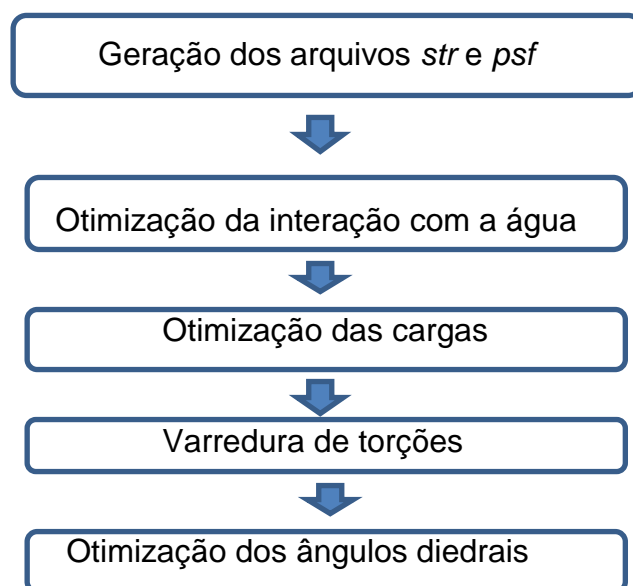
Inicialmente, as cargas atômicas foram calculadas pelo servidor *Paramchem*, disponível no site: <http://www.paramchem.org> (ParamChem), empregando o campo de força CHARMM *General Force Field* (CGenFF) (Vanommeslaeghe *et al.* 2010, Yu 2012).

O carregamento dos compostos pode ser em formato *mol2* ou *pdb*, ao fazer o *upload* o servidor reporta um arquivo com extensão *str*, onde constam todos os átomos do composto numerados, a carga de cada um, as ligações entre os átomos, os ângulos planos, os ângulos diedrais e os ângulos impróprios. Esse arquivo *str* ainda mostra as penalidades de cada átomo e dos ângulos diedrais (ParamChem) outorgadas em função de parametrizações de compostos conhecidos.

Para corrigir essas penalidades identificadas pelo *Paramchem* foi utilizada a ferramenta *Force Field Toolkit* (ffTK) (Mayne *et al.* 2013), incluída no programa *Visual molecular dynamics* (VMD), disponível no site <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/> (VMD , Humphrey 1996). Essa ferramenta possibilita a parametrização de ligantes passo a passo e tem a incorporação do programa Gaussian09 (Frisch *et al.* 2009) que avalia a estrutura eletrônica do composto, além de outras funcionalidades. As simulações realizadas no programa Gaussian09 foram executadas no Núcleo de Computação Científica da Universidade Estadual Paulista (<http://www.unesp.br/portal#!/gridunesp>).

A parametrização é realizada em etapas, onde cada uma delas consiste na otimização de um parâmetro. Assim, a parametrização é iniciada com a preparação de sistema, gerando o arquivo com extensão *psf* contendo a descrição das interações ligadas e não ligadas das moléculas, depois com a otimização da interação com a água, otimização das cargas a partir de interações com a água e por fim, a otimização dos ângulos diedrais (Figura 13) (Mayne *et al.* 2013). O arquivo *pdb* do composto foi gerado pelo Avogadro (Hanwell *et al.* 2012). Ele contém as coordenadas x, y e z de todos os átomos do composto.

A geração do arquivo *psf* foi feita no VMD com a ferramenta *Automatic PSF Builder* a partir dos arquivos *pdb*, *str* do composto e o arquivo do campo de força para os ligantes *par\_all36\_cgenff.prm*. Esse arquivo contém cargas de todos os átomos, as ligações entre os átomos, os ângulos, os ângulos diedrais e os ângulos impróprios (VMD, Humphrey 1996).



**Figura 13:** Fluxograma do processo de parametrização.

A otimização da interação com a água, avalia perfis de cargas parciais dos átomos que interagem com a água do tipo *Transferable Intermolecular Potentials 3* (TIP3P) (Jorgensen *et al.* 1983). Nessa etapa, o composto é exposto à água e os átomos que interagem com a mesma são classificados como doadores ou aceptores, formando ligações de hidrogênio (Mayne *et al.* 2013).

Em seguida, é estabelecida a otimização de grupos de carga, em que é atribuída uma carga inicial e um limite de valores que a carga desses átomos deve apresentar. O fTK permite ao usuário que altere os valores da carga inicial e

do limite de variação. A atribuição dessas cargas se realiza a partir de uma base de conectividades que identifica o grupo de átomos semelhantes e atribui valores a esses átomos a cada passo gerado, gerando finalmente um novo arquivo *psf* modificado do composto (Mayne *et al.* 2013).

Posteriormente, ocorre a otimização dos ângulos diedrais, os ângulos diedrais são determinados e otimizados a partir do conjunto MP2/6-31G(d) compatível com o campo de força CHARMM, utilizando o algoritmo *Simulated annealing*. Para a parametrização de cada diedro são necessários dois arquivos de entrada pro Gaussian (Frisch *et al.* 2009) em formato *gau*, no primeiro deles se faz uma varredura no sentido positivo do ângulo e no outro no sentido negativo para que assim, a ferramenta seja capaz de explorar conformações entre valores extremos previamente definidos (Mayne *et al.* 2013).

Vale lembrar que um ângulo diedral é formado por quatro átomos ligados. Após o cálculo de energia do diedro escaneado, as ligações entre os átomos envolvidos são ajustadas de forma que não se altere a otimização dos diedrais (Mayne *et al.* 2013).

### 3.4. Dinâmica Molecular

A DM foi utilizada para avaliar propriedades dinâmicas e termodinâmicas do sistema complexo receptor-ligante. Para tal, empregamos o programa NAMD (Namd , Phillips *et al.* 2005), disponível no site <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>, por realizar simulações em sistemas que apresentam um grande número de átomos (Phillips *et al.* 2005). É necessário a preparação do sistema antes de realizarmos a simulação de dinâmica molecular.

O complexo receptor-ligante foi solvatado com o tipo de água TIP3P (Jorgensen *et al.* 1983) numa caixa de simulação triclínica. Em seguida, foi feita a ionização do sistema, na qual são adicionados contraíons para neutralizar o sistema e evitar artefatos computacionais no cálculo das interações eletrostáticas levadas em conta pelo método de *Particle mesh Ewald* (PME) (Darden 1993). No

nosso caso particular, foram adicionados 10 íons de cloro ( $\text{Cl}^-$ ) e 1 íon de magnésio ( $\text{Mg}^{+2}$ ). A distância entre o soluto e íons de  $\text{Cl}^-$  foi de 8 Å.

As simulações de DM foram realizadas com o campo de força CHARMM (Vanommeslaeghe *et al.* 2010) e o sistema apresenta em torno de 131.000 átomos.

As equações de movimento foram integradas utilizando o algoritmo de Verlet com velocidades, usando um passo de integração de 2 fs, completando um tempo total de simulação de 37 nanossegundos (ns).

As simulações foram realizadas no conjunto estatístico de Gibbs, a temperatura de 310 K e pressão de 1 atm, usando os algoritmos da dinâmica de Langevin e o Pistão de Langevin para o controle da pressão. Condições periódicas de contorno foram aplicadas para evitar efeitos de superfície.

Posteriormente, foi realizada a minimização do sistema que é compreendida pela alteração da conformação da molécula de forma que esse ajuste a disponha numa conformação de menor energia. Essa minimização foi realizada num tempo de 50000 passos, aplicando o algoritmo de *steepest descent* e com uma restrição dos átomos de carbonos alfa da proteína aplicando uma força harmônica repositiva de constante de força de 1 kcal/mol/Å<sup>2</sup>.

A fase de equilibração do sistema foi realizada durante 250ns. As configurações foram salvas cada 2,5 ns para análise das propriedades termodinâmicas e estruturais.

Os parâmetros da minimização, equilibração e da dinâmica são mostrados no anexo A.



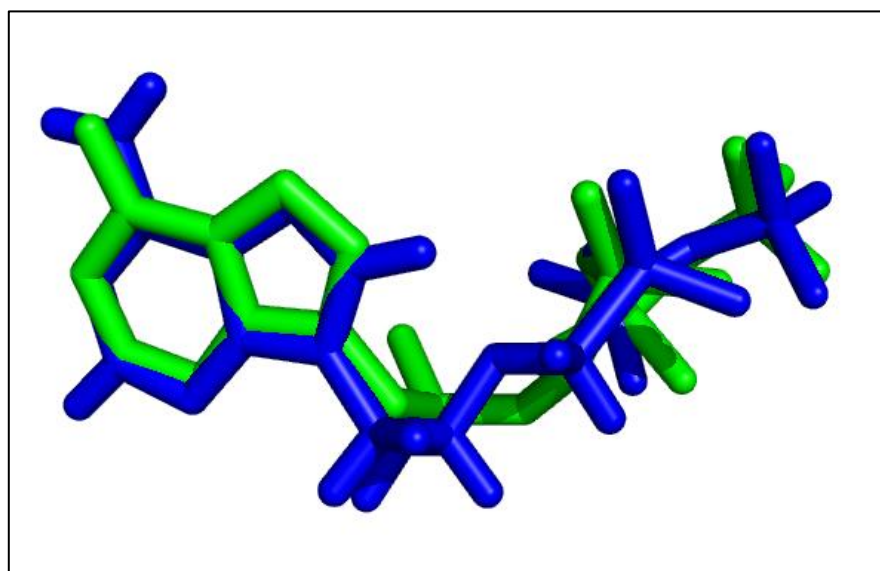
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Docking Molecular

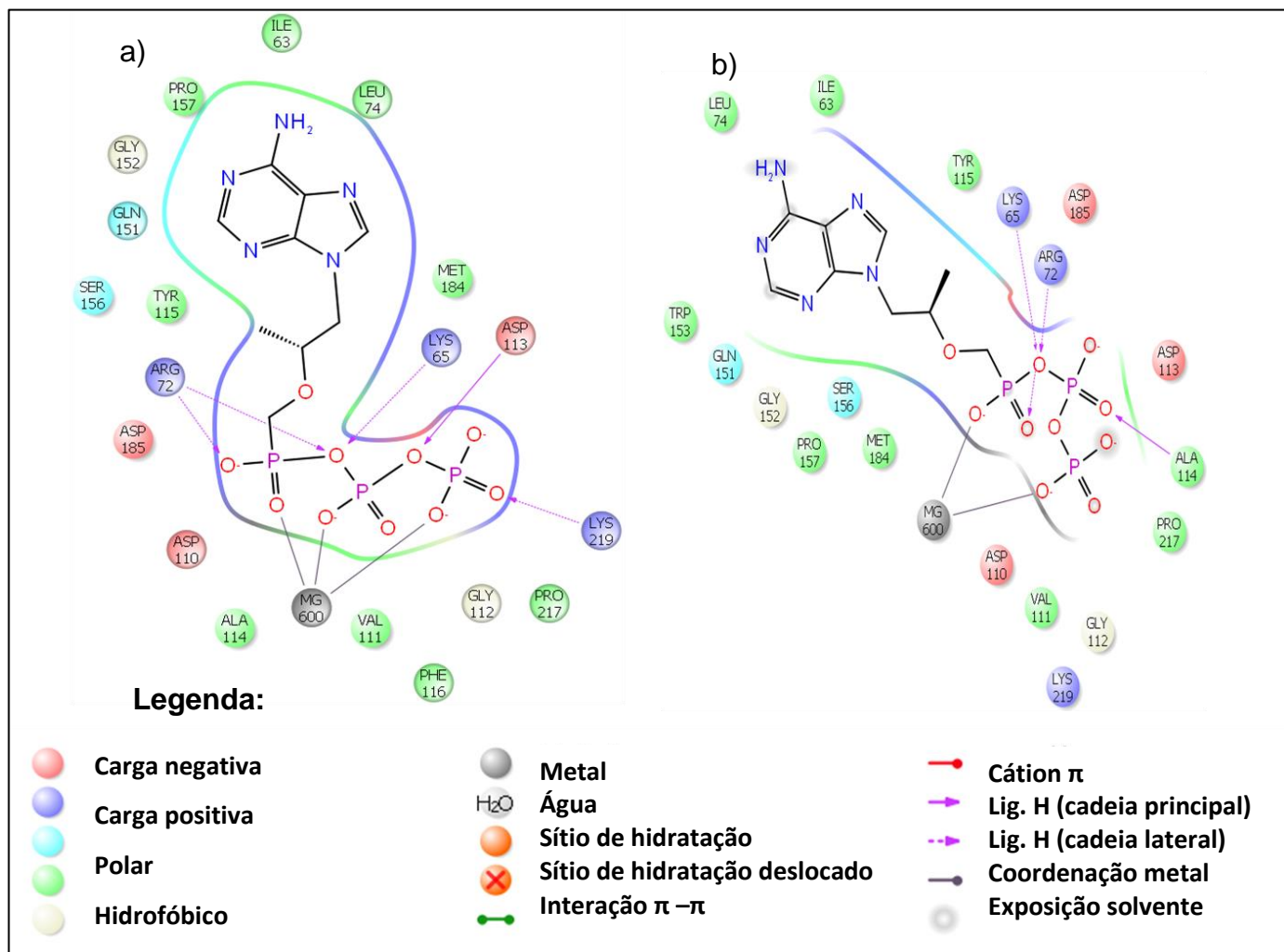
#### 4.1.1. Redocking

##### 4.1.1.1. Redocking do Tenofovir

O resultado do *redocking*, utilizado para validar a eficiência do algoritmo de docagem foi realizada com o programa Glide, no qual efetuamos o *docking* do próprio ligante, TNV na estrutura 1T05. A comparação do posicionamento do TNV cristalográfico com o TNV *redocado*, confirma a precisão do Glide, visto que a pose gerada pelo *redocking* apresenta um RMSD de 0.8Å quando comparado com o TNV cristalográfico (Figura 14). As interações entre o TNV cristalográfico e o TNV *redocado* apresentam interações conservadas com os resíduos Arg72, Lys65 e com o íon  $Mg^{+2}$ , conforme mostrado na figura 15.



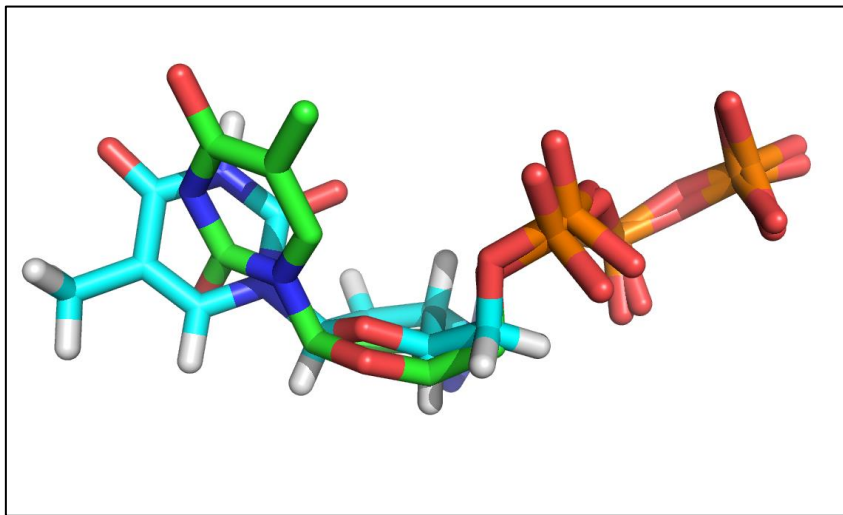
**Figura 14:** Visualização do *redocking* do TNV. Em verde, TNV do PDB 1T05 e em azul, pose do TNV *redocado*. A pose *redocada* apresenta um valor de RMSD de 0.8 Å.



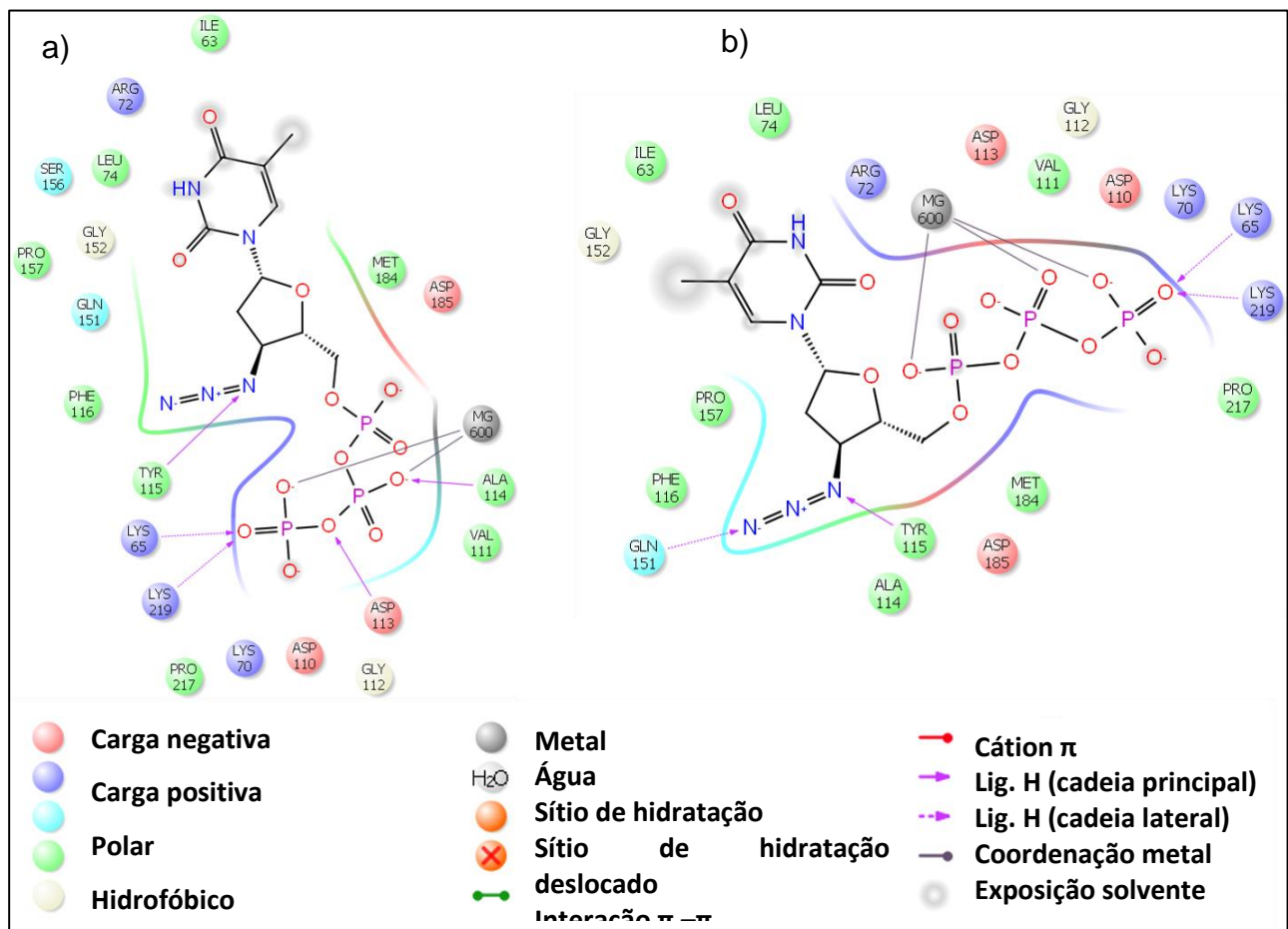
**Figura 15:** (a) Mapa de interação do TNV cristalográfico e (b) mapa de interação do TNV *redocado*, confeccionados pelo programa Maestro.

#### 4.1.1.2. Redocking da Zidovudina

Realizamos o *redocking* da Zidovudina (AZT) utilizando a estrutura 3V4I (Martinez et al. 2012). A comparação do posicionamento do AZT cristalográfico com o AZT *redocado*, confirma também a precisão do Glide, visto que a pose gerada pelo *redocking* apresenta um RMSD de 1.4 Å quando comparado com o AZT cristalográfico (Figura 16). As interações entre o AZT cristalográfico e o AZT *redocado* apresentam interações conservadas com os resíduos Lys65, Tyr115, Lys219 e com o íon  $Mg^{+2}$ , conforme mostrado na figura 17.



**Figura 16:** Visualização do *redocking* do AZT. Em verde, AZT do PDB 3V4I e em azul, pose do TNV redocado. A pose redocada apresenta um valor de RMSD de 1.4 Å.

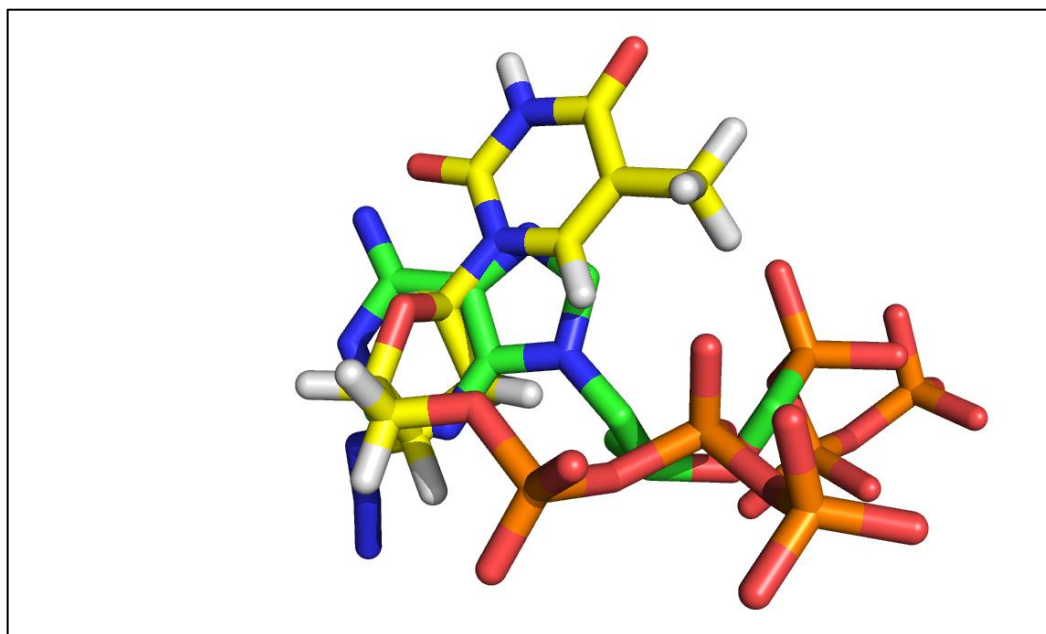


**Figura 17:** (a) Mapa de interação do AZT cristalográfico e (b) mapa de interação do AZT redocado, confeccionados pelo programa Maestro.

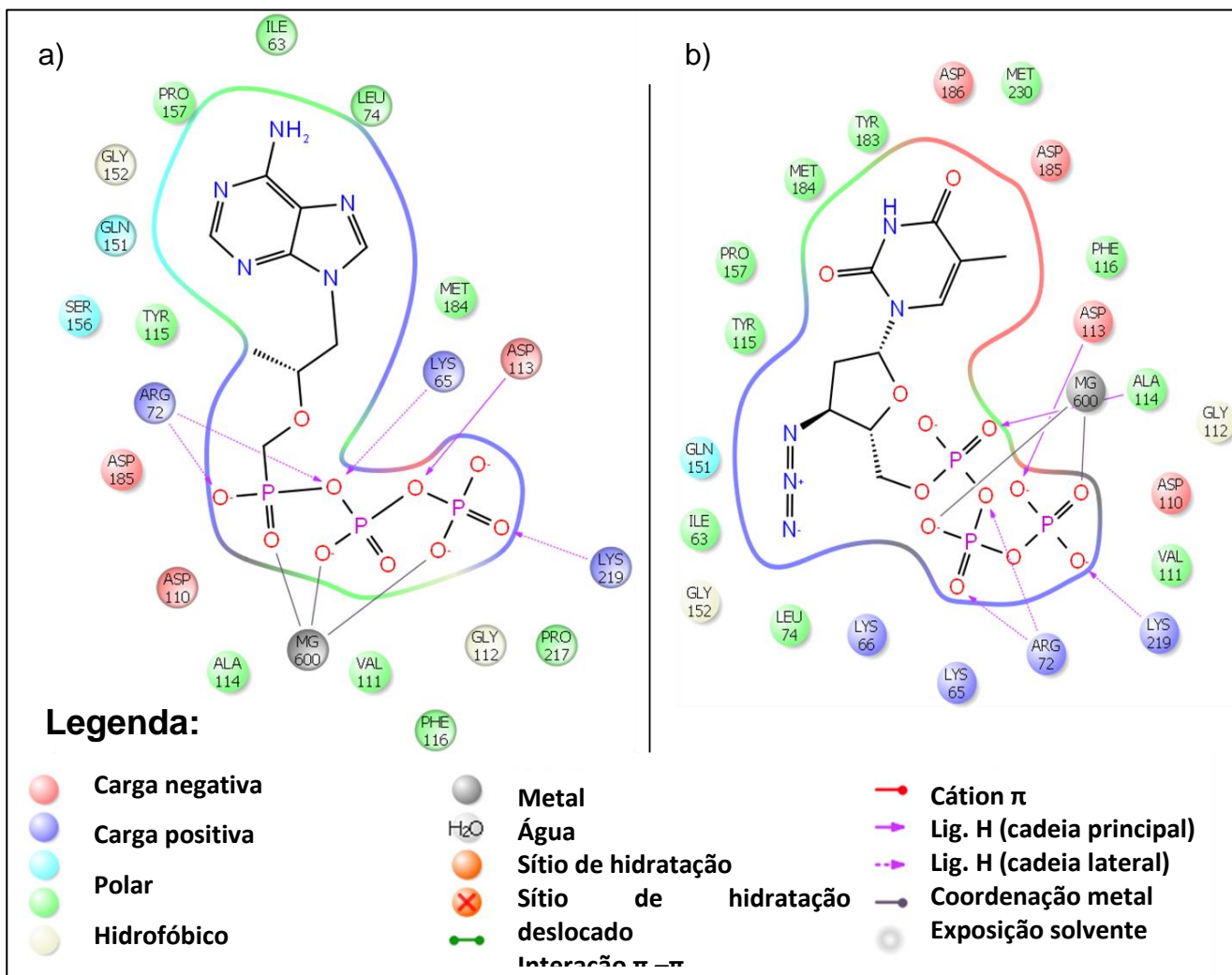
#### 4.1.2. Cross-Docking

Posteriormente, foi realizado o protocolo de *cross-docking* com o AZT na estrutura do 1T05. Esse protocolo confirmou o modo de ligação do AZT no sítio da polimerase, uma vez que o AZT e o TNV possuem estruturas similares e uma cadeia trifosfatídica. A pose gerada pelo *cross-docking* obteve um RMSD da cadeia trifosfatídica entre o TNV e o AZT de 1.9 Å, conforme mostrado na figura 18.

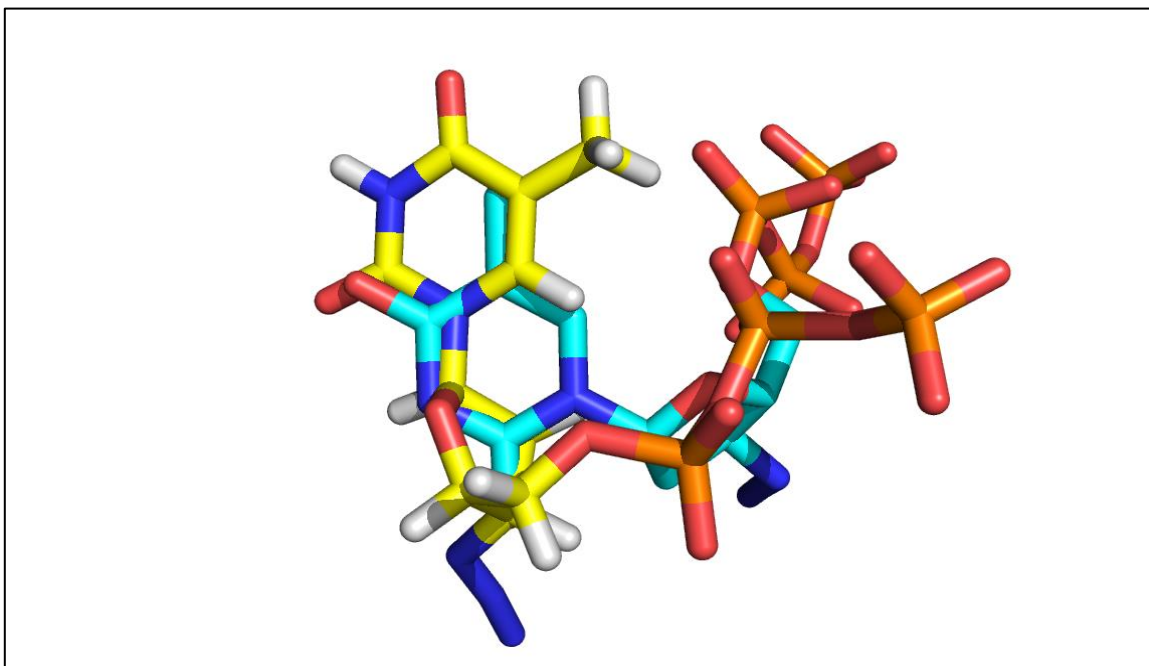
Afim de verificar as interações semelhantes de ambos os compostos no sítio ativo da TR, foram analisados as interações do AZT e do TNV. As interações equivalentes dos compostos são com os aminoácidos Arg72, Asp113, Lys219 e com o íon  $Mg^{+2}$ , mostrado na Figura 19. Ainda assim, a estrutura do ligante AZT cristalográfico foi alinhado com o AZT docado na 1T05, obtendo um RMSD de 4.5 Å, representado na Figura 20.



**Figura 18:** Pose do AZT (Amarelo) e do TNV (verde), ambos na estrutura 1T05 com um RMSD de 1.9 Å.



**Figura 19:** Mapas de interações do TNV cristalográfico, (b) mapa de interações do AZT na estrutura 1T05.



**Figura 20:** Alinhamento do AZT cristalográfico (PDB ID 3V4I) (Das, Martinez et al. 2012), destacado em azul e do AZT docado na 1T05, destacado em amarelo com um RMSD dos ligantes de 4.5 Å.

#### **4.1.3. Simulações de Docking**

O estado de ligação do  $Mg^{+2}$  escolhido por apresentar menor penalidade energética foi de 0.19 Kcal/mol. A preparação da proteína foi feita com uma minimização de convergência de átomos pesados a um valor de RSMD de 0.90 Å. As simulações foram realizadas utilizando o XPscore.

Os resultados do primeiro procedimento sem a cadeia TP não foram favoráveis, em comparação com os do segundo procedimento de *docking*, considerando o parâmetro Emodel, pois no primeiro procedimento o parâmetro de Emodel se manteve acima de -100 kcal/mol, atingindo valores altos. Porém, no segundo procedimento o parâmetro de Emodel alcançou valores muito abaixo de -100 kcal/mol, em torno de -120 a -165 kcal/mol.

A tabela 4 apresenta os valores dos parâmetros de saída do programa Glide do primeiro procedimento (sem a cadeia TP) referentes aos 8 compostos. Também

constam os parâmetros Gscore, Emodel, Ligação de hidrogênio e interações de *van der Waals*.

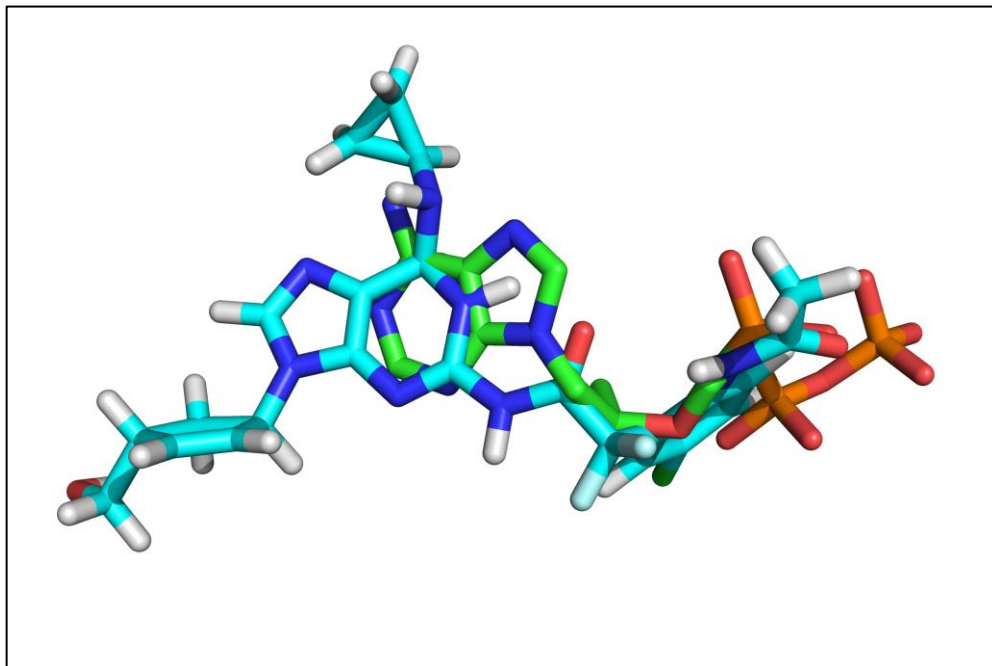
O composto **3** apresentou o menor valor de XPscore e de Emodel em comparação com os outros compostos. A Figura 21 demonstra o modo de ligação da melhor pose do composto **3** comparado com o TNV cristalográfico, com um valor de XPscore -7.49 e de Emodel de -94.5 kcal/mol. A Figura 22 mostra o mapa de interações do composto **3** com os aminoácidos do sítio ativo da TR. O composto **3** realiza interações com os seguintes aminoácidos Arg72 e Gly152, além do íon Mg<sup>+2</sup>.

Todos os compostos analisados realizam interações íon-dipolo com o íon Mg<sup>+2</sup>. Alguns compostos realizam interação  $\pi$ -cátion com o aminoácido Arg72. Estes dados encontram-se no anexo B.

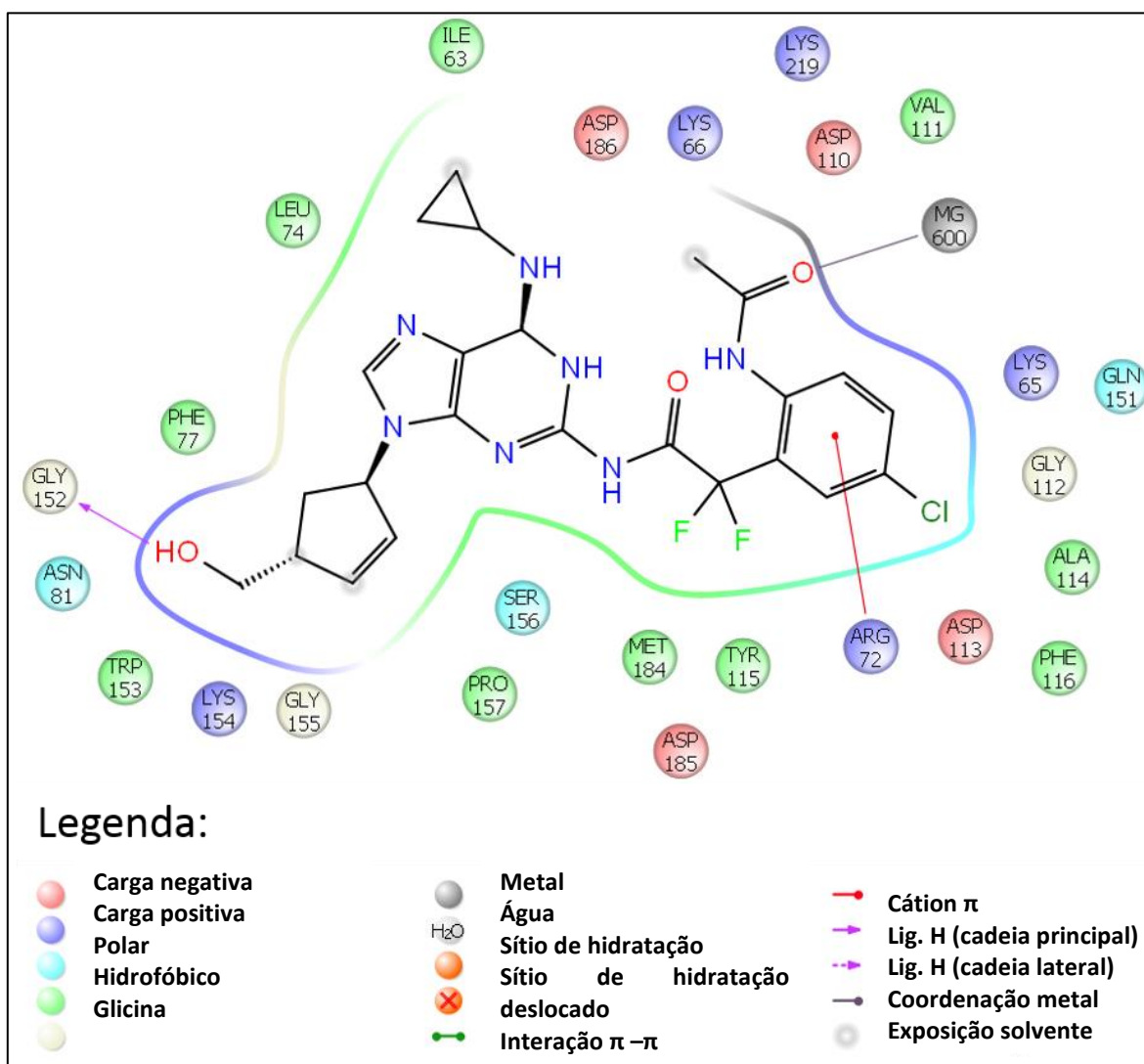
**Tabela 4. Classificação dos compostos de acordo com os parâmetros de saída do programa Glide.**

Compostos	XPscore	Emodel (kcal/mol)	Ligação de hidrogênio (kcal/mol)	vdW (kcal/mol)
1	-5,67	-45,8	-0,4	-22,8
2	-7,28	-84,2	-0,8	-40,9
3	-7,49	-94,5*	-0,6	-40,0
4	-7,38	-84,3	-0,9	-43,4
5	-5,37	-46,3	-0,9	-19,4
6	-5,12	-72,8	-1,3	-30,4
7	-7,33	-85,0	-1,5	-29,6
8	-7,25	-79,5	-1,5	-28,9

\*Composto que apresentou menor valor de XPscore.



**Figura 21:** Representação da comparação do composto 3 (cinza) comparado com o TNV cristalográfico (verde).



**Figura 22:** Mapa de interação do composto 3 no sítio da TR.



No segundo procedimento, com a adição da cadeia TP, foi possível observar um considerável decréscimo dos valores de Emodel e Gscore, bem como uma melhoria nas poses dos análogos, quanto à sobreposição aos anéis purínicos e pirimidínicos em relação ao primeiro procedimento, mostrado na tabela 5. Nessa tabela são apresentados os seguintes parâmetros de saída do programa Glide: Emodel, RMSD da cadeia TP, Ligação de Hidrogênio e Interações de *van der Waals*.

Dentre os compostos avaliados, o composto **1** (ABC), foi o composto que apresentou menor valor de RMSD da cadeia TP. A Figura 23 mostra a pose do composto **1** em comparação com o TNV cristalográfico que apresenta um valor do parâmetro de Emodel de -134.1Kcal/mol e um RMSD de 0.657Å da cadeia TP comparando com a cadeia TP do TNV.

Segundo o parâmetro de Emodel, os melhores compostos foram o **3** e o **6**, derivados do ABC e do 3TC, respectivamente. A Figura 24 mostra a comparação da melhor pose da cadeia TP do composto **3** de (Emodel de -163.3 Kcal/mol e um RMSD de 0.669Å) com a cadeia TP do TNV. A comparação da melhor pose da cadeia TP do composto **6** de (Emodel de -163.2 Kcal/mol e um RMSD de 2.843Å) com a cadeia TP do TNV é mostrada na figura 27.

As Figuras 25 e 26 apresentam os mapas de interações dos compostos **3** e **6** de acordo com o menor valor de Emodel. Os dois compostos apresentam interação de ligação de hidrogênio com as cadeias laterais dos resíduos, Arg72, Lys219, e realiza interação de ligação de hidrogênio com a cadeia principal do resíduo Asp113 e com o íon  $Mg^{+2}$ .

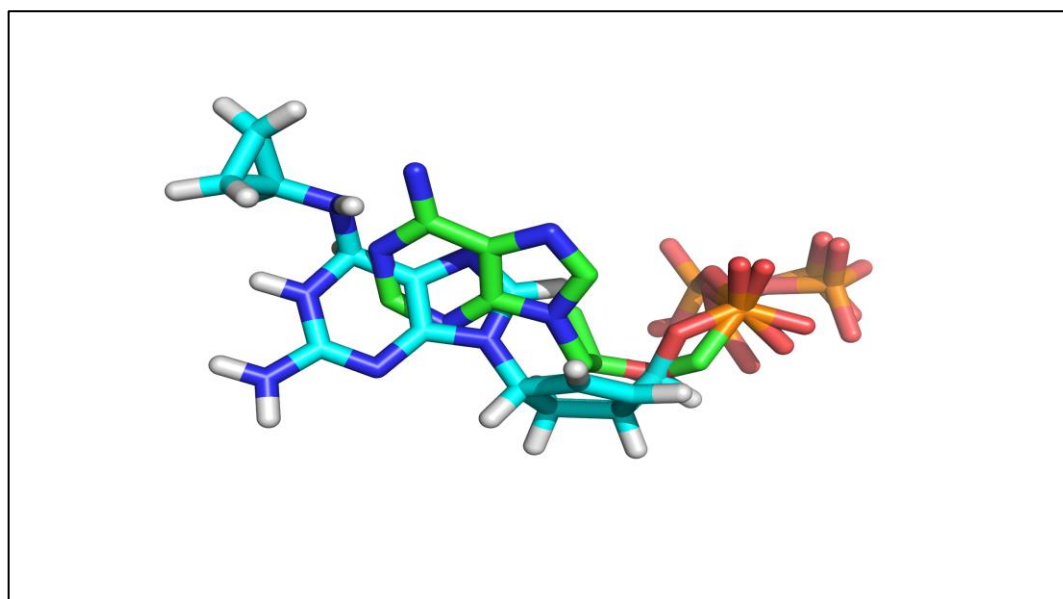
Os mapas de interações dos outros compostos são mostrados no anexo C. Vale ressaltar que todos os compostos desse procedimento efetuaram interação de ligação de hidrogênio com a cadeia lateral do resíduo Arg72 e com o íon  $Mg^{+2}$ , mas no composto **4** a Arg72 estabeleceu também interação  $\pi$ -cátion com o anel imidazólico do composto.

Como a cadeia TP foi adicionada aos compostos, foram analisadas as interações que o AZT realiza no sítio da TR com o intuito de comparar se há interações conservadas. A figura 28 apresenta as interações do composto **5** (3TC) e do AZT, dado que suas estruturas são similares. De acordo com esta análise, foram constatadas que algumas interações são conservadas em relação aos dois compostos, pois realizaram interação de ligação de hidrogênio com as cadeias laterais dos seguintes resíduos: Arg72, Lys65 e Lys219.

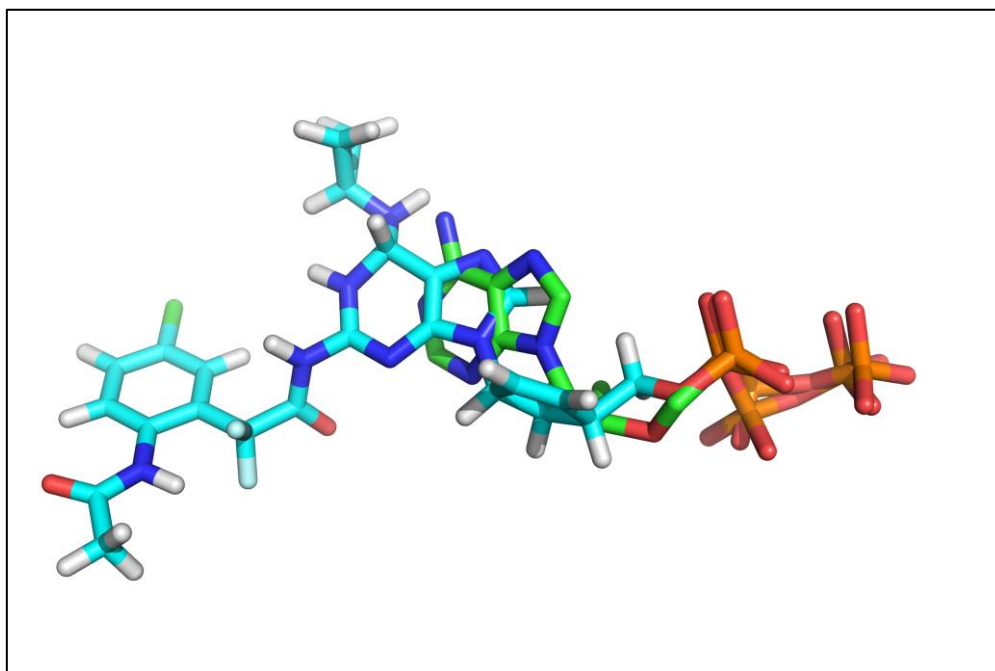
**Tabela 5. Relação dos compostos de acordo com os parâmetros de saída do programa Glide.**

Compostos	XPscore	Emodel (kcal/mol)	RMSD (Å)	Ligação de Hidrogênio (Å)	vdW (kcal/mol)
1	-10,09	-134,1	0,657*	-3,3	-27,3
2	-10,68	-154,8	3,136	-3,0	-43,6
3	-10,84	-163,3	0,669*	-3,4	-43,6
4	-9,35	-155,5	2,742	-2,6	-27,2
5	-9,13	-128,9	2,631	-3,3	-45,2
6	-9,69	-163,2	2,843	-3,1	-36,0
7	-8,78	-158,0	2,454	-3,4	-37,2
8	-8,52	-152,3	2,194	-3,1	-36,7

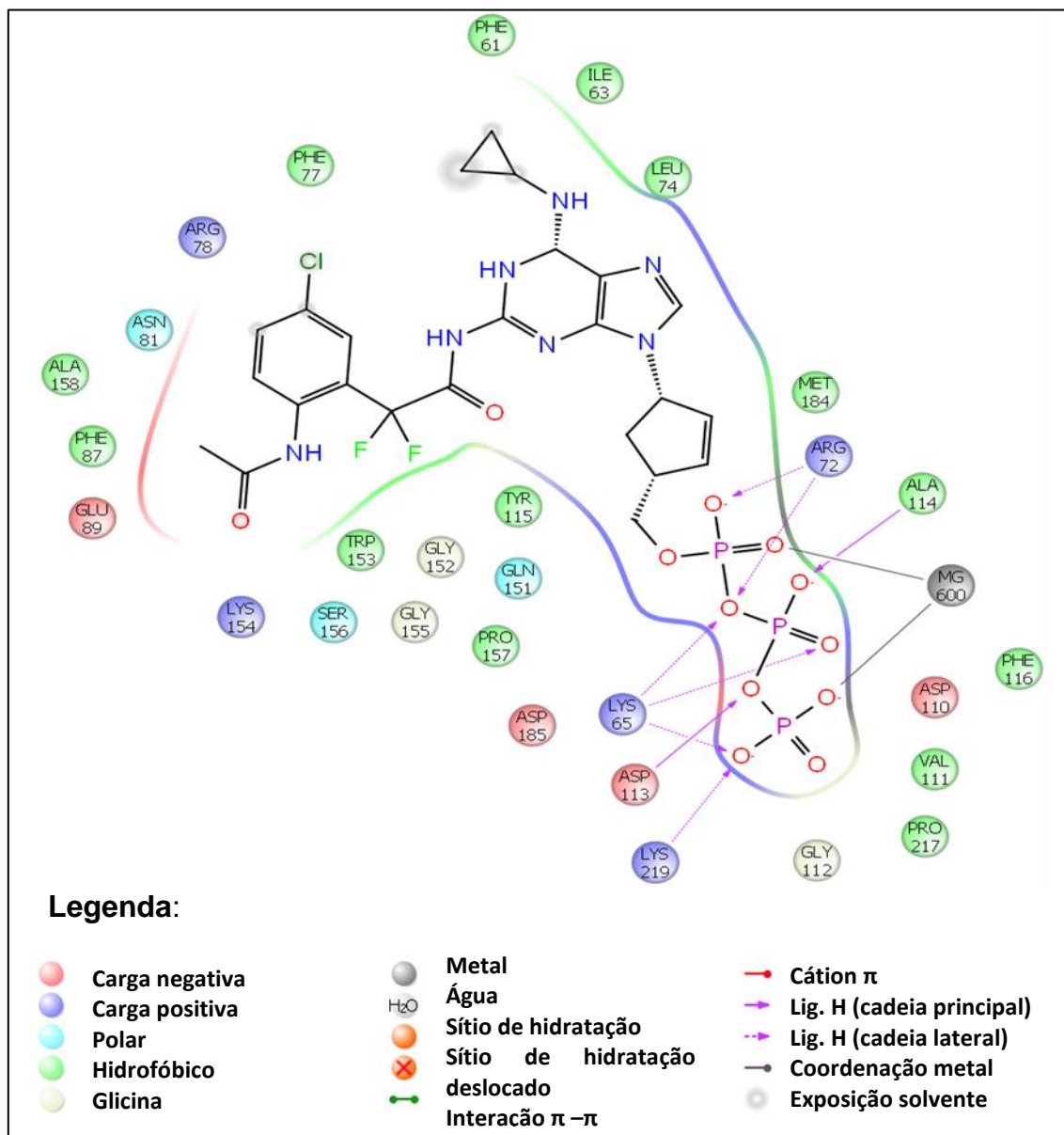
\*Compostos que apresentaram menores valores de RMSD.



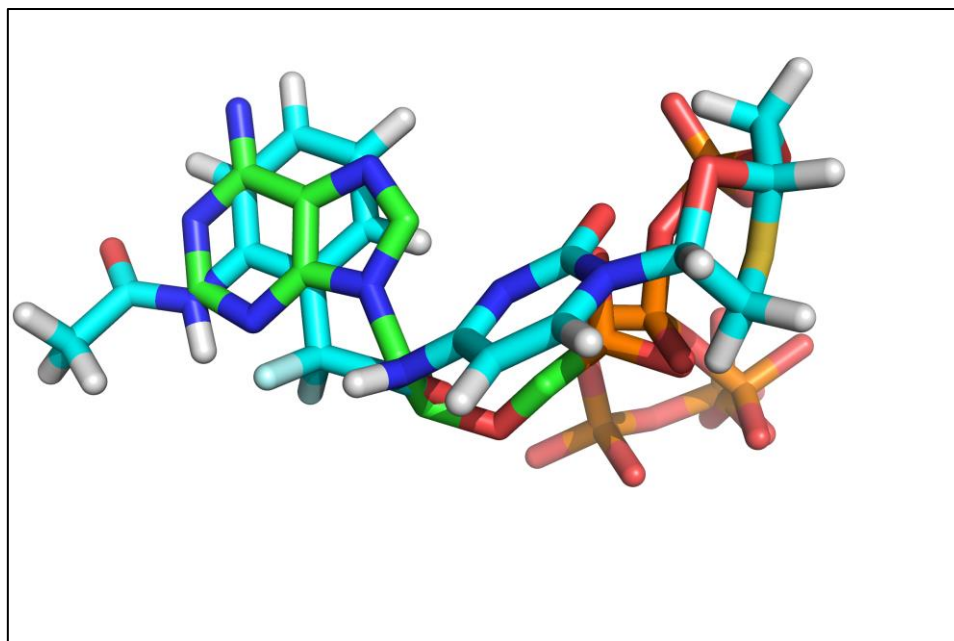
**Figura 23:** Representação da comparação do composto 1 - ABC (azul) com a cadeia TP com o TNV (verde) apresentando um valor RMSD de 0.657Å.



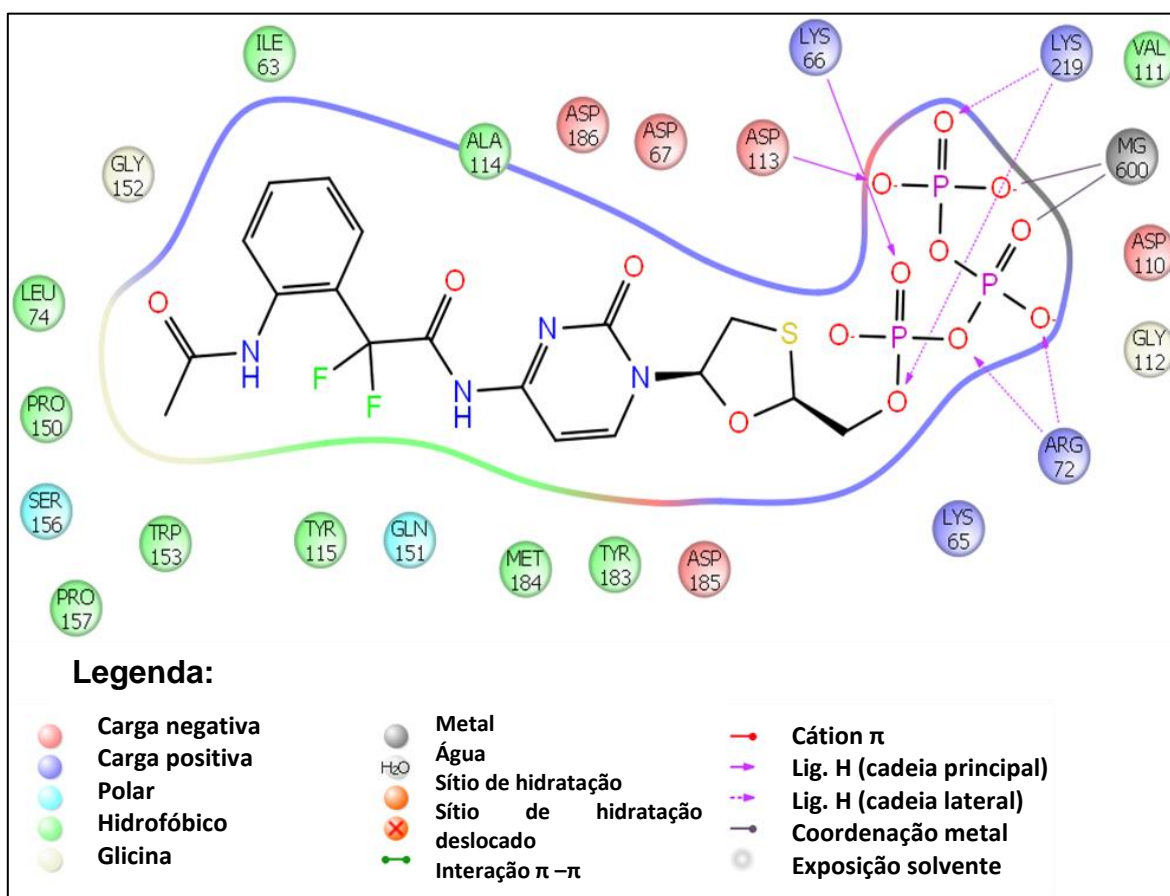
**Figura 24:** Representação da comparação do composto **3** (azul) com a cadeia TP com o TNV (verde), apresentando um valor de RMSD de 0.669Å.



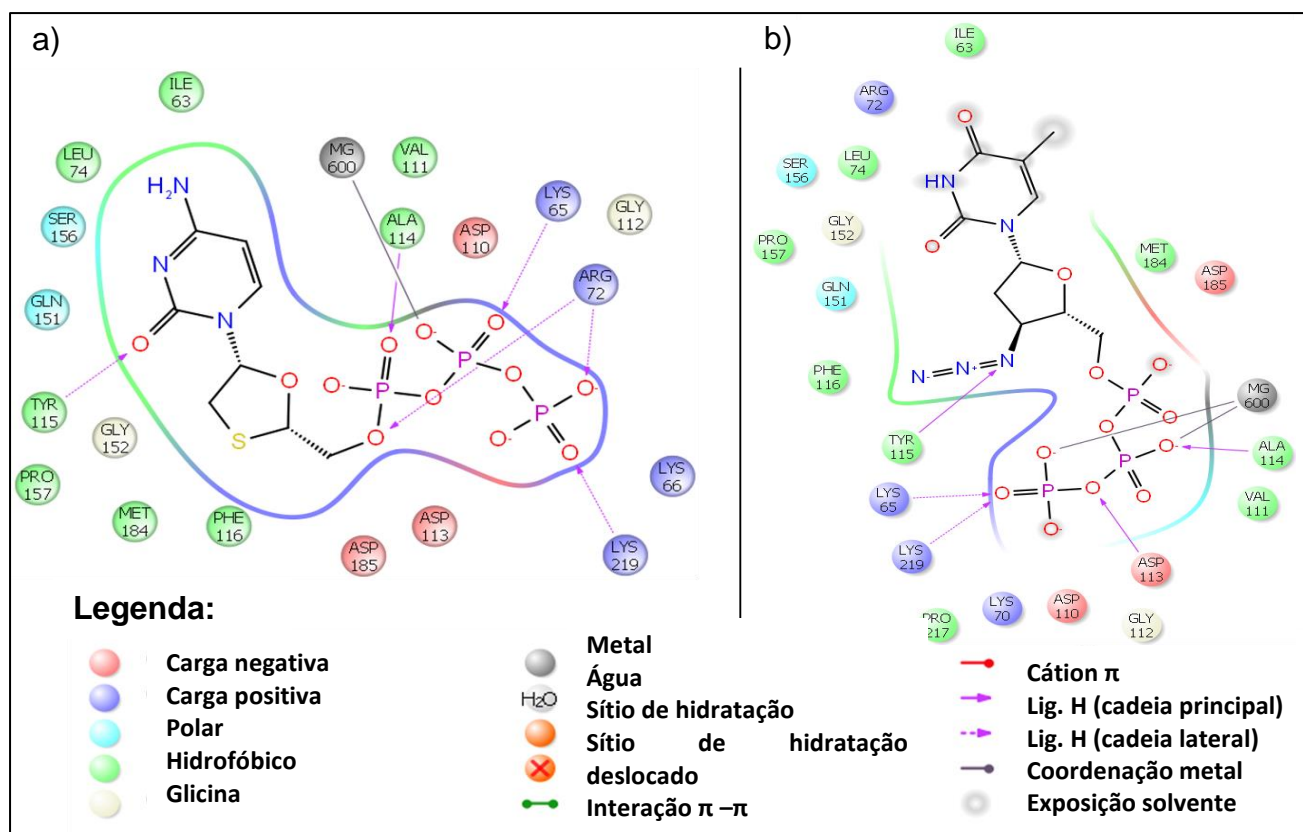
**Figura 25:** Mapa de interações do composto **3** com os resíduos do sítio ativo da TR. As interações foram calculadas usando um cut-off de 5 Å entre os átomos dos compostos e da TR do HIV-1.



**Figura 26:** Representação da comparação com a pose do composto **6** (azul) com o TNV (verde). A pose apresenta um valor de Emodel de -163.2 kcal/mol.



**Figura 27:** Mapa de interações do composto **6** com os resíduos do sítio ativo da TR. As interações foram calculadas usando um cut-off de 5 Å entre os átomos dos compostos e da TR do HIV-1.



**Figura 28:** Representações das interações com os aminoácidos. As interações foram calculadas usando um cut-off de 5 Å do (a) Composto 5 (3TC) e do (b) AZT.

Na realização do terceiro procedimento, que foi feita uma restrição de distância do íon de  $Mg^{+2}$ , os resultados não apresentaram diferenças significativas com aqueles obtidos no segundo procedimento. Não foi observado um diferencial expressivo nos valores do parâmetro Emodel, permanecendo de -128.1 a -147.6 kcal/mol; no segundo procedimento o parâmetro Emodel alcançou valores em torno de -134.1 a -163.3 kcal/mol. Na tabela 6 se destacam os valores de saída do programa Glide. Nela, constam os valores de Emodel, RMSD da cadeia TP, Ligação de Hidrogênio e Interações de *van der Waals*.

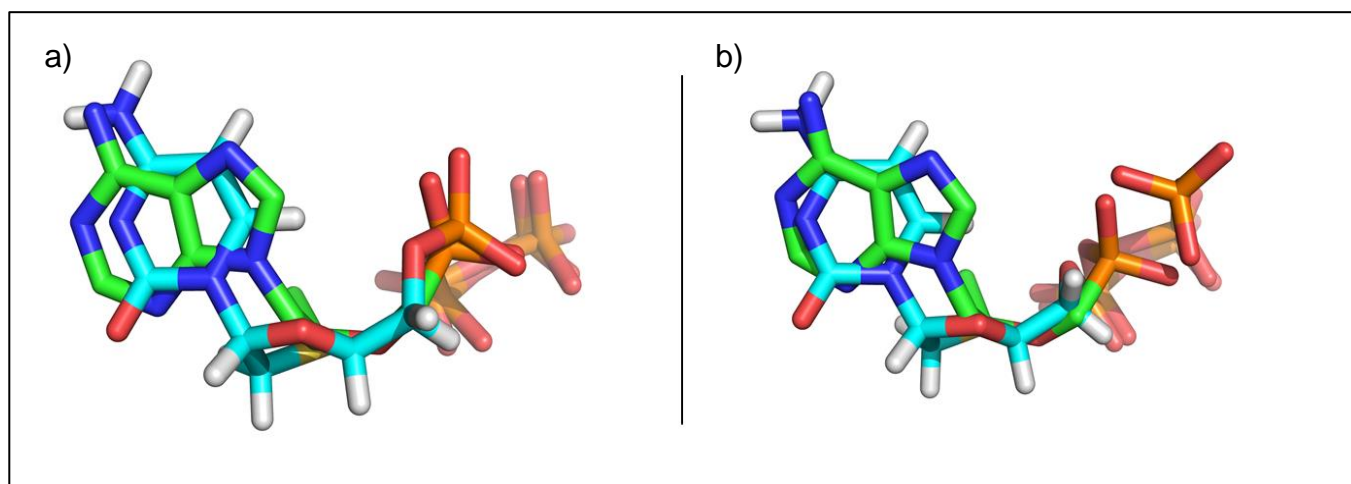
Cabe destacar que o composto **5** obteve um RMSD da cadeia TP de 0.706Å e o menor valor de Emodel -127.9 kcal/mol dentre as poses geradas, diferente do segundo procedimento que obteve um RMSD de 2.631Å.

Quanto ao valor de Emodel, o segundo procedimento foi melhor por evidenciar um valor de -128.9 kcal/mol, enquanto no terceiro procedimento apresentou um valor de -127.9 kcal/mol, que é uma diferença pouco significativa. Porém, a pose do segundo procedimento mostrou uma melhor sobreposição do anel pirimidínico do composto **5** (3TC) ao anel purínico do TNV do que a pose do terceiro procedimento, que mostrou ter o anel pirimidínico do composto **5** (3TC) menos sobreposto ao anel purínico do TNV, representado na Figura 29. Os mapas de interações dos compostos são mostrados no anexo D.

**Tabela 6. Relação dos compostos de acordo com os parâmetros de saída do programa Glide.**

Compostos	Emodel (kcal/mol)	RMSD (Å)	Ligação de Hidrogênio (Å)	vdW (kcal/mol)
1	-128,1	1,933	-3,3	-28,6
2	-132,2	1,933	-3,3	-30,0
3	-147,6	2,120	-2,7	-37,0
4	-146,6	3,339	-2,4	-30,9
5	-127,9	0,706*	-3,3	-26,5
6	-146,8	2,198	-2,9	-40,9
7	-141,8	2,272	-3,0	-41,3
8	-145,1	2,379	-3,3	-28,4

\* Composto que apresentou menor valor de RMSD.



**Figura 29:** Representações do composto **5** (cinza) comparando com o TNV (verde), (a) Pose do terceiro procedimento, (b) Pose do segundo procedimento.

Dos procedimentos realizados, é possível concluir que os resultados obtidos com os análogos fosfatados foram os mais favoráveis, pois apresentaram valores de energia e scores menores, além de baixos valores de RMSD com a cadeia TP do TNV. De acordo com o resultado do *docking*, podemos classificar o composto **3** (ABC-cloro) como o melhor ligante, seguido dos compostos **8, 7, 4, 6 e 2**.

Vale ressaltar que o composto **3** apresenta um RMSD da cadeia TP de 0.669Å e interações conservadas com aminoácidos, tais como a Arg72, Lys65, Asp113, Ala114 e Lys219; além do Magnésio 600, quando comparado com o composto **1** (ABC). Quando comparamos com o composto **5** (3TC) e com o TNV, observa-se que as interações conservadas são somente com a Arg72, Lys65, Lys219 e Magnésio 600.

O ciclopropil em ambos compostos está exposto ao solvente e estabeleceu interações hidrofóbicas com os aminoácidos Ile63 e Phe61. Os átomos de flúor têm um papel importante na estrutura do composto por ser um elemento eletronegativo e ocasionam uma interação de dipolo-dipolo com o aminoácido Gly152. O íon  $Mg^{+2}$  faz interações com diferentes oxigênios da cadeia TP em ambos compostos, confirmando o papel crucial que a cadeia TP desempenha na fixação do ligante no sítio ativo da TR.

Dentre os compostos analisados, os compostos **3** e **6** obtiveram os melhores resultados.

#### **4.2. Predição de propriedades ADME-Tox**

Os estudos de ADME-Tox foram realizados com o composto **1** (ABC), composto **5** (3TC) e seus respectivos melhores compostos derivados sinalizados pelo *docking* para avaliar possíveis graus de toxicidade e as características físico-químicas.



#### 4.2.1. Osiris Property Explorer

Os resultados obtidos pelo programa OSIRIS constam na tabela 7. Nela, são mostrados os resultados de cLogP, Solubilidade, Peso molecular, *Druglikeness* e *Drug-Score* para os compostos-protótipos. Destaca-se o composto **6** que apresenta um peso molecular de 440,0 Da e um cLogP de 1,35 quando comparado com o composto **3**, que apresenta um peso molecular de 533,9 Da e um cLogP de 2,11.

O risco toxicológico foi analisado, indicando por meio de cores se o composto é mutagênico, tumorigênico, irritante ou reprodutivo eficaz (tabela 8). Destacam-se o composto **1** (ABC) e o composto **3**, que sinalizaram alto risco de efeito irritante. No entanto, o composto **5** (3TC) e o composto **6** sinalizaram um alto risco de mutagenicidade e o 3TC sinalizou também risco médio de reprodução eficaz.

O melhor ligante de acordo com o OSIRIS foi o composto **3** por apresentar um cLogP de 2,11, sendo mais hidrofílico. O parâmetro de solubilidade desse composto foi satisfatório, pois expressa um valor de -3,85 mol/L, o que contribui para uma boa absorção desse composto. Esse ligante expressa também um valor de *Drug-score* de 0,18, que é uma combinação dos outros parâmetros com possíveis riscos de toxicidade.

Logo, deve-se considerar a possibilidade do composto **3** a se tornar um fármaco, apesar de expressar um alto risco de efeito irritante.

**Tabela 7. Relação dos compostos-protótipos de acordo com os parâmetros do OSIRIS.**

Compostos	cLogP	Solubilidade (LogS)	Peso Molecular	<i>Druglikeness</i>	<i>Drug-Score</i>	Peso molecular (Referência)
1 (ABC)	-0,34	-1,6	299,0	-1,91	0,32	286,3
3	2,11	-3,85	533,9	-14,35	0,18	533,9
5 (3TC)	-0,95	-1,36	229,0	-2,34	0,25	229,2

6	1,35	-2,68	440,0	-11,74	0,24	440,4
---	------	-------	-------	--------	------	-------

LogP= coeficiente de partição (n-octanol/água); *Druglikeness*= droga-semelhança; *Drug-score*= pontuação de drogas; ChemCalc foi usado como peso molecular de referência.

**Tabela 8. Relação dos compostos-protótipos segundo o risco toxicológico.**

Compostos	Mutagênico	Tumorigênico	Irritante	Reprodutivo Eficaz
1 (ABC)	Verde	Verde	Vermelho	Verde
3	Verde	Verde	Vermelho	Verde
5 (3TC)	Vermelho	Verde	Verde	Amarelo
6	Vermelho	Verde	Verde	Verde

Verde= baixo risco; amarelo= médio risco; vermelho= alto risco.

#### 4.2.2. *Molinspiration Property Calculator*

Os resultados do programa *Molinspiration* quanto às características físico-químicas são apresentados na tabela 9, constando os parâmetros miLogP, TPSA, peso molecular, volume do composto, número de aceitadores de ligação de hidrogênio (nON) e número de doadores de ligação de hidrogênio (nOHNH). Os compostos avaliados não infringiram a regra de Lipinski, com exceção do composto **3** que tem um peso molecular de 533.9 Da.

A bioatividade dos compostos-protótipos contra os alvos moleculares comuns é apresentada na tabela 10. São eles: ligantes de GPRCs, moduladores de canais iônicos, inibidores de quinases, ligantes de receptores nucleares, inibidores de protease e inibidores de enzimas. Dos compostos testados, todos apresentaram uma boa bioatividade. Destaca-se o composto **6** que apresentou uma atividade para os alvos, dado que apresenta valores positivos, exceto para moduladores de canais iônicos e ligantes de receptores nucleares.

Com isso, o melhor ligante segundo o programa *Molinspiration* é o composto **6** por apresentar um valor de *score* para inibidor de enzima de 0.33, apresentando assim maior atividade contra esse alvo, o que é satisfatório. Vale lembrar que o foco desse projeto é a busca por possíveis novos inibidores contra a TR.

**Tabela 9. Relação dos compostos de acordo as características físico-químicas do programa *Molinspiration*.**

Compostos	miLogP	TPSA (Å <sup>2</sup> )	Peso Molecular (Da)	Volume (Å <sup>3</sup> )	nON	nOHNH	Peso molecular (Referência)
1 (ABC)	-0,13	100,49	288,3	262,0	7	5	286,3
3	1,63	132,66	533,9	441,3	10	5	533,9
5 (3TC)	-1,08	90,38	229,2	187,0	6	3	229,2
6	0,01	122,5	440,4	352,8	9	3	440,4

miLogP= coeficiente de partição (n-octanol/água); TPSA= área de superfície polar topológica; nON= número de aceitadores de ligação de hidrogênio; nOHNH= número de doadores de ligação de hidrogênio; ChemCalc foi usado como peso molecular de referência.

**Tabela 10. Relação dos compostos de acordo com o *score* de bioatividade do programa *Molinspiration*.**

Compostos	Ligantes de GPCRs	Moduladores de canais iônicos	Inibidores de quinases	Ligantes de receptores nucleares	Inibidores de Protease	Inibidores de enzimas
1 (ABC)	0,56	-0,11	-0,02	-0,55	0,24	0,79
3	0,32	-0,33	-0,09	-0,37	0,15	0,13
5 (3TC)	0,16	-0,31	-0,08	-1,24	-0,28	0,85
6	0,23	-0,27	0,04	-0,29	0,11	0,33

### 4.2.3. Superpred Web Server

Os resultados do Superpred quanto às propriedades físico-químicas, baseada na regra dos cinco de Lipinski, se encontram na tabela 11. Nela se destacam os valores dos parâmetros xLogP, peso molecular, TPSA, número de aceptores de ligação de hidrogênio (nON) e número de doadores de ligação de hidrogênio (nOHNH). A tabela 12 apresenta a predição de acurácia ATC e a que grupo pertence o composto. Com base nos resultados, é possível identificar o composto **6** como o melhor ligante, pois seus valores se enquadram quanto à regra de Lipinski.

**Tabela 11. Relação dos compostos de acordo com as propriedades físico-químicas do servidor Superpred.**

Compostos	xLogP	Peso Molecular (Da)	TPSA (Å <sup>2</sup> )	nON	nOHNH	Ligações rotacionais	Carga total	Peso molecular (Referência)
1 (ABC)	1,29	288,3	100,4	4	4	4	0	286,3
3	3,60	533,9	132,6	8	5	10	0	533,9
5 (3TC)	-0,01	229,2	115,6	4	2	2	0	229,2
<b>6</b>	<b>1,65</b>	<b>440,4</b>	<b>147,8</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>440,4</b>

xLogP= coeficiente de partição (n-octanol/água); TPSA= área de superfície polar topológica; nON= número de aceptores de ligação de hidrogênio; nOHNH= número de doadores de ligação de hidrogênio; ChemCalc foi usado como peso molecular de referência.

**Tabela 12. Relação dos compostos de acordo com a predição de ATC.**

Compostos	Predição de acurácia ATC	Grupo ATC
1 (ABC)	70,59%	Inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa (J05AF)

3	25,1 %	Compostos arsênicos (P01AR)
5 (3TC)	100%	Inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa (J05AF)
6	70,38%	Inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa (J05AF)

#### 4.2.4. *ProTox*

Os resultados do servidor *ProTox* se encontram na tabela 13. O composto **6** não violou a regra de Lipinski, enquanto que o composto **3** expressou um peso molecular maior que 500 Da e o número de aceitadores de ligações de hidrogênio foi superior a 10. Diante desses resultados, o melhor composto é o composto **6**.

A tabela 14 apresenta a predição da classe de toxicidade e a predição de LD50 em roedores por via oral. Os resultados demonstram que o composto **1** (ABC) e o **3** foram classificados na classe 3 de acordo com o GHS, por apresentarem um valor de LD50 entre 160 a 180 mg/Kg. Isso significa que estão mais propensos a causar toxicidade em roedores. Enquanto que os compostos **5** (3TC) e o **6** foram classificados na classe 4, por apresentarem um valor de LD50 entre 980 a 1000 mg/Kg, o que indica que estão em condições mais favoráveis.

**Tabela 13. Relação dos compostos quanto às propriedades físico-químicas, segundo o ProTox.**

Compostos	Peso molecular (Da)	TPSA (Å <sup>2</sup> )	nON	nOHNH	Ligações rotacionais	Carga total	Peso molecular (Referência)
1 (ABC)	286,3	101,8	6	0	4	0	286,3

3	531,9	134,0	11	0	10	0	533,9
5 (3TC)	229,2	115,6	5	0	2	0	229,2
6	440,4	147,8	10	0	8	0	440,4

TPSA= área de superfície polar topológica; nON= número de aceitadores de ligação de hidrogênio; nOHNH= número de doadores de ligação de hidrogênio; ChemCalc foi usado como peso molecular de referência.

**Tabela 14. Classificação dos compostos de acordo com a predição toxicológica.**

Compostos	Predição da classe de toxicidade	Predição de LD50 (mg/Kg)
1 (ABC)	3	160
3	3	175
5 (3TC)	4	980
6	4	1000

#### **4.2.5. *Mcule***

Os resultados do servidor *Mcule* seguem na tabela 15, onde se detalham os valores de LogP, Peso molecular, TPSA, nON, nOHNH e ligações rotacionais. Os compostos **1** (ABC) e **5** (3TC) expressam valores compatíveis com a regra de Lipinski.

Foi constatado que o composto **3** viola a regra de Lipinski, pois apresenta um peso molecular maior que 500 Da. Já o composto **6** se enquadra na regra de Lipinski, o que podemos considerar como o melhor composto.

**Tabela15. Relação dos compostos quanto aos parâmetros da regra de Lipinski, segundo o Mcule.**

Compostos	LogP	Peso molecular (Da)	TPSA (Å <sup>2</sup> )	nON	nOHNH	Ligações rotacionais	Peso molecular (Referência)
1 (ABC)	0,44	297,4	98,8	7	7	4	286,3
3	3,60	533,9	132,6	10	5	10	533,9
5 (3TC)	-0,01	229,2	115,6	6	2	2	229,2
6	1,65	440,4	147,8	9	3	8	440,4

LogP= coeficiente de partição (n-octanol/água); TPSA= área de superfície polar topológica; nON= número de aceitadores de ligação de hidrogênio; nOHNH= número de doadores de ligação de hidrogênio; ChemCalc foi usado como peso molecular de referência.

#### 4.2.6. Chemicalize

Os resultados do servidor Chemicalize são mostrados na tabela 16 que exhibe os parâmetros de LogP, Peso molecular, TPSA, Volume do composto e a área de superfície molecular. Segundo os resultados, observa-se que o composto **6** apresentou os melhores valores em comparação com o composto **3**.

A tabela 17 mostra os filtros de biodisponibilidade oral utilizados na P & D de fármacos e indica se o composto se enquadra nesses filtros. Esses filtros indicam se o composto apresenta uma boa biodisponibilidade oral ou não. Os filtros são: Lipinski, Veber, Ghose e Muegge, e cada um utiliza um critério de avaliação.

Com base nos resultados desse servidor, podemos verificar que o composto **1** (ABC) e **6** se transpassaram os filtros. Porém, o composto **3** não transpassou o filtro de Lipinski e o filtro de Ghose, por apresentar um peso molecular superior a 500 Da. O composto **5** (3TC) também não transpassou o filtro de Ghose por apresentar um LogP

abaixo de sua região, que é de -0.4 a 5.6. Logo, o composto **6** é o melhor composto por passar a todos os filtros utilizados.

**Tabela 16. Relação dos compostos de acordo com o *Chemicalize*.**

Compostos	LogP	Peso molecular (Da)	TPSA (Å <sup>2</sup> )	Volume (Å <sup>3</sup> )	Área de superfície molecular (Å <sup>2</sup> )	Peso molecular (Referência)
1 (ABC)	0,39	286,3	101,8	249,5	393,0	286,3
3	1,95	533,9	132,6	436,2	668,3	533,9
5 (3TC)	-1,10	229,2	88,1	186,1	270,7	229,2
<b>6</b>	<b>0,78</b>	<b>440,4</b>	<b>120,3</b>	<b>353,4</b>	<b>518,1</b>	<b>440,4</b>

LogP= coeficiente de partição (n-octanol/água); TPSA= área de superfície polar topológica; ChemCalc foi usado como peso molecular de referência.

**Tabela 17. Relação dos compostos de acordo com os filtros de biodisponibilidade oral.**

Compostos	Lipinski	Veber	Ghose	Muegge
1 (ABC)	Sim	Sim	Sim	Sim
3	Não	Sim	Não	Sim
5 (3TC)	Sim	Sim	Não	Sim
<b>6</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>



#### **4.2.7. Análise dos programas/servidores de ADME-Tox**

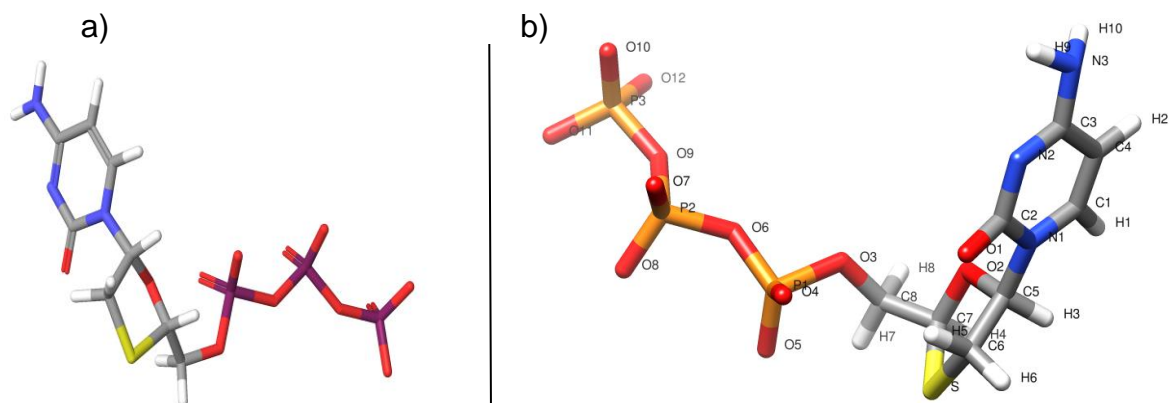
Com base nos resultados de todos os programas e servidores utilizados na predição de ADME-Tox, foi possível constatar que os compostos **3** e **6** obtiveram resultados equivalentes.

O composto **3** em todos os programas e servidores utilizados foi detectado um alto peso molecular. Embora isso não signifique um empecilho, sugere-se como solução uma modificação estrutural com a retirada do átomo de cloro para reverter esse quesito. Porém, o composto **6** apresentou parâmetros satisfatórios quanto à regra de Lipinski em todos os programas e servidores.

Sendo assim, o composto **6** possui melhores condições de drogabilidade em relação aos outros compostos, apesar de apresentar um alto risco de mutagenicidade, sugerimos uma modificação estrutural no composto.

#### **4.3. Parametrização do 3TC**

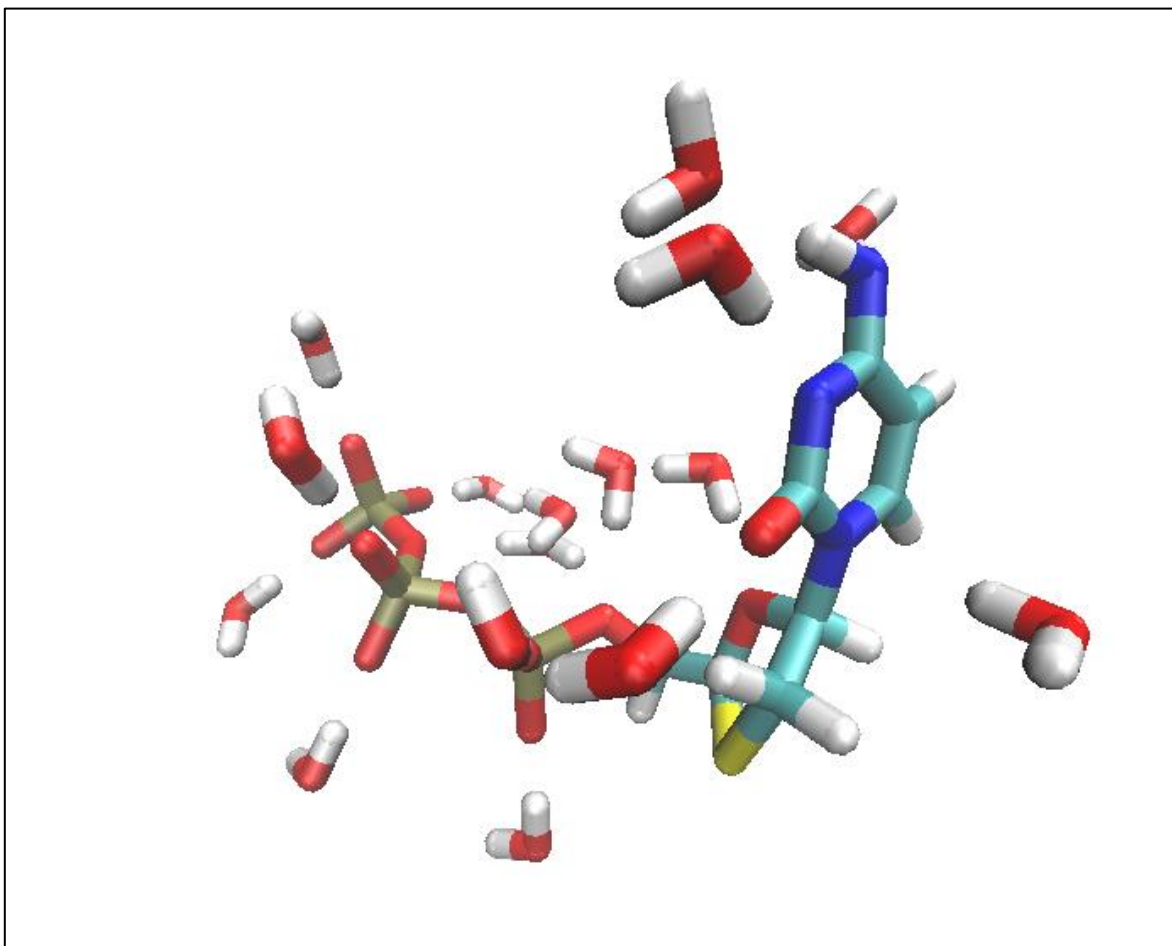
A parametrização se inicia na geração do arquivo *psf* pelo programa VMD usando os arquivos *pdb* e *str*. A estrutura da molécula 3TC está descrita na figura 30 com os nomes dos átomos por meio do arquivo *psf*.



**Figura 30:** Estruturas do 3TC, **(a)** com a representação as ligações duplas, **(b)** com a representação dos nomes dos átomos.

Para a determinação das cargas parciais foi utilizado um procedimento que envolve a identificação de doadores e aceptores de ligação hidrogênio do composto por meio da participação de moléculas de água do tipo TIP3P. Após a obtenção dos arquivos de entrada para o programa Gaussian (Frisch *et al.* 2009), com extensão *gau*, de cada grupo aceitador e doador do composto, foi realizado o cálculo desses arquivos para determinar a energia de interação e as distâncias otimizadas entre o composto e a água.

A partir disso, é possível observar que a maioria das águas presentes interage com a cadeia TP do composto, constatando a formação de 16 monoidratos, sendo 13 com os átomos de hidrogênio e 3 com os átomos de oxigênio (Figura 31). Após esse procedimento, seguimos para a etapa de otimização das cargas.



**Figura 31:** Representação do composto 3TC interagindo com a água TIP3P.

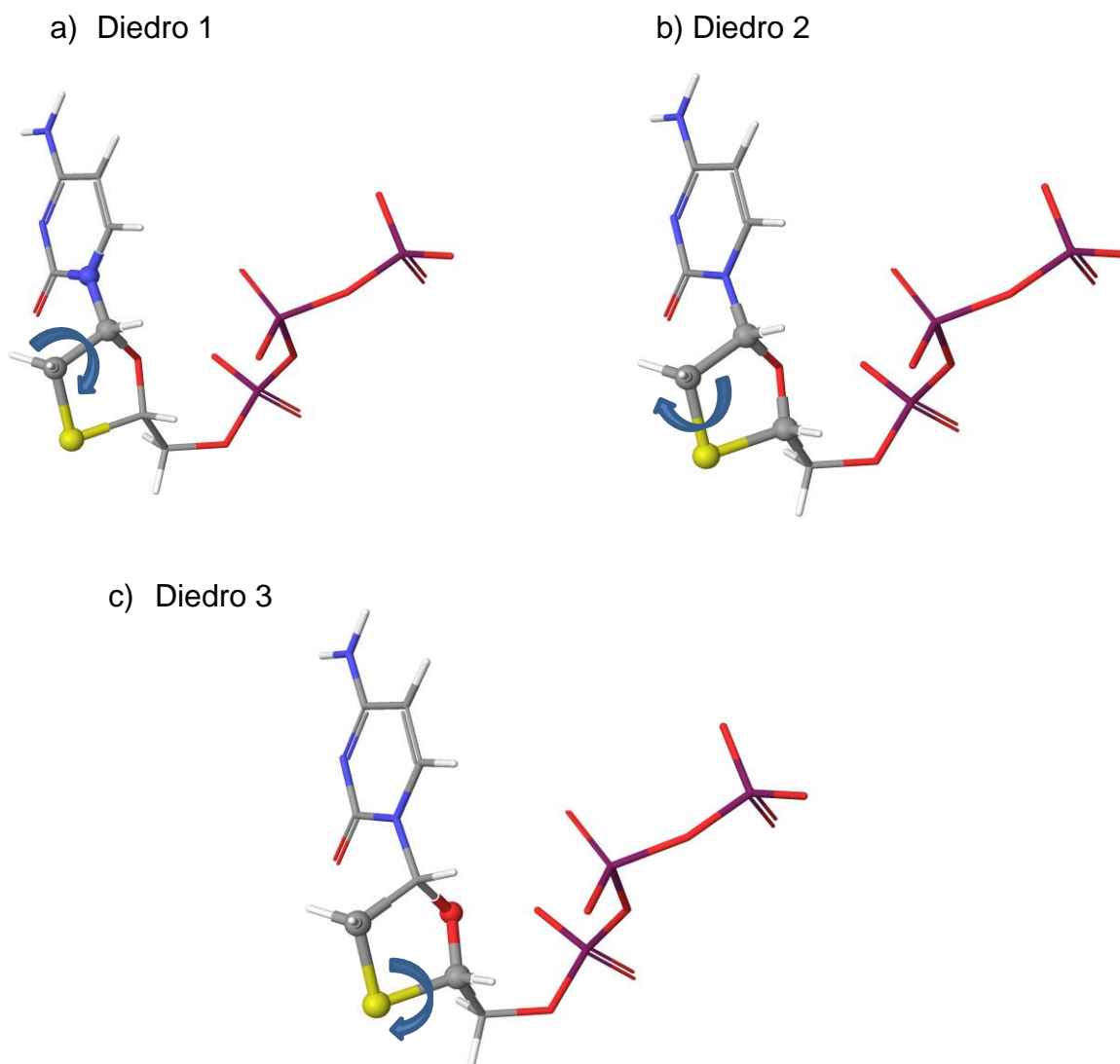
A realização da otimização possibilita que a carga inicial dos átomos de nitrogênio e oxigênio varie entre -1.0 a 0.0, e os carbonos variem entre -1.0 a 1.0. A tabela 18 detalha os átomos, tipos de átomos, as cargas iniciais geradas pelo arquivo *psf* e as cargas após a otimização.

Vale destacar que os átomos N2, C5, C6, O2, C7, C8 e S obtiveram alteração no valor da carga e estão destacados na tabela, sendo que a maioria dos átomos que sofreram alteração encontra-se no anel oxatiolano.

**Tabela 18. Relação dos átomos do 3TC de acordo com a carga inicial e com a carga final.**

Átomo	Tipo de átomo	Cargas iniciais	Cargas após a otimização
<b>C1</b>	CG2R62	0,051	0,051
<b>N1</b>	NG2R61	-0,129	-0,129
<b>C2</b>	CG2R63	0,521	0,521
<b>N2</b>	NG2R62	-0,660	-0,872
<b>C3</b>	CG2R64	0,648	0,648
<b>N3</b>	NG2S3	-0,748	-0,748
<b>C4</b>	CG2R62	-0,129	-0,129
<b>H1</b>	HGR62	0,170	0,170
<b>H2</b>	HGR62	0,070	0,070
<b>C5</b>	CG3C51	0,107	-0,771
<b>O1</b>	OG2D4	-0,490	-0,490
<b>C6</b>	CG3C52	-0,081	0,820
<b>O2</b>	OG3C51	-0,413	-0,107
<b>H3</b>	HGA1	0,090	0,090
<b>C7</b>	CG3C51	0,220	0,497
<b>C8</b>	CG321	-0,079	-0,830
<b>S</b>	SG311	-0,204	0,153
<b>H4</b>	HGA1	0,090	0,090
<b>H5</b>	HGA2	0,090	0,090
<b>H6</b>	HGA2	0,090	0,090
<b>O3</b>	OG303	-0,618	-0,618
<b>H7</b>	HGA2	0,090	0,090

Depois da geração de novo arquivo de topologia *psf*, podemos dar início à varredura de torções e à otimização dos diedrais. Foi feita a varredura de torções do composto e a otimização dos ângulos diedrais identificados. Posteriormente, com o processamento dos cálculos da varredura efetuados, podemos verificar que os ângulos diedrais identificados e otimizados foram do anel oxatiolano (Figura 32). Na tabela 19 é possível observar o *root-mean-square error* de cada diedro otimizado com destaque para o diedro 2 que obteve o menor valor de RMSE.



**Figura 32:** Representações em CPK dos diedros do 3TC.

**Tabela 19:** Relação dos diedros do 3TC com o *root-mean-square error* (RMSE).

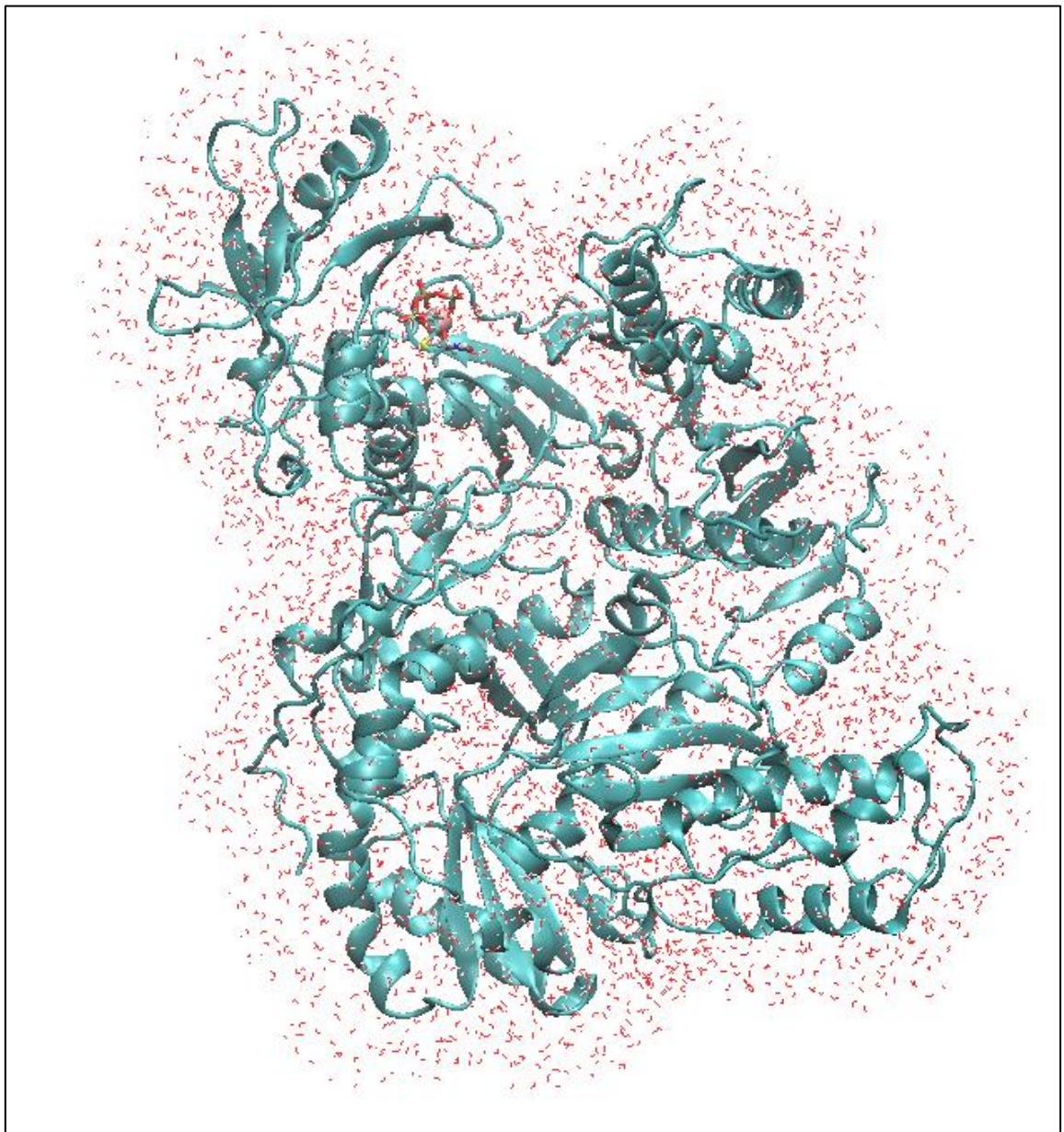
Diedros	RMSE
1	3,907
2	0,130

Após esses procedimentos, temos a parametrização do 3TC finalizada. Esse procedimento será repetido para a parametrização de compostos derivados que possuam esse mesmo arcabouço.

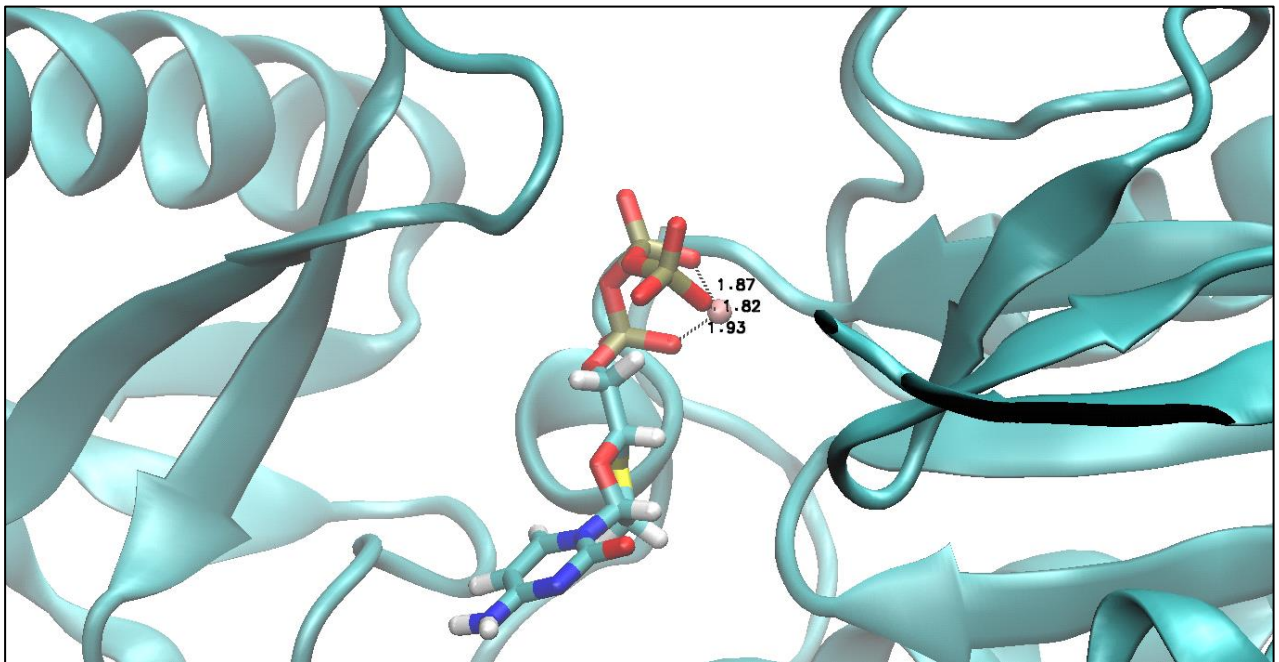
#### 4.4. Dinâmica Molecular

##### 4.4.1. *Simulações de Dinâmica Molecular do 3TC*

As etapas de DM consistem em minimização, equilibração e a produção de trajetórias do sistema. Na figura 33 é possível observar a estrutura do complexo TR com o 3TC e na figura 34 o 3TC com o íon  $Mg^{+2}$  no sítio, indicando a distância com os átomos de oxigênio da cadeia TP. As simulações foram realizadas em um tempo de 37 ns com restrição dos carbonos alfa.



**Figura 33:** Estrutura do complexo TR- ligante com uma camada de solvatação. As outras águas do sistema foram omitidas para facilitar a visualização.



**Figura 34:** Visualização do 3TC e do íon Mg<sup>2+</sup> na TR.

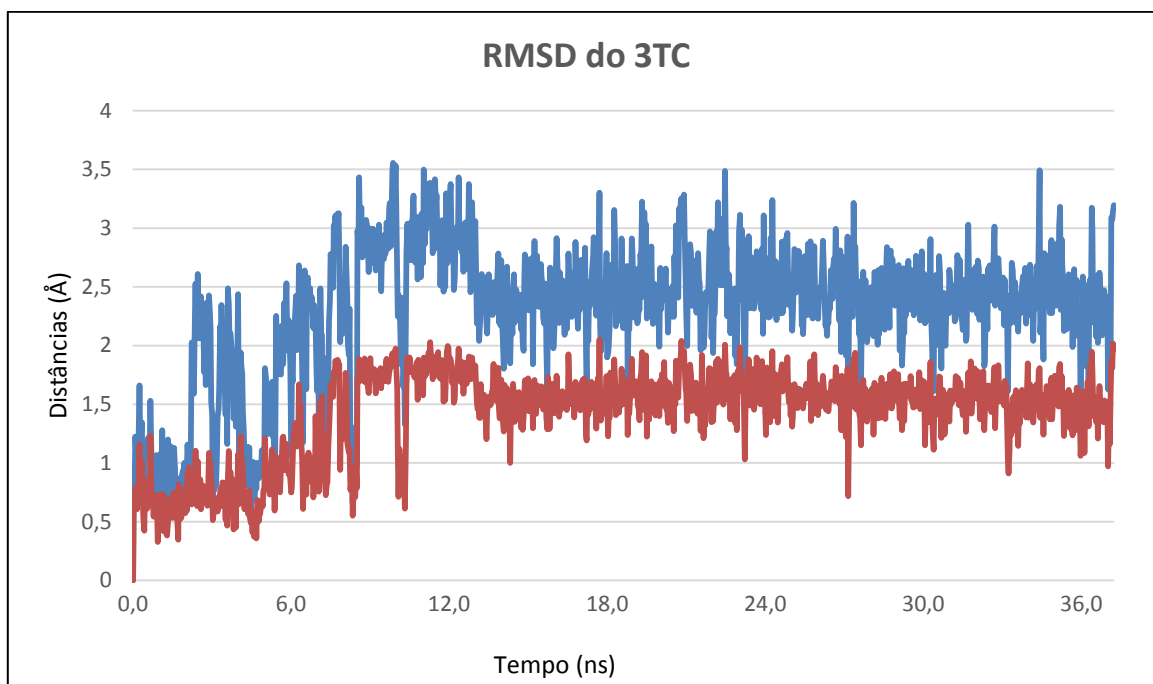
#### **4.4.2. Análise do RMSD do 3TC**

A análise do RMSD da estrutura do 3TC foi realizada a partir da trajetória ao longo do tempo de toda a simulação. Foram calculados os valores do RMSD do 3TC ajustado à posição inicial e o não ajustado. A análise do valor de RMSD ajustado à posição inicial providenciou informação relevante quanto às mudanças conformacionais do ligante enquanto que o valor de RMSD não ajustado incorpora também informações sobre os movimentos translacional e rotacional do ligante.

É possível observar que no início da simulação aparecem alterações no valor de RMSD ajustado devido à rotação do anel pirimidínico (< 2Å), mas o ligante permanece no sítio. A partir de aproximadamente 15ns ambos se estabilizaram (Figura 35).

No entanto, vale ressaltar que o ligante como um todo apresenta uma maior instabilidade a partir de 2,5ns, devido a acomodação desse ligante no sítio. Em ambas situações é possível concluir que o 3TC se manteve no sítio da polimerase durante todo o tempo da simulação, o que sugere que a pose obtida pelo procedimento de *docking* do 3TC foi adequada, indicando o plausível modo de ligação.

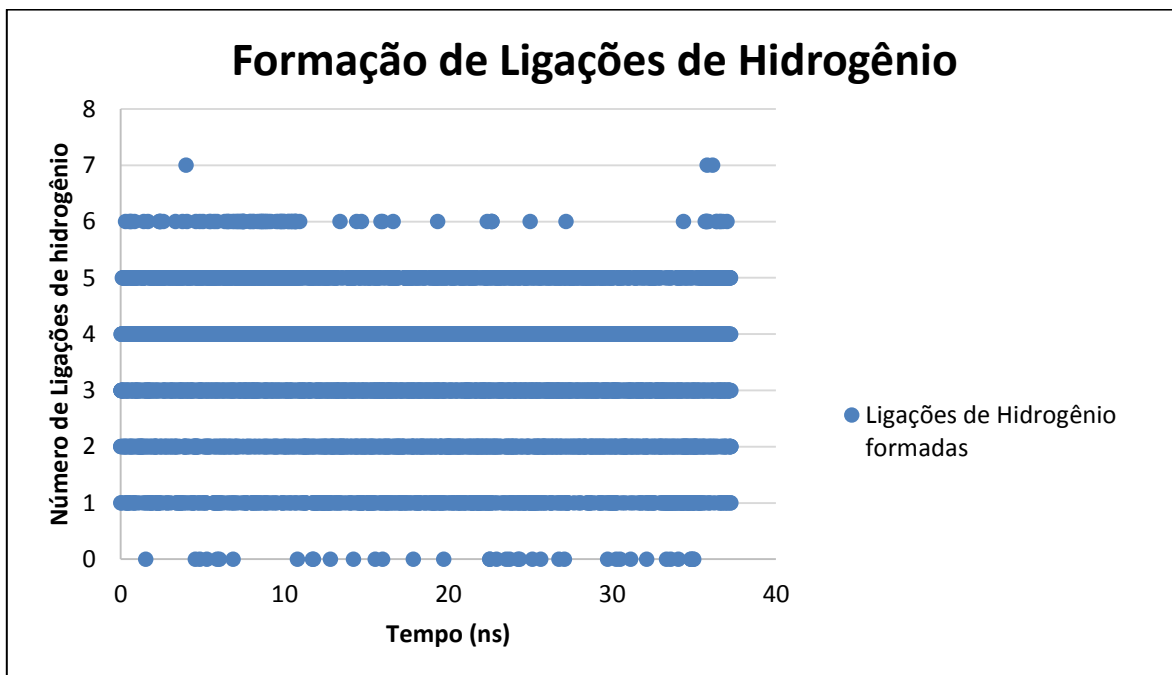




**Figura 35:** Gráfico do RMSD do ligante não ajustado (azul) e o ajustado (vermelho).

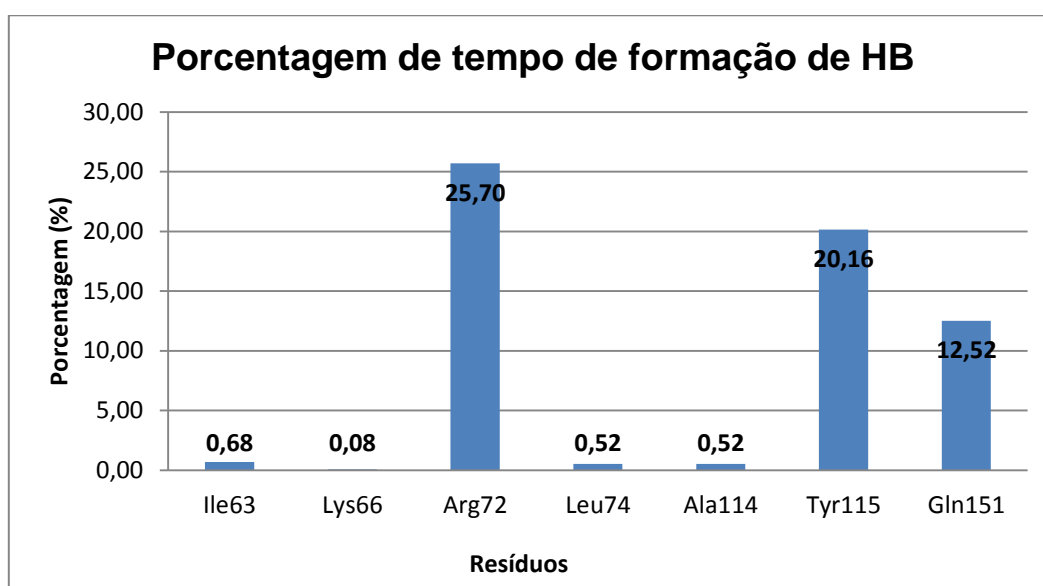
#### **4.4.3. Análise das ligações de hidrogênio**

Durante o tempo total de simulação, a molécula 3TC estabeleceu até seis ligações de hidrogênio com os resíduos vizinhos, sendo que 4 delas se mantiveram maioritariamente durante a simulação após a estabilização do 3TC (Figura 36).



**Figura 36:** Formação de ligações de hidrogênio entre o 3TC com os resíduos vizinhos ao longo da simulação.

A partir da estabilização do 3TC em torno de 15ns, realizamos a análise para averiguar quais são os resíduos que formaram ligação de hidrogênio com o 3TC. A ligação mais frequente se estabeleceu com o resíduo Arg72 que formou ligação hidrogênio em torno de 25,7% do tempo da simulação seguido da Tyr115 e da Gln151 (Figura 37).



**Figura 37:** Porcentagem em diferentes tempos que os resíduos formaram ligação hidrogênio com o ligante.

A tabela 20 identifica os átomos doadores e aceitadores, tanto do sítio da TR quanto do 3TC, que realizaram ligações de hidrogênio ao longo do tempo, a distância média das ligações e o desvio padrão associado. É observado que os desvios padrão de cada ligação tendem oscilar levemente e não superam 1Å, indicando estabilidade dessas interações.

Algumas ligações com os resíduos Tyr115 e Gln151 se formaram esparsamente no decorrer da simulação, formando ligações mais fracas.

**Tabela 20: Relação dos átomos que realizam ligação de hidrogênio.**

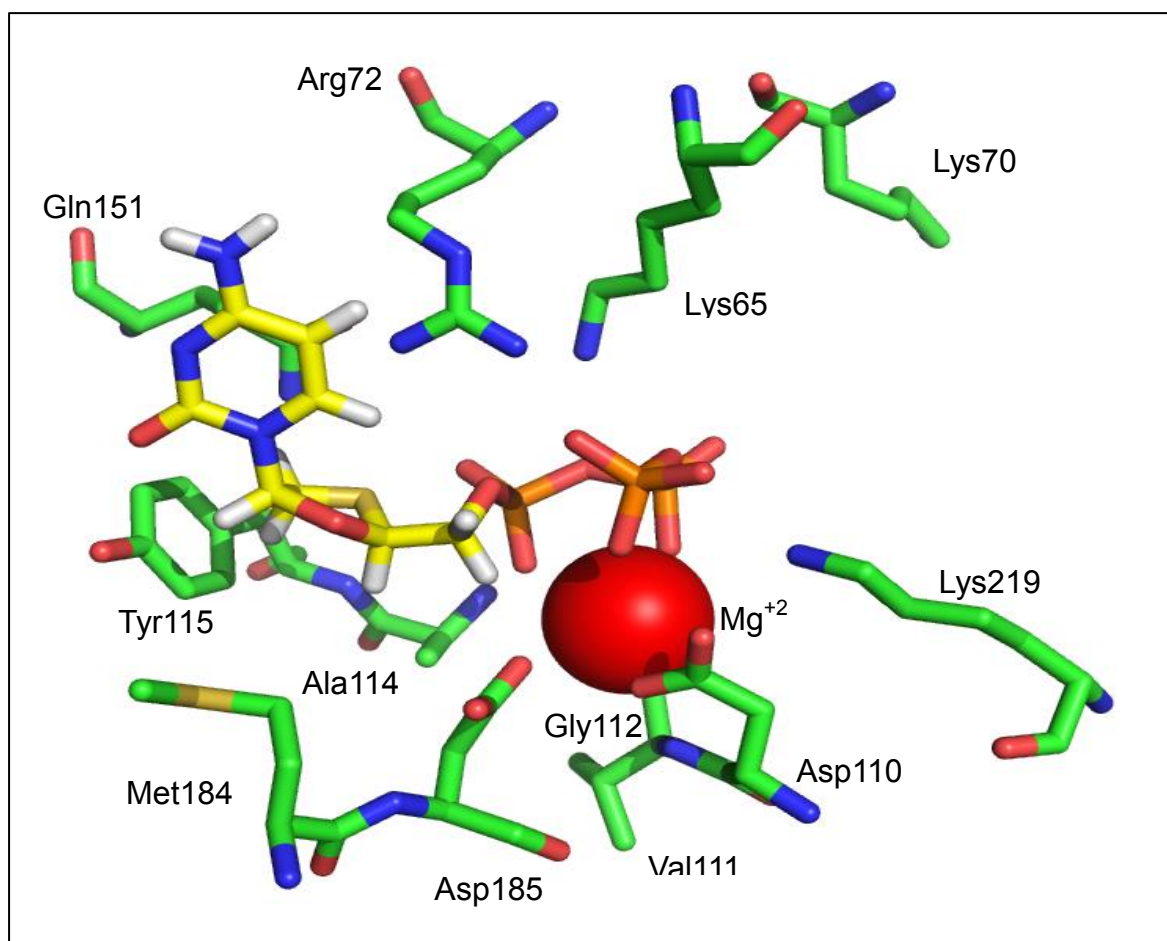
<b>Doadores</b>	<b>Aceitadores</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão (<math>\sigma</math>)</b>
NH2:R72	O11:LIG	2,63	0,08
NH1:R72	O8:LIG	2,73	0,13
NH1:R72	O3:LIG	3,44	0,31
OH:Y115*	N2:LIG	3,38	0,11
NE2:Q151	O1:LIG	3,33	0,10
NE2:Q151*	O2:LIG	3,32	0,10
NE2:Q151*	O3:LIG	3,41	0,07

\* Ligações que se formaram em alguns momentos.

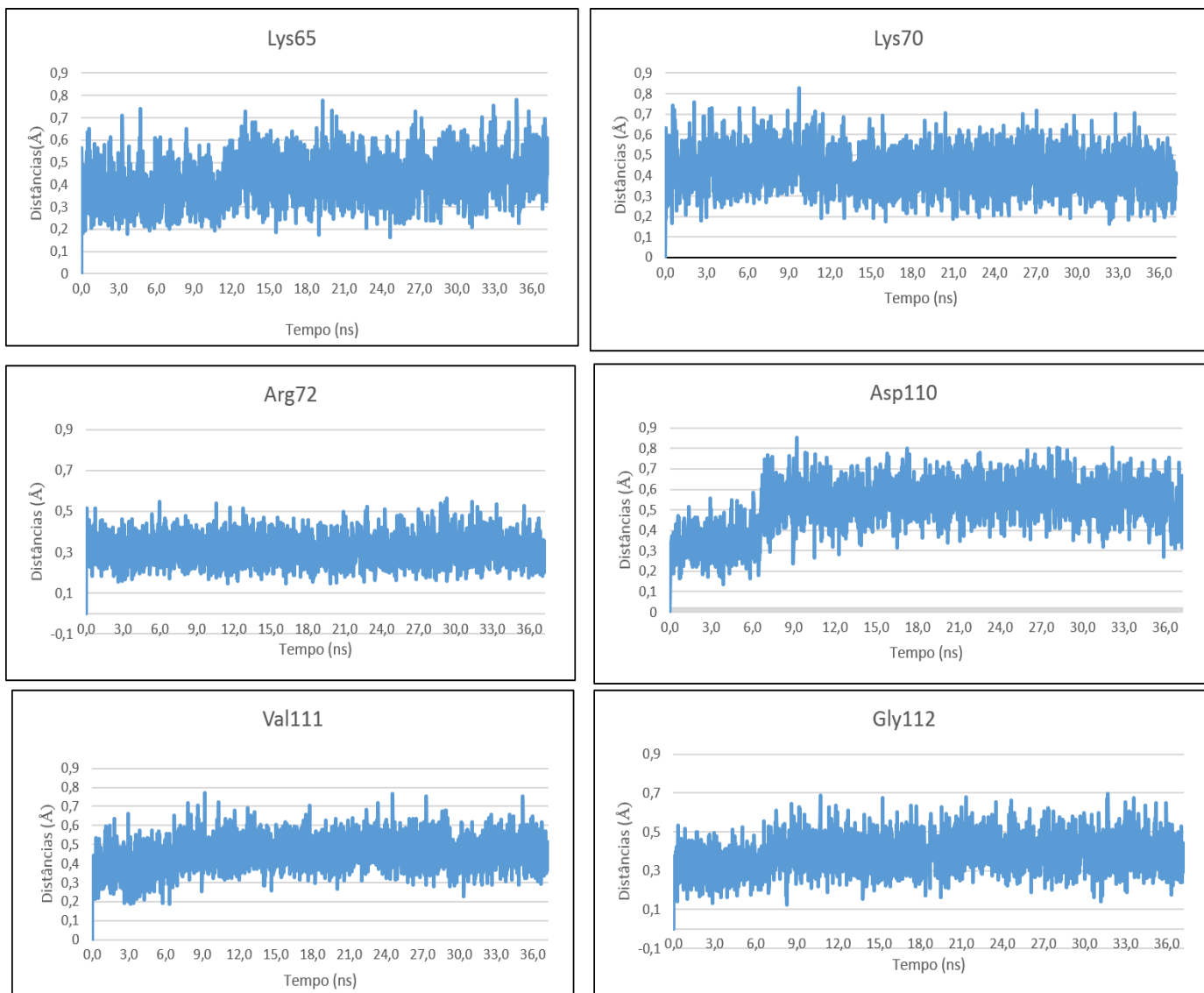
#### **4.4.4. Análise da flexibilidade dos resíduos do sítio**

Analisando o valor de RMSD dos resíduos ao redor do 3TC num raio de corte de 4Å ao longo da simulação, percebe-se que os resíduos Lys65, Lys70, Arg72, Asp110, Val111, Gly112, Ala114, Tyr115, Gln151, Met184, Asp185 e Lys219 (Figura 38) apresentaram variação no início da simulação, porém a partir de 5ns todos se mantiveram estáveis (Figura 39 e 40).

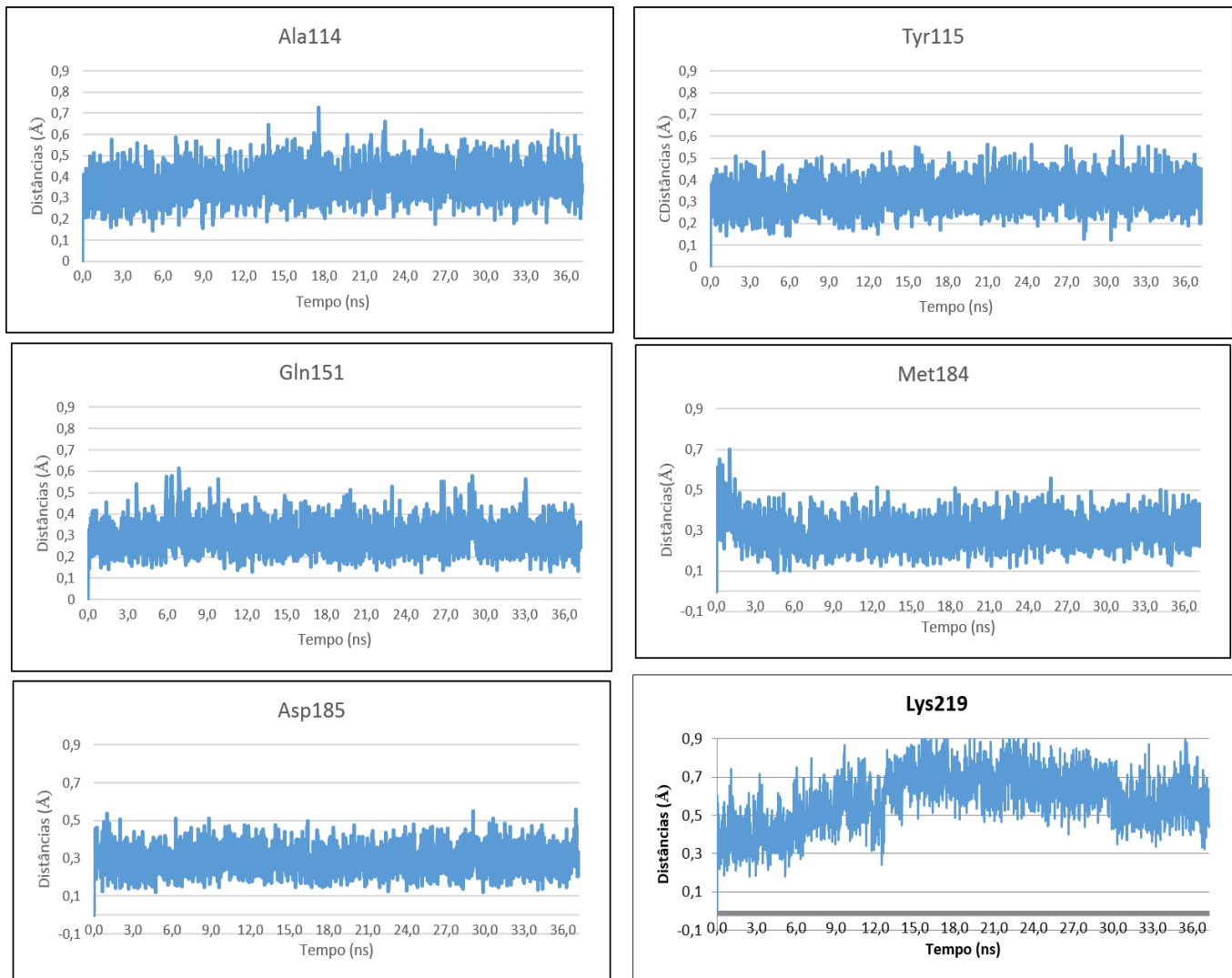
A flutuação dos valores de RMSD (Figura 41) desses resíduos mostrou que as variações, após estabilização, foram limitadas, não superando o valor de 1.5Å. Conclui-se que os resíduos que apresentaram os menores valores de desvio foram a Arg72, Tyr115, Gln151, Met184 e Asp185.



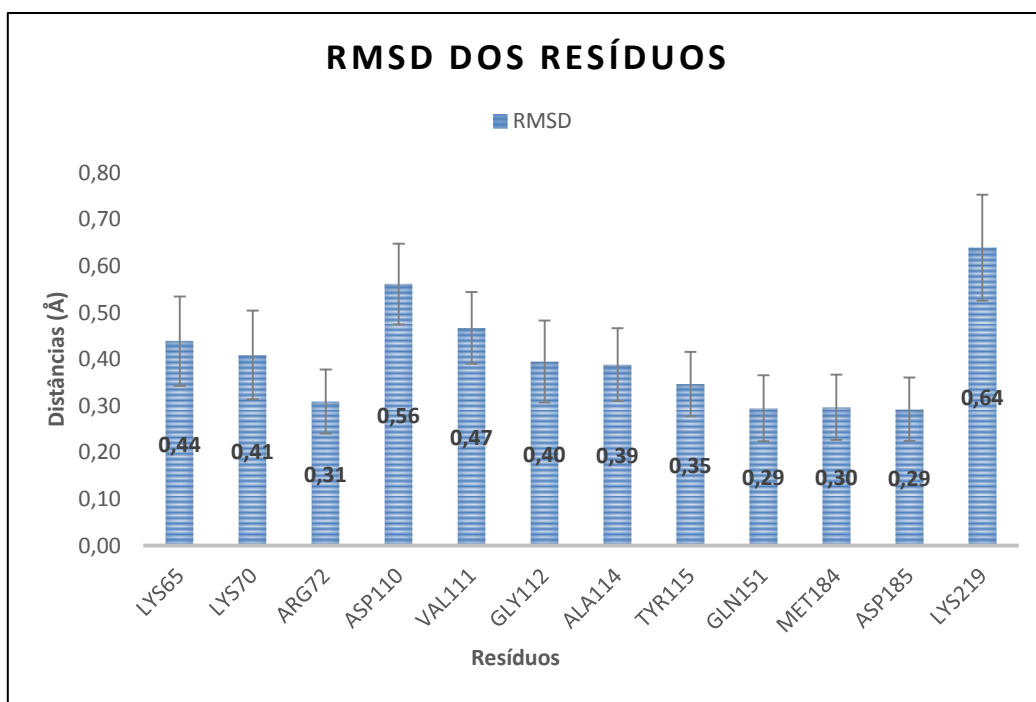
**Figura 38:** Visualização do 3TC com os resíduos num raio de 4 Å do 3TC.



**Figura 39:** RMSD dos resíduos num raio de 4Å do 3TC.



**Figura 40:** RMSD dos resíduos num raio de 4Å do 3TC.



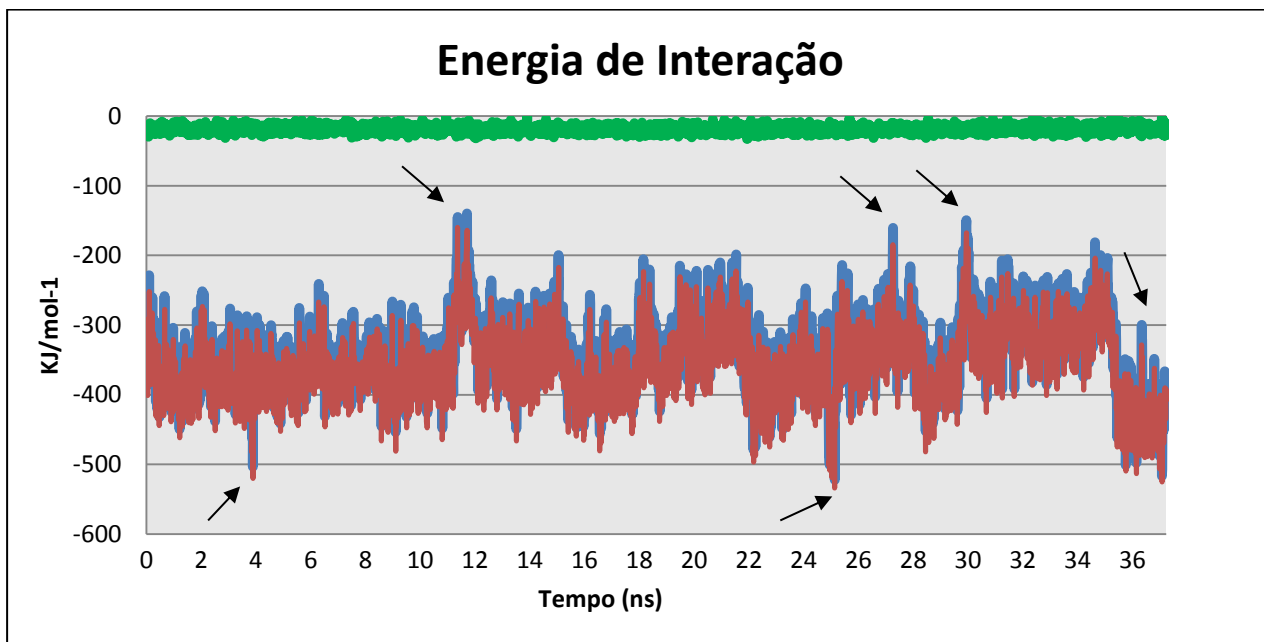
**Figura 41:** Valores médios de RMSD dos resíduos vizinhos do 3TC localizados a 4 Å.

#### 4.4.5. Análise da energia de interação intermolecular

A análise da energia de interação do sistema foi realizada considerando as energias eletrostática, de *van der Waals* e a total. Observa-se que ambas as componentes da energia apresentaram variações ao longo do tempo da simulação, apontados no gráfico; no entanto, a energia de *van der Waals* se manteve mais estável (Figura 42).

A componente eletrostática varia principalmente devido à forte interação entre os grupos fosfatos carregados da molécula 3TC e os resíduos circundantes e o íon de  $Mg^{+2}$  (Figura 42).

Além do mais, algumas variações conformacionais do 3TC, principalmente do anel pirimidínico e do anel oxatiolano, foram em diferentes tempos: 4ns, 12ns, 25ns, 27ns, 30ns e 36ns, correspondentes os picos identificados na figura 42.

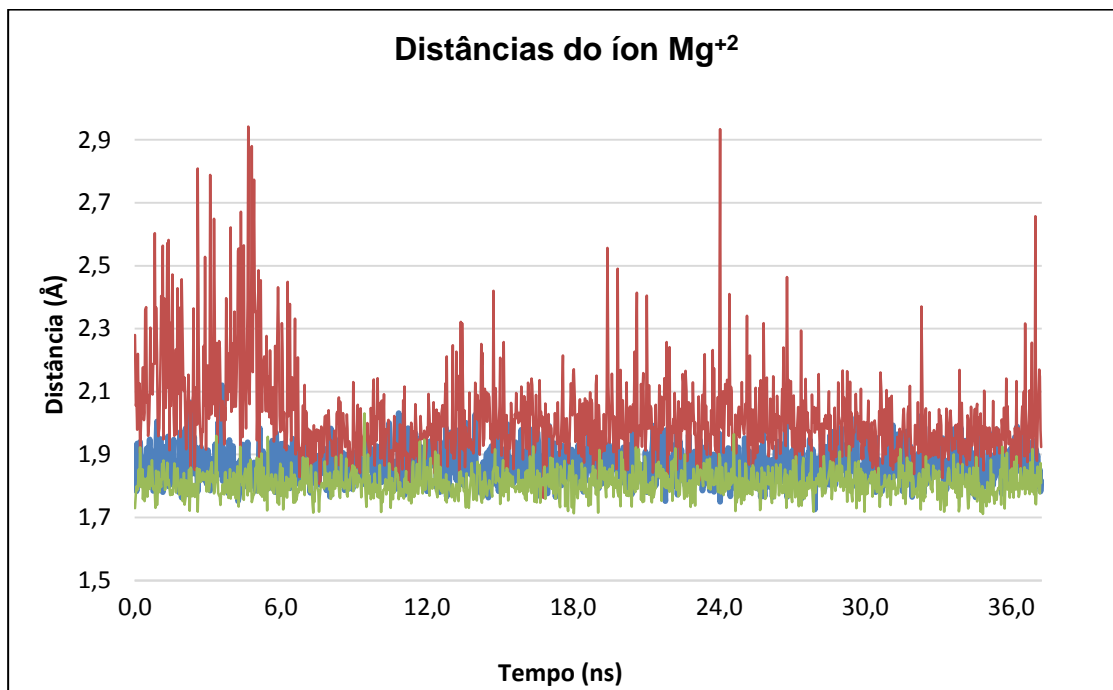


**Figura 42:** Gráfico da energia de interação do 3TC com a TR, indicando a energia de *van der Waals* (verde), a energia eletrostática (roxo) e a energia total (vermelho).

Dado que a interação eletrostática entre o íon  $Mg^{+2}$  e os fosfatos da cadeia TP desempenham um papel importante na fixação da molécula de 3TC no sítio, foi analisado a variação da distância entre o íon  $Mg^{+2}$  com os oxigênios presentes na cadeia TP, o O5, O9 e O12 (Figura 43).

As distâncias entre os átomos envolvidos variam no início da simulação, mas a partir de 10ns eles se estabilizaram. Com exceção do O9 que ao longo da simulação apresenta uma distância maior do que os outros oxigênios, alcançando em alguns momentos aproximadamente 3Å de distância. Vale lembrar que o íon  $Mg^{+2}$  é responsável por manter o ligante preso no sítio da polimerase.





**Figura 43:** Valores de distância do íon Mg<sup>2+</sup> com os oxigênios O5 (azul), O9 (vermelho) e O12 (verde) da cadeia TP.

## 5. CONCLUSÕES

Nesta dissertação investigou-se o modo de ligação dos compostos abacavir e lamivudina e seus derivados no sítio ativo da polimerase do HIV-1. Para tal finalidade aplicou-se uma série de técnicas e procedimentos computacionais complementares, como *docking* molecular, estudos de ADME-Tox e dinâmica molecular.

A aplicação complementar de um conjunto de técnicas computacionais permitiu analisar satisfatoriamente o comportamento dinâmico (por meio da dinâmica molecular) e estrutural (*docking* molecular) de uma série de ligantes no sítio da TR do HIV-1.

Segundo a abordagem utilizada nos procedimentos de *docking*, concluiu-se que a inclusão da cadeia TP nos procedimentos é de importância crucial na determinação da pose mais provável, baseados tanto nos valores de energia intermolecular quanto na conservação das interações com outros ligantes similares.

De acordo com os estudos de *docking* molecular, ambos compostos se ligam de forma análoga ao Tenofovir (TNV), segundo à estrutura resolvida por cristalografia de RX (1T05), com os átomos da cadeia TP coordenando o íon de  $Mg^{+2}$ .

A partir da comparação do modo de ligação da molécula de zidovudina (AZT) no cristal 3V4I do banco de dados PDB, e baseado na similaridade estrutural entre essa molécula e com a lamivudina, evidenciado por meio do coeficiente de Tanimoto de 1, sugere-se que o modo de ligação deste composto seja muito semelhante. A justificativa subjacente à essa conclusão se baseia na similaridade estrutural e a conservação de interações entre o receptor e o ligante.

Dos derivados da molécula de abacavir, o composto com substituinte  $Cl^-$  na posição meta do grupamento fenilacetamida apresentou melhor energia de interação com o sítio. A rede de interações de ligações de hidrogênio foi idêntica à formada pelo TNV, conservando 2 ligações com o íon de  $Mg^{+2}$ , deixando o grupo ciclopropil exposto ao solvente.

No que se refere aos análogos da lamivudina, o composto sem substituinte na posição meta do grupamento químico fenilacetamida mostrou melhor energia de ligação quando comparado aos outros derivados. Similar ao que acontece com o TNV, as interações de hidrogênio e hidrofóbicas foram mantidas.

Quando os compostos foram avaliados segundo os servidores de predição para ADME-Tox, observou-se que composto sem substituinte se apresentou como melhor candidato para se transformar em fármaco, dado que os níveis de toxicidade e mutagenicidade foram menores que no caso do melhor composto derivado do Abacavir. Além disso, este último apresenta uma violação à regra de Lipinski, com peso molecular maior que 500 Da.

Na análise dinâmica do ligante lamivudina no sítio ativo da TR-HIV-1, concluímos que a lamivudina se mantém estabilizada por ligações hidrogênio, principalmente entre o íon  $Mg^{+2}$  e os átomos de oxigênio da cadeia TP. A introdução do ligante no sítio produz modificações estruturais nos resíduos da vizinhança (Lys65, Lys70, Arg72, Asp110, Val111, Ala112, Tyr115, Gln151, Met184, Asp185 e Lys219). Porém, eles se mantêm estáveis conforme o sistema evolui no tempo.

Os anéis pirimidínico e oxatiolano apresentaram mobilidade dentro do sítio produzindo mudanças conformacionais. Porém, a cadeia TP mostrou pouca flutuação estrutural quando comparada à conformação cristalográfica do TNV, devido principalmente às interações de ponte salina e ligações de hidrogênio formadas com o íon  $Mg^{+2}$  e os resíduos Arg72, Tyr115 e Gln151 que seguram a cadeia à sua posição inicial.

A importância deste trabalho utilizando técnicas computacionais no estudo de possíveis novos compostos inibidores nucleosídicos da TR permitiu a elucidação do modo de ligação do 3TC no sítio da polimerase na TR. Essa identificação poderá auxiliar os futuros estudos para compostos que apresentarem em sua estrutura esse arcabouço. No entanto fica inviável a discussão com os outros trabalhos referente a essa classe de inibidores devido à falta de dados na literatura.

Como perspectiva para esse estudo, analisar o modo de ligação do 3TC na presença de mutações no sítio da polimerase da TR. Realizar dinâmica molecular com o composto 6 análogo ao 3TC.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamson, C. S. F., E. O. (2010). "Novel approaches to inhibiting HIV-1 replication." Antiviral Research **85**: 119–141.
- Alonso, H., Bliznyuk, A. A., Gready, J. E (2006). "Combining Docking andMolecular Dynamic Simulations in Drug Design." Medicinal Research Reviews **26**(5): 531-568.
- Alonso, H. B., A. A.; Gready, J. E. (2006). "Combining Docking andMolecular Dynamic Simulations in Drug Design." Medicinal Research Reviews **26**(5): 531-568.
- Anvisa. "Considerações e definições para Pesquisa Clínica." Pesquisa clínica. from <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/pesquisa/def.htm>.
- Arts, E. J. a. H., D. J. (2012). "HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy." Cold Spring Harb Perspect Med.
- Åsterberg, F., Morris, G.M., Sanner, M.F. and Olson, A.J. (2002). Proteins **46**: 34–40.
- Ausiello, G. I., G. F.; Spaccamela, A. M.; Nanni, U. (1991). "Incremental algorithms for minimal length paths." Journal of Algorithms **12**(4): 615–638.
- Barbaro, G. a. E. F. S. (2009). "Cardiovascular complications in the acquired immunodeficiency syndrome." Rev Assoc Med Bras **55**(5): 621-630.
- Bastos, F. I. B.-P., C.; Telles, P. R. & Lima, E. (1993). "O Não-dito da AIDS." Cad. Saúde Públ. **9**(1): 90-96.
- Bauman JD, D. K., Ho WC, Baweja M, Himmel DM, Clark AD Jr, Oren DA, Boyer PL, Hughes SH, Shatkin AJ, Arnold E. (2008). "Crystal engineering of HIV-1 reverse transcriptase for structure-based drug design." Nucleic Acids Research **36**(15): 5083-5092.
- Berman, H. M., et al., (2000). "The Protein Data Bank." Nucleic Acids Research **28**(1): 235-242.
- Borrego, P. T., N. (2013). "HIV-2 Susceptibility to Entry Inhibitors." AIDS Reviews **15**: 49-61.
- Boyer, P. L. C., P. K.; and Hughesa, S. H. (2012). "HIV-1 and HIV-2 Reverse Transcriptases: Different Mechanisms of Resistance to Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors." Journal of Virology **86**(10): 5885–5894.
- Brito, M. A. (2011). "Fármacos recentes usados para o tratamento da infecção pelo HIV-1: enfuvirtida, maraviroc, raltegravir e etravirina." Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada **32**(2): 159-168.
- Brunton, L. L. C., B. A.; Knollmann, B. C. (2011). As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman.
- Calixto, J. B. e. J., J. M. S. (2008). "Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios." Gazeta Médica da Bahia **78**: 98-106.

- Carr, A., et al. (1998). "A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors." Aids **12**(7): 51-58.
- Carvalho, I. P., M. T.; Borges, A. D. L.; e Bernardes, L. S. C. (2002). "INTRODUÇÃO A MODELAGEM MOLECULAR DE FÁRMACOS NO CURSO EXPERIMENTAL DE QUÍMICA FARMACÊUTICA." Quim. Nova **26**(3): 428-438.
- ChemAxon "<http://www.chemicalize.org/>."
- Cheminformatics, M. (2002). <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>.
- Christen M, H. P., Bakowies D, Baron R, Bürgi R, Geerke DP, Heinz TN, Kastenholz MA, Kräutler V, Oostenbrink C, Peter C, Trzesniak D, van Gunsteren WF. (2005). "The GROMOS software for biomolecular simulation: GROMOS05." J Comput Chem. **26**(16): 1719–1751.
- Clark, M. C. I., R. D.; and Opdenbosch, N. V. (1989). "Validation of the general purpose tripos 5.2 force field"  
" Journal of Computational Chemistry **10**(8): 982–1012.
- Cross, J. B. T., D. C.; Rai, B. K.; Baber, J. C.; Fan, K. Y.; Hu, Y.; and Humblet, C (2009). " Comparison of Several Molecular Docking Programs: Pose Prediction and Virtual Screening Accuracy." Journal of Chemical Information and Modelling **49**(9): 1455–1474.
- Cunico, W. G., C. R. B.; Junior, W. T. V. (2008). "HIV – recentes avanços na pesquisa de fármacos." Revista Química Nova **31**(8): 2111-2117.
- Dainesi, S. M. (2006). "SEEKING HARMONIZATION AND QUALITY INCLINICAL TRIALS." Clinics **61**(1): 3-8.
- Darden, T., York, D. and Pedersen, L. (1993). "Particle mesh Ewald: An  $W \log(N)$  method for Ewald sums in large systems " J. Chem. Phys. **68**(12).
- Das, K., et al. (2012). "HIV-1 reverse transcriptase complex with DNA and nevirapine reveals non-nucleoside inhibition mechanism." Nat Struct Mol Biol **19**(2): 253-259.
- Das, K. a. A., E. (2013). "HIV-1 reverse transcriptase and antiviral drug resistance. Part 1." Current Opinion in Virology **3**: 111–118.
- Davis, L. (1991). Handbook of Genetic Algorithms. New York.
- de Magalhães, C. S. A., D. M.; Barbosa, H. J. C.; Dardenne, L. E. (2014). "A Dynamic Niching Genetic Algorithm Strategy for Docking of Highly Flexible Ligands." Information Sciences **289**: 206-224.
- de Souza, M. V. N. d. A., M. V. (2003). "Drogas Anti-Vih: Passado, Presente E Perspectivas Futuras." Quim. Nova **26**(3): 366-372.
- Dias, R. a. J., W. F. A. (2008). "Molecular Docking Algorithms." Current Drug Targets **9**: 1040-1047.
- do Lago, R. F. C., N. R. (2010). "Dilemas da política de distribuição de medicamentos antirretrovirais no Brasil." Ciênc. saúde coletiva **15**(3).

- Drwal, M. N. B., P.; Dunkel, M.; Wettig, M. R.; and Preissner, R. (2014). "ProTox: a web server for the in silico prediction of rodent oral toxicity." Nucleic Acids Research **12**.
- Dunkel, M. G. n., S.; Ahmed, J.; Wittig, B.; and Preissner, R. (2008). "SuperPred: drug classification and target prediction." Nucleic Acids Research **36**.
- Durrant, J. D. a. M., J. A. (2011). "Molecular dynamics simulations and drug discovery." BMC Biology **9**(71).
- Esposito, F. C., A.; and Tramontano, E. (2012). "HIV-1 Reverse Transcriptase Still Remains a New Drug Target: Structure, Function, Classical Inhibitors, and New Inhibitors with Innovative Mechanisms of Actions." Molecular Biology International.
- Ewing, T. J. A. a. K., I.D. (1997). J. Comput. Chem. **18**: 1176–1189.
- Ferreira, F. G. P., M. C.; Oshima-Franco, Y. e Fraceto, L. F. (2009). "Fármacos: do Desenvolvimento à Retirada do Mercado." Revista Eletrônica de Farmácia **6**(1): 14-24.
- Ferreira, R. C. S. R., A.; Sant'Ana, A. E. G. (2010). "HIV: MECANISMO DE REPLICAÇÃO, ALVOS FARMACOLÓGICOS E INIBIÇÃO POR PRODUTOS DERIVADOS DE PLANTAS." Revista Química Nova **33**(8): 1743-1755.
- Fischer, E. (1894). Ber. Dt. Chem. Ges. **27**.
- Francis, D. P. (2012). "Deadly AIDS policy failure by the highest levels of the US government: A personal look back 30 years later for lessons to respond better to future epidemics." Journal of Public Health Policy **33**: 290–300.
- Freed, E. O. a. M., M. A. (1995). "The Role of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoproteins in Virus Infection." The Journal of Biological Chemistry **270**(41): 23883–23886.
- Friesner, R. A., et al. (2004). "Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy." J Med Chem **47**(7): 1739-1749.
- Friesner, R. A., Banks JL, Murphy RB, Halgren TA, Klicic JJ, Mainz DT, et al (2004). " Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy." Journal of medicinal chemistry **47**(7): 1739-1749.
- Friesner, R. A., et al. (2006). "Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes." J Med Chem **49**(21): 6177-6196.
- Friesner, R. A., Murphy RB, Repasky MP, Frye LL, Greenwood JR, Halgren TA, et al. (2006). "Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes."  
." Journal of medicinal chemistry. **49**(21): 6177-6196.
- Frisch, M. J. T., G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; et al.; (2009). "Gaussian 09." Gaussian, Inc.
- Gao, F. B., E.; Robertson, D. L.; Chen, Y.; Rodenburg, C. M.; Michael, S. F.; Cumminsk, L. B.; Arthur, L. O.; Peeters, M.; Shaw, G. M.; Sharp, P.M.; & Hahn, B. H. (1999). "Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes." Nature **397**.

- Garrett, M. M., M. L.-W. (2008). "Molecular Docking. Methods Molecular Biology." Humana Press **443**: 365-382.
- Geocze, L. M., S.; De Marco, M. A.; Nogueira-Martins, L. A.; Citero, V. A. (2010). "Qualidade de vida e adesão ao tratamento anti-retroviral de pacientes portadores de HIV." Rev. Saúde Pública **44**(4).
- Ghose, A. K. V., V. N. ; and Wendoloski, J. J. (1999). "A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases." J. Comb. Chem. **1**: 55-68.
- Goodsell, D. S. M., G.M.; Olson, A.J (1996). " Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock." J. Mol. Recognit. **9**: 1-5.
- Gschwend, D. A. a. K., I.D. (1996). J. Comput.-Aided Mol. Des. **10**: 123–132.
- Gschwend, D. A. G., A. C.; and Kuntz, I. D. (1996). "Molecular Docking Towards Drug Discovery." JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITIO **9**: 175-186.
- Guido, R. V. C. A., A. D.; Oliva, G. (2010). "Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas." estudos avançados **24**(70).
- Halgren, T., Murphy RB, Friesner RA, Beard HS, Frye LL, Pollard WT, et al. (2004). "Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening." Journal of medicinal chemistry. **47**(7): 1750-1759.
- Halgren, T. A. (1996). "MMFF94." J. Comput. Chem. **17**: 490-519.
- Halgren, T. A., et al. (2004). "Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening." J Med Chem **47**(7): 1750-1759.
- Halperin, I. e. a. (2002). "Principles of Docking: An Overview of Search Algorithms and a Guide to Scoring Functions." PROTEINS: Structure, Function and Genetics **47**: 409 - 443.
- Hanwell, M. D., et al. (2012). "Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform." J Cheminform **4**(1): 17.
- Heeney, J. L. D., A. G.; Weiss, R. A. (2006). "Origins of HIV and the Evolution of Resistance to AIDS." Science **313**(462).
- Huang, S. G., S. Z.; and Zou, X. (2010). "Scoring functions and their evaluation methods for protein–ligand docking: recent advances and future directions." Physical Chemistry Chemical Physics **12**: 12899–12908.
- Hugo Verli, E. J. B. (2005). "UM PARADIGMA DA QUÍMICA MEDICINAL: A FLEXIBILIDADE DOS LIGANTES E RECEPTORES." Química Nova **28**: 95-102.
- Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K. (1996). "VMD - Visual Molecular Dynamics." J. Molec. Graphics **14**: 33-38.
- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML (1983). " Comparison of simple potential functions for simulation liquid water." J Chem Phys **79**: 926–935.

- Jorgensen, W. L. a. T.-R., J. (2005). "Potential energy functions for atomic-level simulations of water and organic and biomolecular systems." PNAS **102**(19): 6665– 6670.
- Jorgensen, W. L. M., D. S.; and Tirado-Rives, J. (1996). "Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids." J. Am. Chem. Soc. **118**(45): 11225–11236.
- Jorgensen, W. L. T.-R., J. (1988). "The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin." J. Am. Chem. Soc. **110**(6): 1657–1666.
- Kastritis, P. L. M., I. H.; Hwang, H.; Weng, Z.; Bates, P. A.; Bonvin, A. M. J. J.; and Janin, J. (2010). "A structure-based benchmark for protein–protein binding affinity." PROTEIN SCIENCE. **20**: 482—491.
- Kiss, R., Sandor, M.; Szalai, F. A. (2012). "<http://Mcule.com>: a public web service for drug discovery." Journal of Cheminformatics **4**.
- Kroemer, R. T. (2007). "Structure-Based Drug Design: Docking and Scoring." Current Protein and Peptide Science **8**: 312-328.
- Kumari, G. S., R. K. (2012). "Highly Active Antiretroviral Therapy for treatment of HIV/AIDS patients: Current status and future prospects and the Indian scenario." HIV & AIDS Review **11**: 5-14.
- Kuntz, I. D., Blaney, J.M., Oatley, S.J., Langridge, R. and Ferrin, T.E (1982). J. Mol. Biol. **161**: 269-288.
- Lazzarotto, A. R. D., L. F.; Sprinz, E. (2010). "HIV/AIDS e Treinamento Concorrente: a Revisão Sistemática." Rev Bras Med Esporte **16**(2).
- Leach, A. R., Ed. (2001). Molecular Modelling: Principles and Applications.
- Lee, J. C. B., D. C.; Guinness, R. M.; Ahmad, T. (2009). "Pneumocystis jiroveci pneumonia and pneumomediastinum in an anti-TNF $\alpha$  naive patient with ulcerative colitis." World Journal of Gastroenterology **15**(15): 1897-1900.
- Lin, J. S., D. C.S.; de Moraes, S. M. F.; Xu, J. J.; Polzer, R.J.; and Winter, S. M. (2003). "The Role of Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity in Drug Discovery." Current Topics in Medicinal Chemistry **3**: 1125-1154.
- Lipinski, C. (2004). "Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution." Drug Discovery Today: Technologies **1**(4).
- Lipinski, C. A. (2004). "Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution." Drug Discovery Today: Technologies **1**(4).
- Lipinski, C. A. (2004). "Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution." Drug Discovery Today: Technologies. **1** **4**.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. (1997). "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings." Advanced Drug Delivery Reviews **23**: 3–25.



Lipinski, C. A. L., F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. (2001). "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development q settings." Advanced Drug Delivery Reviews **46**: 3-26.

Lorscheider, J. A. G., K. & Jean Colacite, J. (2012). "ESTUDO DA ADESÃO À TERAPIA ANTIRRETROVIRAL PARA HIV/AIDS DE PACIENTES ATENDIDOS NO MUNICÍPIO DE TOLEDO/PR." Acta Biomedica Brasiliensia **3**(1).

Lugassy, D. M. F., B. M.; Nelson, L. S. (2010). "Metabolic and Hepatobiliary Side Effects of Antiretroviral Therapy (ART)." Emerg Med Clin N Am **28**: 409–419.

Maestro (2012). "Schrödinger Suite 2012 Protein Preparation Wizard; Epik version 2.3, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012; Impact version 5.8, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012; Prime version 3.1, Schrödinger, LLC, New York, NY."

Magalhães, U. O. (2009). "Modelagem Molecular e Avaliação da Relação Estrutura - Atividade Acoplados a Estudos Físico-químicos, Farmacocinéticos e Toxicológicos In silico de Derivados Heterocíclicos com Atividade Leishmanicida " Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio de Janeiro - Rio de Janeiro - RJ.

Mandell, D., and Bennett's (2010). Principles and Practice of Infectious Diseases.

Mayne, C. G. S., J.; Schulten, K.; Tajkhorshid, E. and Gumbar, J. C. (2013). "Rapid parameterization of small molecules using the force field toolkit." Journal of Computational Chemistry **34**(32): 2757–2770.

Mcule (2013). "<https://mcule.com/apps/property-calculator/>." PROPERTY CALCULATOR. Retrieved 08 de abril de 2014, 2014.

Meanwell, N. A. (2011). "Improving Drug Candidates by Design: A Focus on Physicochemical Properties As a Means of Improving Compound Disposition and Safety." Chem. Res. Toxicol **24**: 1420-1456.

Meng, X. Z., H.; Mezei, M.; and Cu, M. (2011). "Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery." Curr Comput Aided Drug De **7**(2): 146–157.

Metropolis, N. U., S. (1949). "The Monte Carlo method." J. Amer. Statist. Assoc. **44**: 335–341.

Montagnier, L. (2002). "A History of HIV Discovery." Science **298**(5599): 1727-1728.

Monticelli, L. a. T., P. D. (2013). "Force fields for classical molecular dynamics." Methods in Molecular Biology **924**: 197-213.

Morris, G. M., Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. (1998). "Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function." J. Comput Chem. **19**(14): 1639–1662.

Morris, G. M. G., D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K. and Olson, A.J (1998). J. Comput. Chem. **19**: 1639-1662.

Moylett, E. H. a. S., W. T. (2002). "HIV: Clinical manifestations." J ALLERGY CLIN IMMUNOL.

- Muegge, I. (2003). "Selection Criteria for Drug-Like Compounds." Medicinal Research Reviews **23**(3): 302-321.
- Mukesh, B. R., K. (2011). "Molecular Docking: A Review." International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy **2**(6): 1746 - 1751.
- Namba, A. M. S., V. B.; Silva, C. H. T. P. (2008). "Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos." Ecl. Quím **33**(4): 13-24.
- Namd "<http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>."
- Nickel, J. G., B.; Erehman, J.; Banerjee, P.; Rong, W. W.; Goede, A.; Dunkel, M.; and Preissner, R. (2014). "SuperPred: update on drug classification and target prediction." Nucleic Acids Research **12**.
- Papadopulos, M. A. H., G. M. and Tiemessen, C. T. (2003). "Evolution and Diversity of HIV-1 in Africa - a Review." Virus Genes **26**(2): 151-163.
- ParamChem "<https://www.paramchem.org/>."
- Paruthi, J. G., N.; Mantzoros, C. S. (2013). "Adipokines in the HIV/HAART-associated lipodystrophy syndrome." Metabolism clinical and experimental **62**: 1199-1205.
- Pearlman, D. A. C., D. A.; Caldwell, J. W.; Ross, W. S.; Cheatham III, T. E.; DeBolt, S.; Ferguson, D.; Seibel, G.; and Kollman, P. (1995). "AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules." Comp. Phys. Commun. **91**: 1-41.
- Pearlman DAC, D. A. C., J. W.; Ross, W. S.; Cheatham III, T. E.; DeBolt, S.; Ferguson, D.; Seibel, G.; and Kollman, P. (1995). "AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. ." Comp Phys Commun. **91**: 1- 41.
- Pereira, A. J. N., L. Y. I. (2011). "A sociedade civil contra a Aids: demandas coletivas e políticas públicas." Ciência & Saúde Coletiva **16**(7): 3249-3257.
- Phillips, J. C. B., R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kalé, L. and Schulten, K. (2005). "Scalable Molecular Dynamics with NAMD." J Comput Chem **26**(16): 1781–1802.
- Pinto, M. E. S., C. J. (2006). "A diversidade do HIV-1: uma ferramenta para o estudo da pandemia " Cad. Saúde Pública **22**(3): 473-484.
- Portal, O. C. (2012). OSIRIS Property Explorer.
- ProTox "<http://tox.charite.de/tox/>."
- Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T. and Klebe, G. (1996). J. Mol. Biol. **261**: 470–489.
- Sant'Anna, C. M. R. (2009). "Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução." Rev. Virtual Quím. **1**(1): 49-57.

Santiago, M. L. R., F.; Keele, B. F.; Li, Y.; Bailes, E.; Bibollet-Ruche, F.; Fruteau, C.; Noe, R.; Peeters, M.; Brookfield, J. F. Y.; Shaw, G. M.; Sharp, P. M.; Hahn, B. H. (2005). "Simian Immunodeficiency Virus Infection in Free-Ranging Sooty Mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Tai Forest, Côte d'Ivoire: Implications for the Origin of Epidemic Human Immunodeficiency Virus Type 2." Journal of Virology **79**(19): 12515–12527.

Sarafianos, S. G. J., A. D. C.; Das, K.; Tuske, S.; Birktoft, J.J.; Ilankumaran, P.; Ramesha, A. R.; Sayer, J. M.; Jerina, D. M.; Boyer, P. L.; Hughes, S. H. and Arnold, E. (2002). "Structures of HIV-1 reverse transcriptase with pre- and post-translocation AZTMP-terminated DNA." The EMBO Journal **21**(23): 6614-6624.

Sarafianos, S. G. J., A. D. C.; Tuske, S.; Squire, C. J.; Das, K.; Sheng, D.; Ilankumaran, P.; Ramesha, A. R.; Kroth, H.; Sayer, J. M.; Jerina, D. M.; Boyer, P. L.; Hughes, S. H.; and Arnold, E. (2003). "Trapping HIV-1 Reverse Transcriptase Before and After Translocation on DNA." The Journal of Biological Chemistry **278**(18): 16280–16288.

Sarafianos, S. G. M., B.; Das, K.; Himmel, D.; Parniak, M. A.; Hughes, S. H.; and Arnold, E. (2009). "Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition." J Mol Biol **385**(3): 693–713.

saúde, M. d. (2010). "Protocolo de Assistência Farmacêutica em DST/HIV/Aids." **1**.

SAÚDE, M. D. (2013). B o l e t i m E p i d e m i o l ó g i c o Brasília. **Programa Nac. de DST/AIDS**: 68.

Saúde, M. d. (2014). "Portal sobre aids, doenças sexualmente transmissíveis e hepatites virais." <http://www.aids.gov.br/pcdt>

Schmidt U., S. S., Gruening B., Hossbach J., Jaeger I.S., Parol R., Lindequist U., Teuscher E., Preissner R. (2009). "SuperToxic: a comprehensive database of toxic compounds." Nucleic Acids Res **37**.

Schrodinger, L. "The PyMOL Molecular Graphics System." **Version 1.5.0.4**.

Schüttelkopf, A. W. a. v. A., D. M. F. (2004). "PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes." Acta Cryst. **60**: 1355-1363.

Schwartz, J. T. S., M. (1988). "A survey of motion planning and related geometric algorithms." Artificial Intelligence **37**: 157–169.

Sharp, P. M. B., E.; Chaudhuri, R. R.; Rodenburg, C. M.; Santiago, M. O.; Hahn, B. H. (2001). "The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when?" The Royal Society **356**: 867-876.

Shelley, J. C. C., A.; Frye, L. L.; Greenwood, J. R.; Timlin M. R.; Uchiyama, M. (2007). "Epik: a software program for pKa prediction and protonation state generation for druglike molecules " J. Comput. Aided Mol. Des., **21**: 681–691.

Sheng-You Huang 1, 3,4 and Xiaoqin Zou 1 (2010). "Advances and Challenges in Protein-Ligand Docking." International Journal of Molecular Sciences **11**: 3016-3034.

Siliciano, J. D. a. S., R. F. (2013). "Recent trends in HIV-1 drug resistance." Current Opinion in Virology **3**: 487–494.

- Southan, C. a. S., A. (2013). "Extracting and connecting chemical structures from text sources using chemicalize.org." Journal of Cheminformatics **5**(20).
- Souza, B. M. B. V., C. C.; Tenório, D. M.; Lucena, M. G. A.; Holanda, R. L. T. (2010). "A Política de AIDS no Brasil: uma abordagem histórica." J Manag Prim Health Care **1**(1): 23-26.
- Sundquist, W. I. a. K., H-G. (2012). "HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation." Cold Spring Harb Perspect Med.
- Til, N. P. V. H., K. M.; Rijt, R. V. D.; Paulusma, C. C.; Wijland, M. V.; Markusic, D. M.; Elferink, R. P. J. O. and Seppen, J. (2008). "Alteration of viral lipid composition by expression of the phospholipid floppase ABCB4 reduces HIV vector infectivity." Retrovirology: 1-9.
- Tuske S, S. S., Clark AD Jr, Ding J, Naeger LK, White KL, Miller MD, Gibbs CS, Boyer PL, Clark P, Wang G, Gaffney BL, Jones RA, Jerina DM, Hughes SH, Arnold E. (2004). "Structures of HIV-1 RT-DNA complexes before and after incorporation of the anti-AIDS drug tenofovir." Nat Struct Mol Biol **11**(5): 469-474.
- Tuske, S. S., S. G.; Clark Jr, A. D.; Ding, J.; Naeger, L. K.; White, K. L.; Miller, M. D.; Gibbs, C. S.; Boyer, P. L.; Clark, P.; Wang, G.; Gaffney, B. L.; Jones, R. A.; Jerina, D. M.; Hughes, S. H.; & Arnold, E. (2004). "Structures of HIV-1 RT-DNA complexes before and after incorporation of the anti-AIDS drug tenofovir." Nature Structural & Molecular Biology **11**: 469 - 474.
- UNAIDS (2013). "GLOBAL REPORT: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013." 198.
- Valente, O. A. A. M. V. (2007). "HIV lipodystrophy syndrome: a new challenge to the endocrinologist." Arq Bras Endocrinol Metabol **51**(1): 3-4.
- Vanommeslaeghe, K. E. H., C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. Vorobyov, A. D. MacKerell Jr. (2010). "CHARMM General Force Field: A Force field for Drug-Like Molecules Compatible with the CHARMM All-Atom Additive Biological Force Field." J. Comput. Chem. **31**: 671-690.
- Veber, D. F. J., S. R.; Cheng, H.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; and Kopple, K. D. (2002). "Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates." J. Med. Chem. **45**: 2615-2623.
- Veloso, A. C. R. F., H. T. K.; Lima, L. M. P. (2010). "Resistência genotípica do Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 aos antirretrovirais." Com. Ciências Saúde **21**(1): 49-60.
- Verdonk, M. L. e. a. (2003). "Improved Protein-Ligand Docking Using GOLD." PROTEINS: Structure, Function, and Genetics **52**: 609 – 623.
- VMD "<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>."
- Walters, W. P. M., M. A. (2002). "Prediction of Drug-Likeness." Advanced Drug Delivery **4**(3): 255-271.
- Younai, F. S. (2013). "Thirty years of the human immunodeficiency virus epidemic and beyond." International Journal of Oral Science **5**: 191–199.

Yu, X. H. W., K. Vanommeslaeghe, A. D. MacKerell Jr. (2012). "Extension of the CHARMM General Force Field to Sulfonyl-Containing Compounds and Its Utility in Biomolecular Simulations." J. Comput. Chem. **33**: 2451-2468.

# ANEXO A – ARQUIVOS DE ENTRADA PARA SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR

## A.1) Arquivo de entrada para a minimização.

```
#####  
## JOB DESCRIPTION                ##  
#####  
  
# This is what this job does  
set restart_job 0  
set do_pbc 1  
set do_pme 1  
set do_lgv_pressure 1  
set do_freeze 0  
set do_restraints 1  
set do_imd 0  
set do_minimize 1  
set do_md 0  
set temperature 310  
set pressure 1.01325 ;#1 atm in bar  
set basename ionized  
set inputname ionized  
set outputname em  
set em_steps 2500  
set md_steps 50000  
  
#####  
## ADJUSTABLE PARAMETERS          ##  
#####  
structure      $basename.psf  
coordinates    $basename.pdb  
outputName     $outputname  
binaryoutput   yes  
  
# Continuing a job from the restart files  
if {$restart_job} {  
  binCoordinates $inputname.coor  
  binVelocities  $inputname.vel ;# remove the "temperature" entry if you use this!  
  extendedSystem $inputname.xsc  
} else {
```

```

temperature $temperature
}

firsttimestep 0
#####
## SIMULATION PARAMETERS ##
#####
# Input
paraTypeCharmm on
parameters par_all27_prot_lipid.inp
parameters par_all36_cgenff.prm

# Periodic Boundary conditions
# NOTE: Do not set the periodic cell basis if you have also
# specified an .xsc restart file!
if {$do_pbc} {
cellBasisVector1 99.19 0. 0.
cellBasisVector2 0. 121.49 0.
cellBasisVector3 0. 0. 114.73
cellOrigin -38.45 -5.63 19.94
}
wrapWater on
wrapAll on

# Force-Field Parameters
exclude scaled1-4
1-4scaling 1.0
cutoff 10.
switching on
switchdist 8.
pairlistdist 14.

# Integrator Parameters
timestep 2.0 ;# 2fs/step
rigidBonds all ;# needed for 2fs steps
nonbondedFreq 1
fullElectFrequency 4
stepspercycle 20
pairlistsPerCycle 2

#PME (for full-system periodic electrostatics)
if {$do_pme} {
PME yes
}

```

```

PMEGridSpacing 1.0
}

# Constant Temperature Control
langevin      on  ;# do langevin dynamics
langevinDamping 1  ;# damping coefficient (gamma) of 5/ps
langevinTemp  $temperature
langevinHydrogen no ;# don't couple langevin bath to hydrogens

# Constant Pressure Control (variable volume)
if {$do_lgv_pressure} {
useGroupPressure yes ;# needed for 2fs steps
useFlexibleCell   yes ;# no for water box, yes for membrane
useConstantArea  yes ;# no for water box, yes for membrane

langevinPiston    on
langevinPistonTarget $pressure ;# in bar -> 1 atm
langevinPistonPeriod 200.
langevinPistonDecay 100.
langevinPistonTemp  $temperature
}

#Output options
restartfreq 5000 ;# write restart files every 5000 steps = 10ps
dcdfreq    50   ;# write trajectory file every 100 steps = 0.2ps
veldcdfreq 100  ;# write velocities files every 100 steps = 0.2ps
xstFreq    100  ;# write system extension files every 100 steps = 0.2ps
outputEnergies 100 ;# write energies to output file every 100 steps = 0.2ps
outputPressure 100 ;# write pressure to output file every 100 steps = 0.2ps
outputtiming 100  ;# write time statistics to output file every 100 steps = 0.2ps

# Fixed Atoms Constraint (set PDB beta-column to 1)
if {$do_freeze} {
fixedAtoms    on
fixedAtomsFile myfixedatoms.pdb
fixedAtomsCol B
}
# Apply Harmonic Restraints to selected atoms
if {$do_restraints} {
constraints    on
consref       restraint.pdb ;# PDB file with equilibrium position of restrained atoms
conskfile     restraint.pdb ;# PDB file with k constant of the restraint
conskcol      B             ;# Column of the PDB file that defines the value of k for each restrained atom

```



```

# Atoms with not restraint needs to have 0 in this column
}

# IMD Settings (can view sim in VMD)
if {$do_imd} {
IMDon      on
IMDport    3000  ;# port number (enter it in VMD)
IMDfreq    1    ;# send every 1 frame
IMDwait    no   ;# wait for VMD to connect before running?
}

#####
## EXTRA PARAMETERS                ##
#####

# Put here any custom parameters that are specific to
# this job (e.g., SMD, TclForces, etc...)

#####
## EXECUTION SCRIPT                 ##
#####

# Minimization
if {$do_minimize} {
minimize    $em_steps
reinitvels  $temperature
}

# MD
if {$do_md} {
run $md_steps
}

```

## A.2) Arquivo de entrada para equilibração.

```
#####  
## JOB DESCRIPTION                                ##  
#####  
# This is what this job does  
set restart_job 1  
set do_pbc 0  
set do_pme 1  
set do_lgv_pressure 1  
set do_freeze 0  
set do_restraints 1  
set do_imd 0  
set do_minimize 0  
set do_md 1  
set temperature 310  
set pressure 1.01325 ;#1 atm in bar  
set basename ionized  
set inputname em  
set outputname equilibration  
set em_steps 2500  
set md_steps 1250000  
  
#####  
## ADJUSTABLE PARAMETERS                          ##  
#####  
structure      $basename.psf  
coordinates    $basename.pdb  
outputName     $outputname  
binaryoutput yes  
  
# Continuing a job from the restart files  
if {$restart_job} {  
  binCoordinates $inputname.coor  
  binVelocities  $inputname.vel ;# remove the "temperature" entry if you use this!  
  extendedSystem $inputname.xsc  
} else {  
  temperature $temperature  
}  
firsttimestep 0  
#####
```

```

## SIMULATION PARAMETERS                                ##

#####

# Input
paraTypeCharmm      on
parameters           par_all27_prot_lipid.inp
parameters           par_all36_cgenff.prm

# Periodic Boundary conditions
# NOTE: Do not set the periodic cell basis if you have also
# specified an .xsc restart file!
if {$do_pbc} {
cellBasisVector1  99.19  0.  0.
cellBasisVector2  0.  121.49  0.
cellBasisVector3  0.  0.  114.73
cellOrigin        -38.45 -5.63  19.94
}
wrapWater          on
wrapAll            on

# Force-Field Parameters
exclude            scaled1-4
1-4scaling         1.0
cutoff             10.
switching          on
switchdist         8.
pairlistdist       14.

# Integrator Parameters
timestep           2.0 ;# 2fs/step
rigidBonds         all ;# needed for 2fs steps
nonbondedFreq      1
fullElectFrequency 4
stepspcycle        20
pairlistsPerCycle  2

#PME (for full-system periodic electrostatics)
if {$do_pme} {
PME                yes
PMEGridSpacing     1.0
}

# Constant Temperature Control

```

```

langevin      on    ;# do langevin dynamics

langevinDamping  1    ;# damping coefficient (gamma) of 5/ps
langevinTemp    $temperature
langevinHydrogen no    ;# don't couple langevin bath to hydrogens

# Constant Pressure Control (variable volume)
if {$do_lgv_pressure} {
useGroupPressure  yes ;# needed for 2fs steps
useFlexibleCell   yes ;# no for water box, yes for membrane
useConstantArea   yes ;# no for water box, yes for membrane

langevinPiston    on
langevinPistonTarget $pressure ;# in bar -> 1 atm
langevinPistonPeriod 200.
langevinPistonDecay 100.
langevinPistonTemp $temperature
}

#Output options
restartfreq      5000    ;# write restart files every 5000 steps = 10ps
dcdfreq          1000    ;# write trajectory file every 100 steps = 0.2ps
velcdfreq        1000    ;# write velocities files every 100 steps = 0.2ps
xstFreq          1000    ;# write system extension files every 100 steps = 0.2ps
outputEnergies   1000    ;# write energies to output file every 100 steps = 0.2ps
outputPressure   1000    ;# write pressure to output file every 100 steps = 0.2ps
outputtiming      1000    ;# write time statistics to output file every 100 steps = 0.2ps

# Fixed Atoms Constraint (set PDB beta-column to 1)
if {$do_freeze} {
fixedAtoms       on
fixedAtomsFile   myfixedatoms.pdb
fixedAtomsCol    B
}

# Apply Harmonic Restraints to selected atoms
if {$do_restraints} {
constraints      on
consref          restraint.pdb ;# PDB file with equilibrium position of restrained atoms
conskfile        restraint.pdb ;# PDB file with k constant of the restraint
conskcol         B           ;# Column of the PDB file that defines the value of k for each restrained atom
                    # Atoms with not restraint needs to have 0 in this column
}

```

```

# IMD Settings (can view sim in VMD)
if {$do_imd} {
IMDon      on
IMDport    3000  ;# port number (enter it in VMD)
IMDfreq    1     ;# send every 1 frame
IMDwait    no   ;# wait for VMD to connect before running?
}

#####
## EXTRA PARAMETERS                ##
#####
# Put here any custom parameters that are specific to
# this job (e.g., SMD, TclForces, etc...)

#####
## EXECUTION SCRIPT                 ##
#####
# Minimization
if {$do_minimize} {
minimize    $sem_steps
reinitvels  $temperature
}
# MD
if {$do_md} {
run $md_steps
}

```

### A.3) Arquivo de entrada para simulação de dinâmica molecular.

```
#####  
## JOB DESCRIPTION ##  
#####  
# This is what this job does  
set restart_job 1  
set do_pbc 0  
set do_pme 1  
set do_lgv_pressure 1  
set do_freeze 0  
set do_restraints 1  
set do_imd 0  
set do_minimize 0  
set do_md 1  
set temperature 310  
set pressure 1.01325 ;#1 atm in bar  
set basename ionized  
set inputname equilibration  
set outputname md_3tc_25ns  
set em_steps 2500  
set md_steps 1250000  
  
#####  
## ADJUSTABLE PARAMETERS ##  
#####  
structure $basename.psf  
coordinates $basename.pdb  
outputName $outputname  
binaryoutput yes  
  
# Continuing a job from the restart files  
if {$restart_job} {  
  binCoordinates $inputname.coor  
  binVelocities $inputname.vel ;# remove the "temperature" entry if you use this!  
  extendedSystem $inputname.xsc  
} else {  
  temperature $temperature  
}  
firstimestep 0
```

```

#####
## SIMULATION PARAMETERS                                ##
#####
# Input
paraTypeCharmm      on
parameters           par_all27_prot_lipid.inp
parameters           par_all36_cgenff.prm

# Periodic Boundary conditions
# NOTE: Do not set the periodic cell basis if you have also
# specified an .xsc restart file!
if {$do_pbc} {
cellBasisVector1  99.19  0.  0.
cellBasisVector2  0.  121.49  0.
cellBasisVector3  0.  0.  114.73
cellOrigin        -38.45 -5.63 19.94
}
wrapWater          on
wrapAll            on

# Force-Field Parameters
exclude            scaled1-4
1-4scaling         1.0
cutoff             10.
switching          on
switchdist         8.
pairlistdist       14.

# Integrator Parameters
timestep           2.0 ;# 2fs/step
rigidBonds         all ;# needed for 2fs steps
nonbondedFreq      1
fullElectFrequency 4
stepspcycle        20
pairlistsPerCycle  2

#PME (for full-system periodic electrostatics)
if {$do_pme} {
PME                yes
PMEGridSpacing      1.0
}

# Constant Temperature Control

```

```

langevin      on    ;# do langevin dynamics
langevinDamping  1    ;# damping coefficient (gamma) of 5/ps
langevinTemp    $temperature
langevinHydrogen no  ;# don't couple langevin bath to hydrogens

# Constant Pressure Control (variable volume)
if {$do_lgv_pressure} {
  useGroupPressure  yes ;# needed for 2fs steps
  useFlexibleCell   no  ;# no for water box, yes for membrane
  useConstantArea   no  ;# no for water box, yes for membrane

  langevinPiston    on
  langevinPistonTarget $pressure ;# in bar -> 1 atm
  langevinPistonPeriod 200.
  langevinPistonDecay 100.
  langevinPistonTemp $temperature
}

#Output options
restartfreq      5000 ;# write restart files every 5000 steps = 10ps
dcdfreq          2000 ;# write trajectory file every 100 steps = 0.2ps
velcdcfreq      2000 ;# write velocities files every 100 steps = 0.2ps
xstFreq          2000 ;# write system extension files every 100 steps = 0.2ps
outputEnergies   2000 ;# write energies to output file every 100 steps = 0.2ps
outputPressure   2000 ;# write pressure to output file every 100 steps = 0.2ps
outputtiming      2000 ;# write time statistics to output file every 100 steps = 0.2ps

# Fixed Atoms Constraint (set PDB beta-column to 1)
if {$do_freeze} {
  fixedAtoms      on
  fixedAtomsFile  myfixedatoms.pdb
  fixedAtomsCol   B
}

# Apply Harmonic Restraints to selected atoms
if {$do_restraints} {
  constraints      on
  consref          restraint.pdb ;# PDB file with equilibrium position of restrained atoms
  conskfile        restraint.pdb ;# PDB file with k constant of the restraint
  conskcol         B            ;# Column of the PDB file that defines the value of k for each restrained atom
                        # Atoms with not restraint needs to have 0 in this column
}

```



```

# IMD Settings (can view sim in VMD)
if {$do_imd} {
  IMDon      on
  IMDport    3000  ;# port number (enter it in VMD)
  IMDfreq    1     ;# send every 1 frame
  IMDwait    no    ;# wait for VMD to connect before running?
}

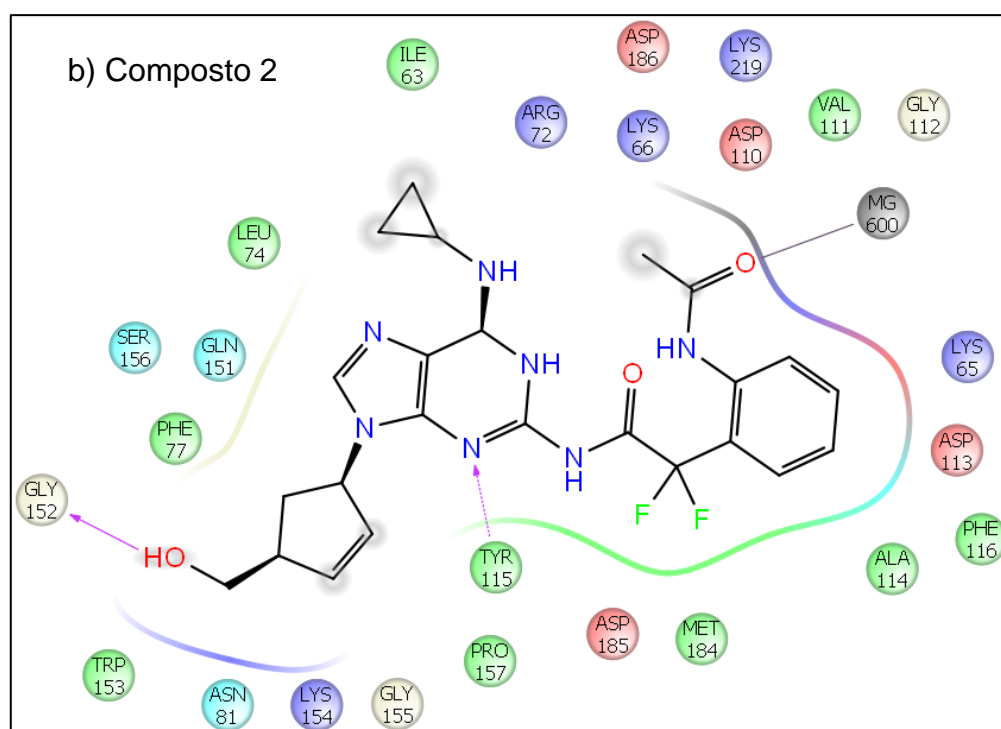
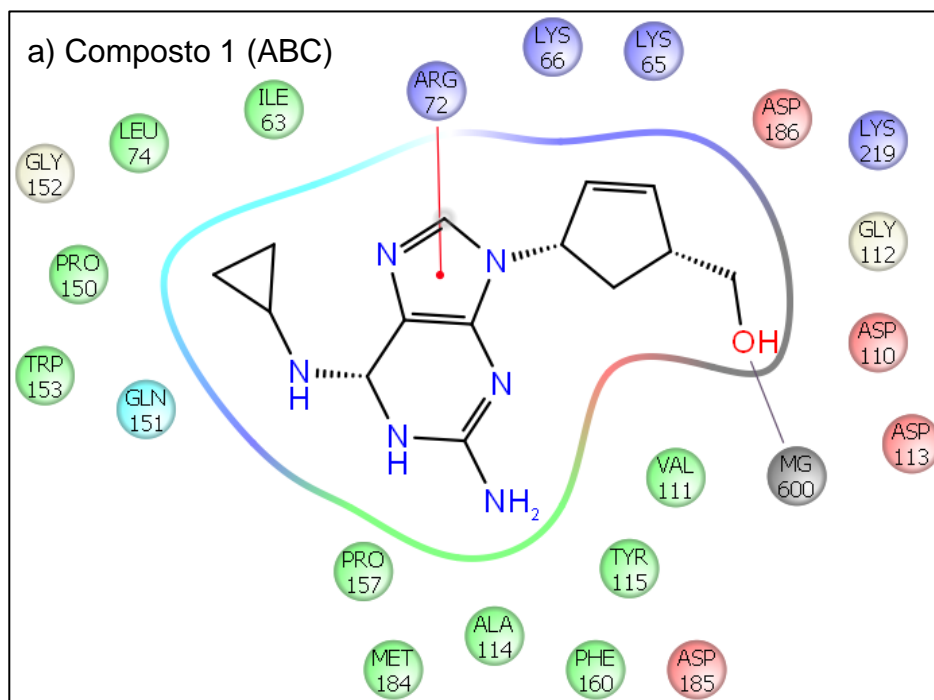
#####
## EXTRA PARAMETERS                ##
#####
# Put here any custom parameters that are specific to
# this job (e.g., SMD, TclForces, etc...)

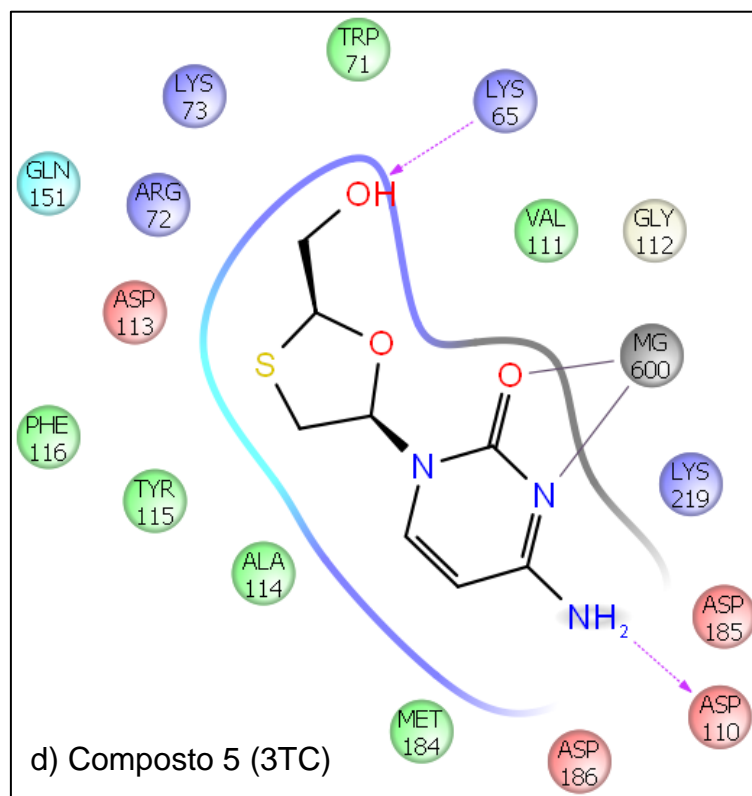
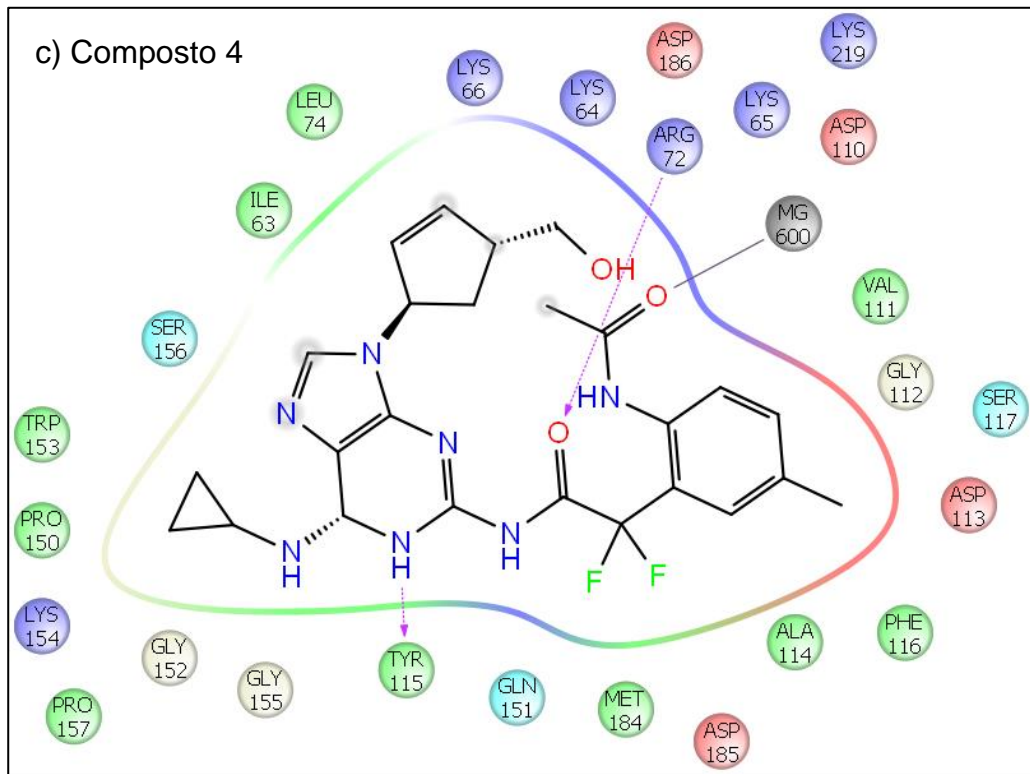
#####
## EXECUTION SCRIPT                  ##
#####
# Minimization
if {$do_minimize} {
  minimize    $sem_steps
  reinitvels  $temperature
}

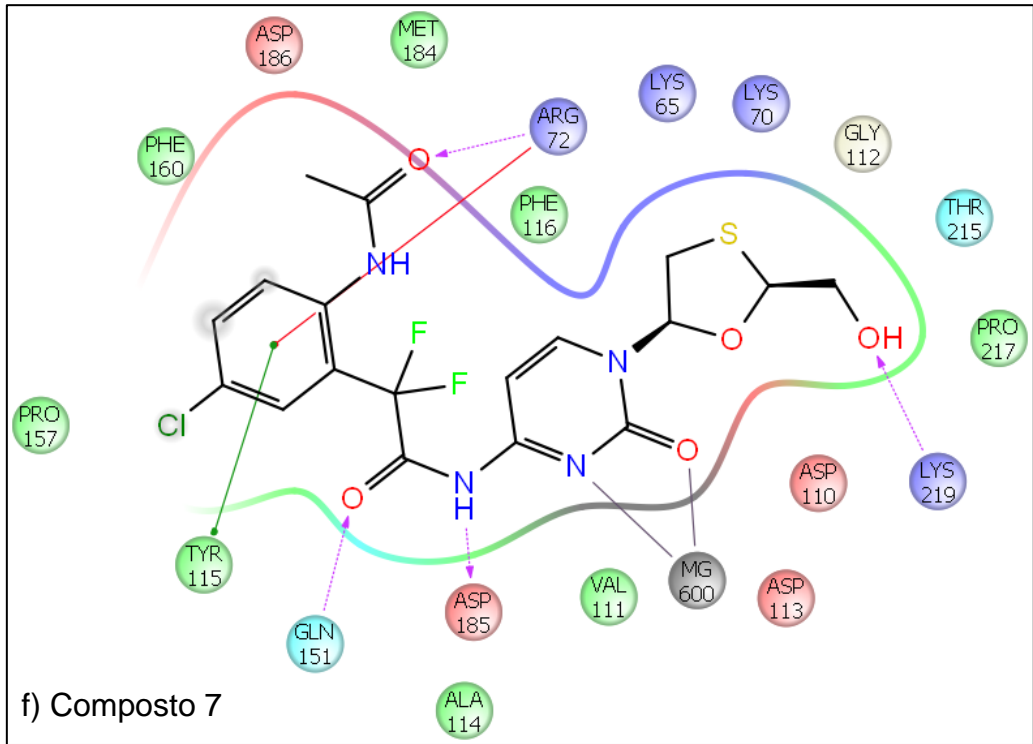
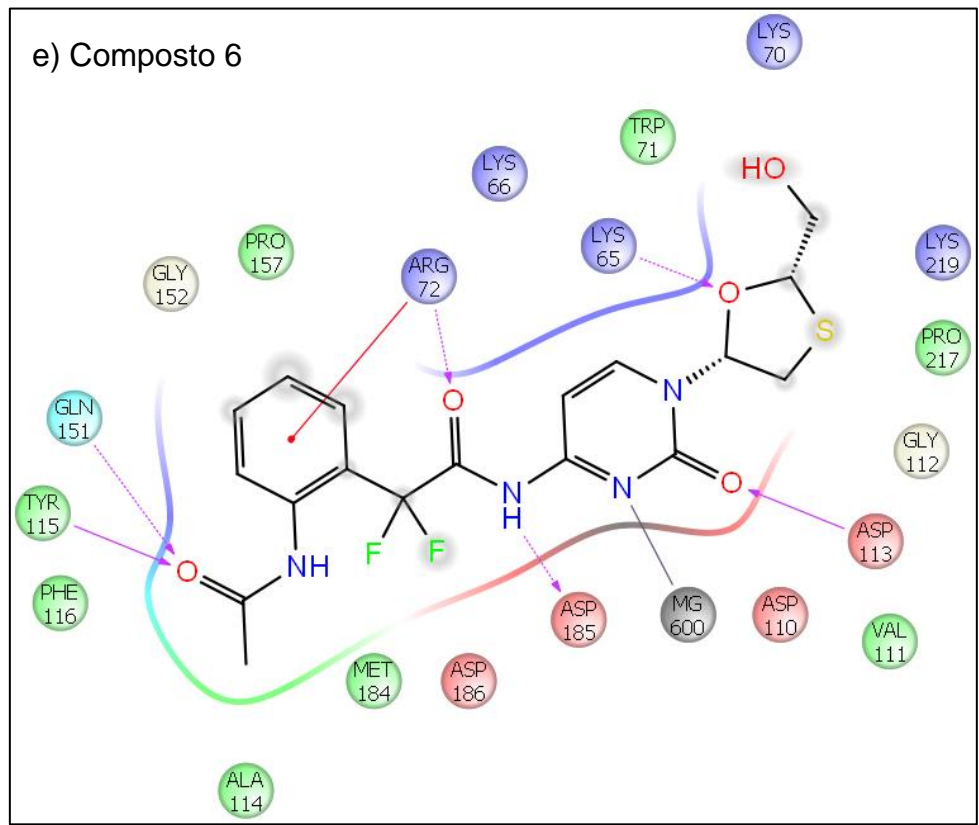
# MD
if {$do_md} {
  run $md_steps
}

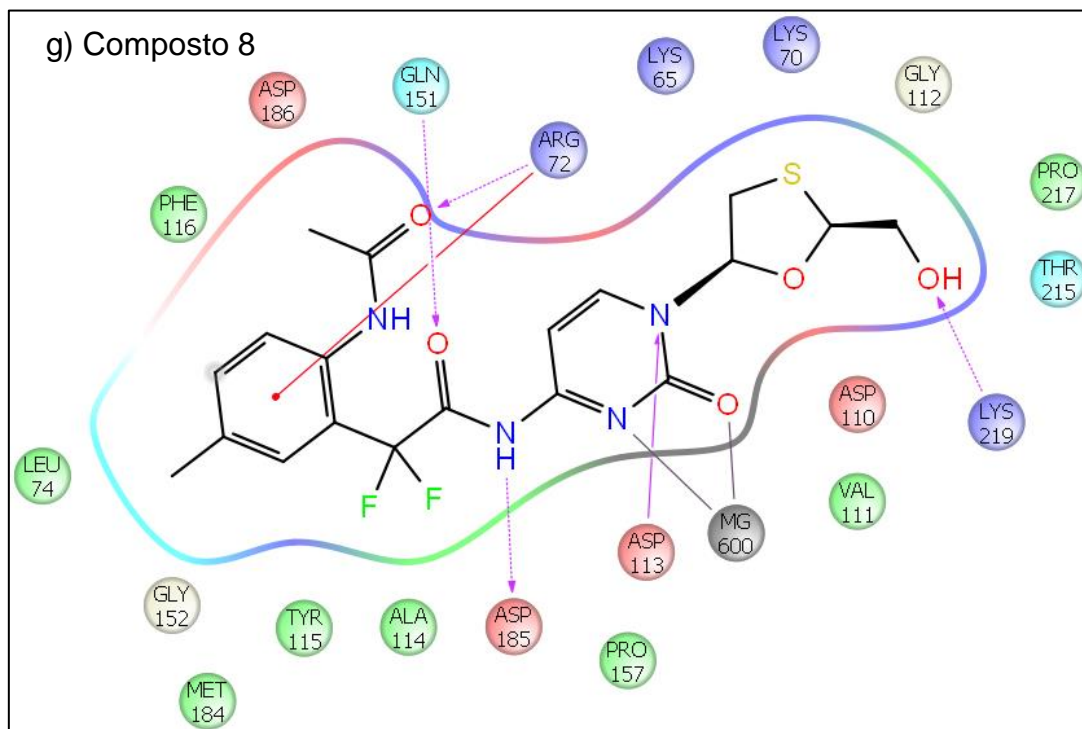
```

## ANEXO B – MAPAS DE INTERAÇÕES DOS COMPOSTOS REFERENTE AO PRIMEIRO PROCEDIMENTO DE DOCKING









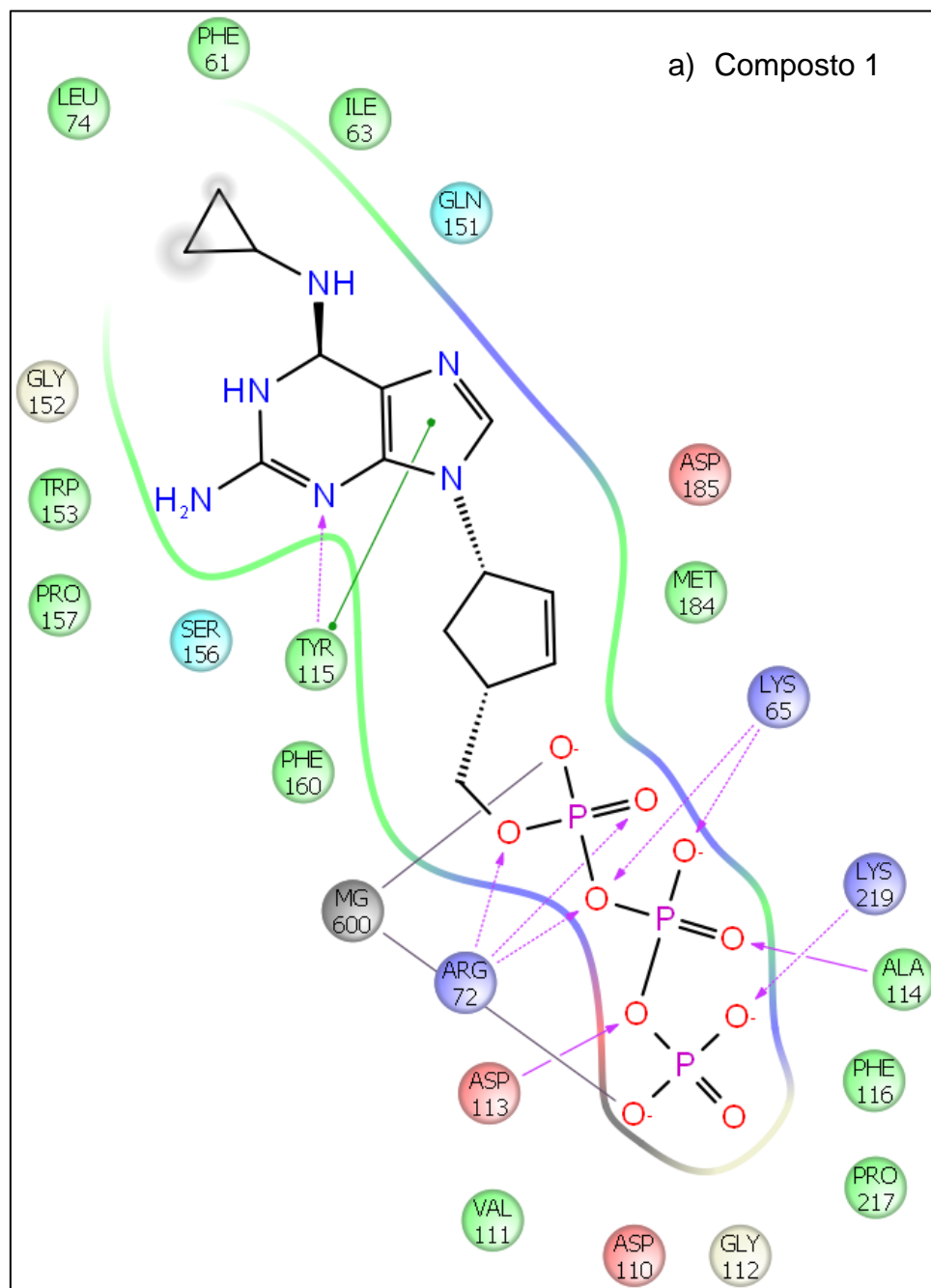
Legenda:

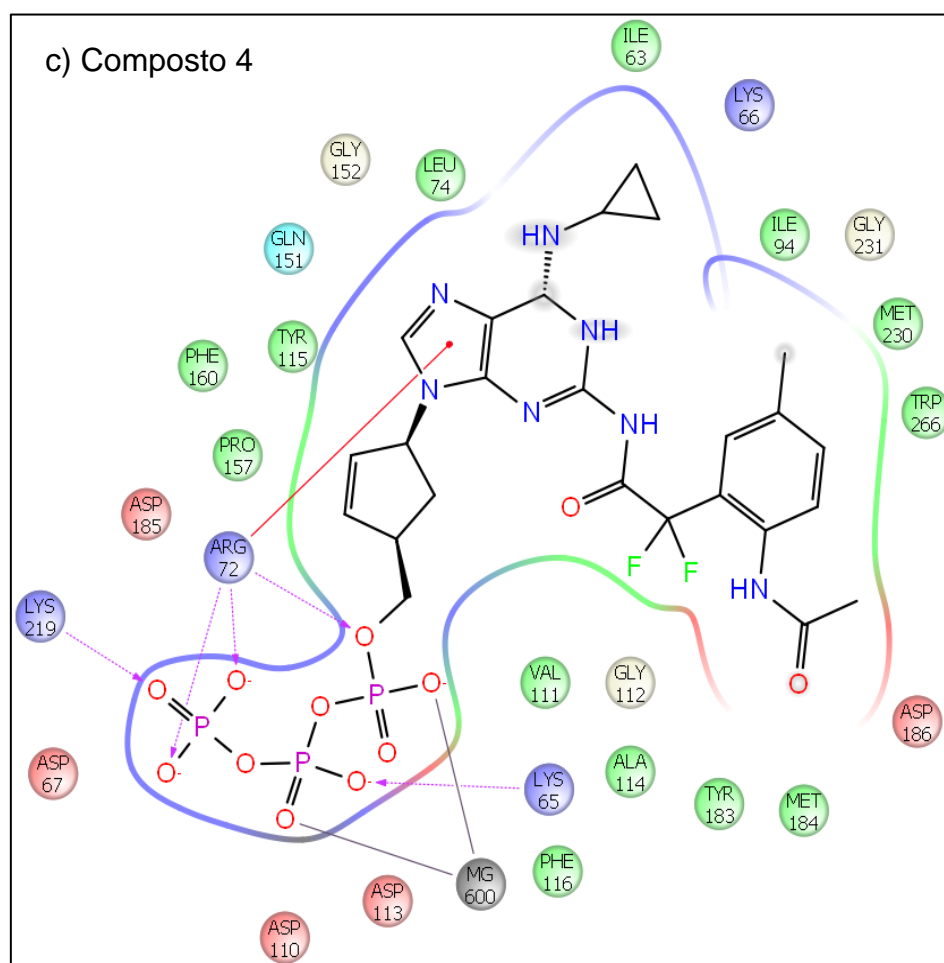
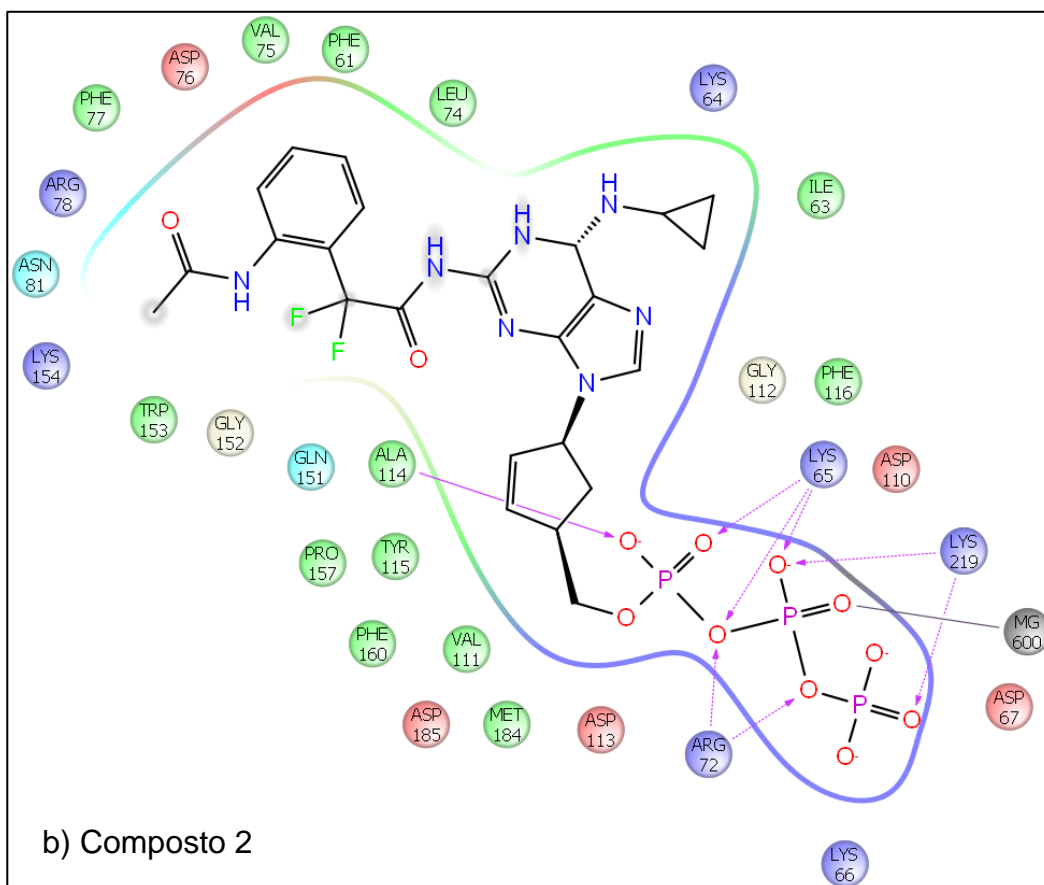
<span style="color: red;">●</span> Carga negativa	<span style="color: grey;">●</span> Metal	<span style="color: red;">→</span> Cátion $\pi$
<span style="color: blue;">●</span> Carga positiva	<span style="color: grey;">H<sub>2</sub>O</span> Água	<span style="color: blue;">→</span> Lig. H (cadeia principal)
<span style="color: cyan;">●</span> Polar	<span style="color: orange;">●</span> Sítio de hidratação	<span style="color: blue;">- - -</span> Lig. H (cadeia lateral)
<span style="color: green;">●</span> Hidrofóbico	<span style="color: orange;">X</span> Sítio de hidratação deslocado	<span style="color: grey;">—</span> Coordenação metal
<span style="color: yellow;">●</span> Glicina	<span style="color: green;">—</span> Interação $\pi$ - $\pi$	<span style="color: grey;">○</span> Exposição solvente

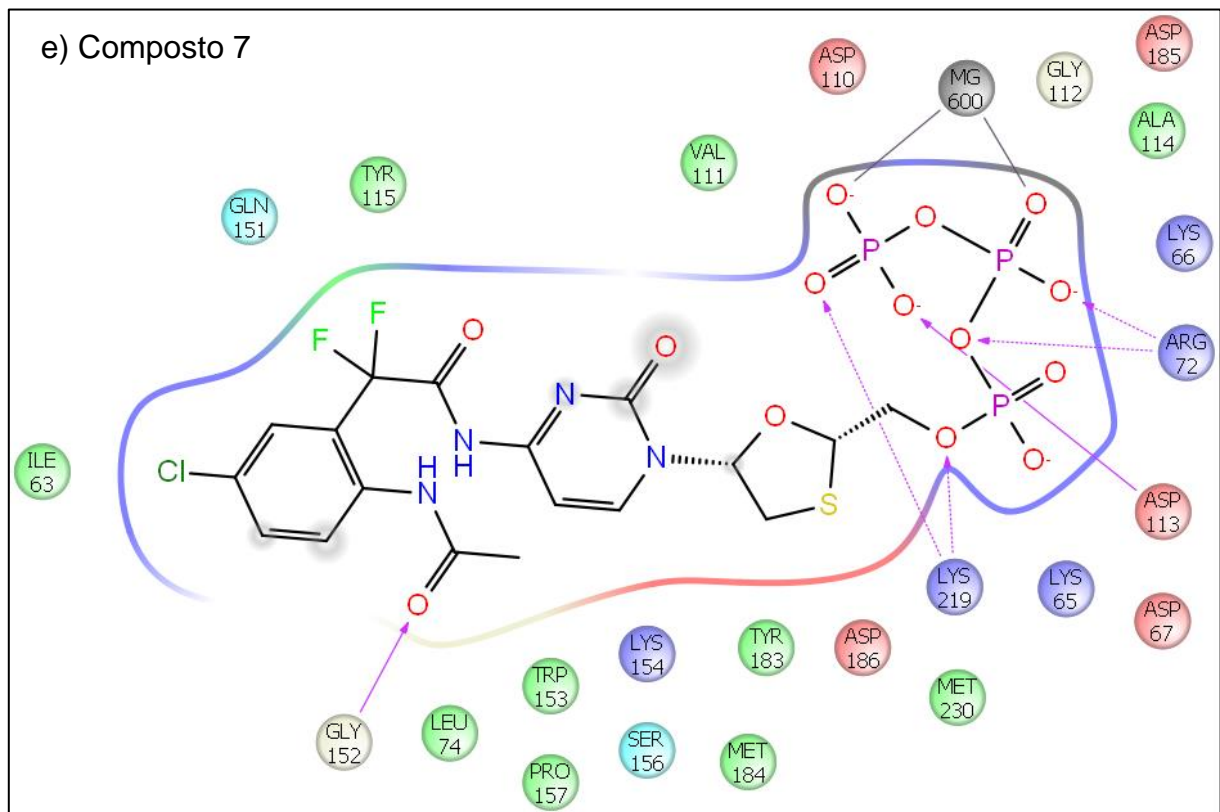
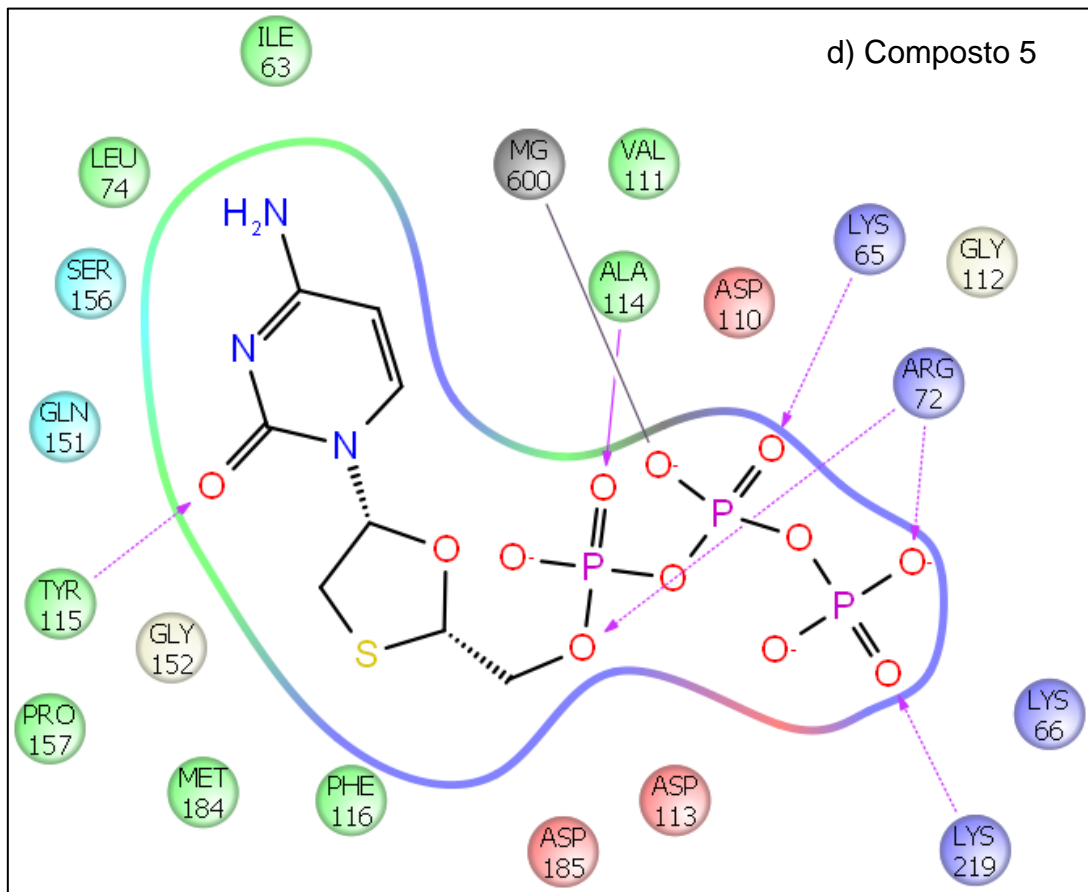
**Figura 4:** Mapas de interações dos compostos com um cut-off de 5 Å, (a) Composto 1, (b) Composto 2, (c) Composto 4, (d) Composto 5, (e) Composto 6, (f) Composto 7, (g) Composto

8.

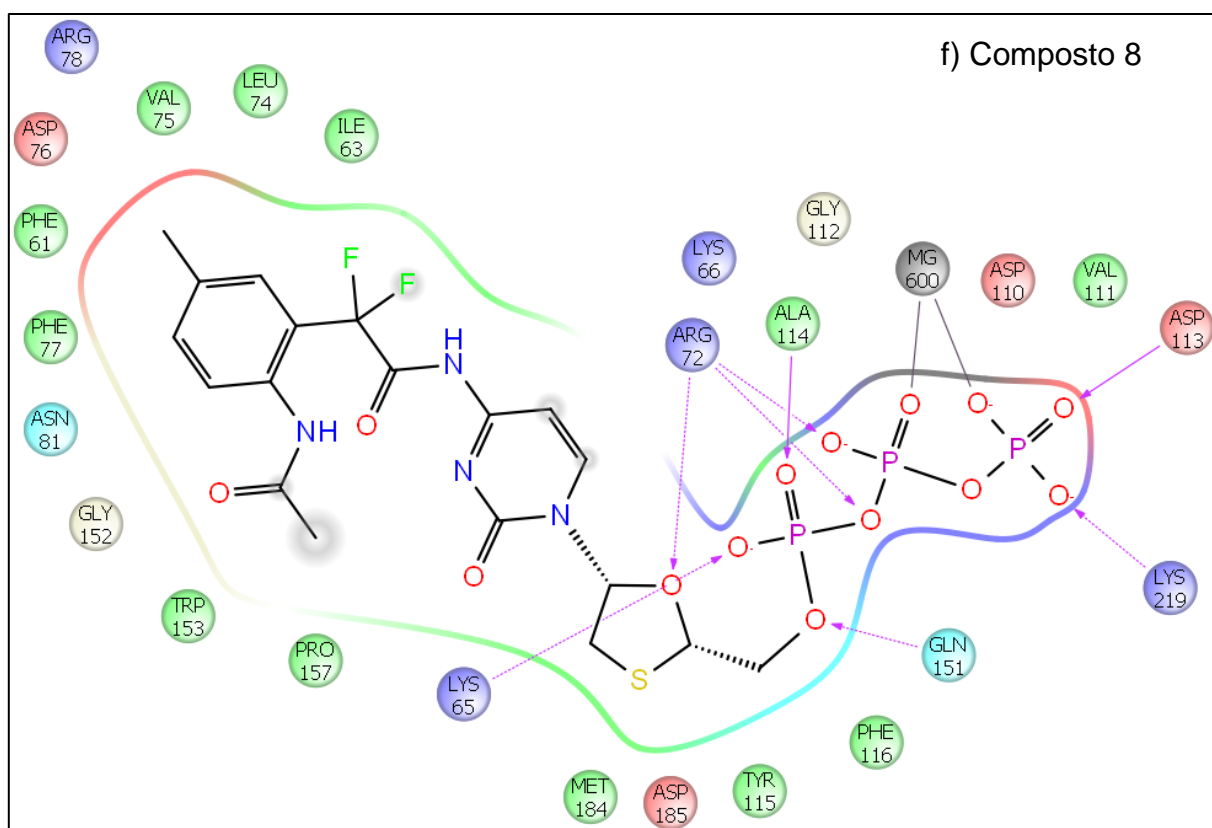
## ANEXO C – MAPAS DE INTERAÇÕES DOS COMPOSTOS REFERENTE AO SEGUNDO PROCEDIMENTO DE DOCKING









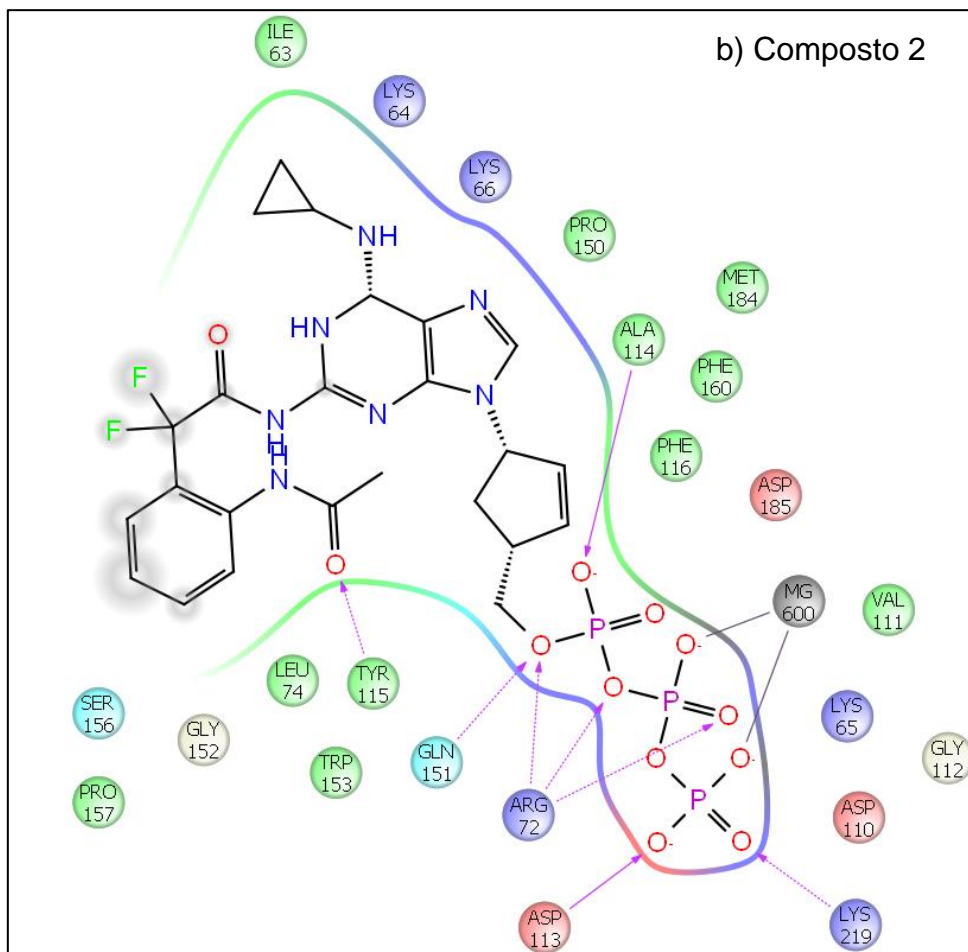
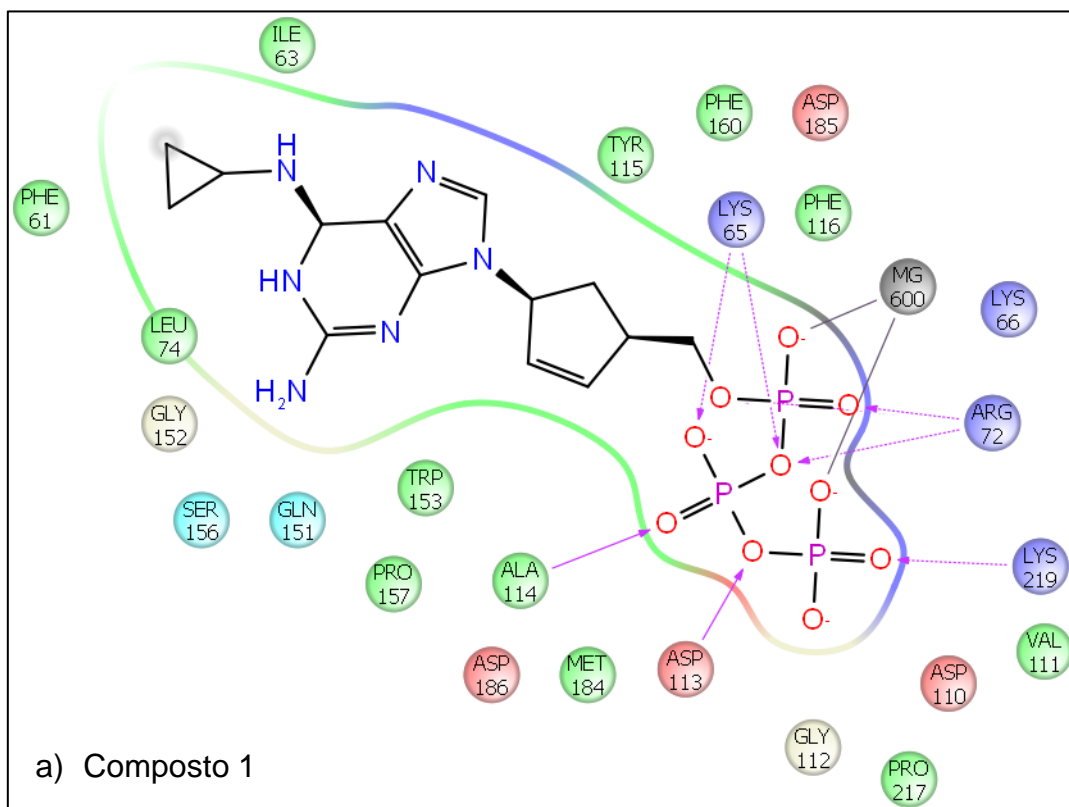


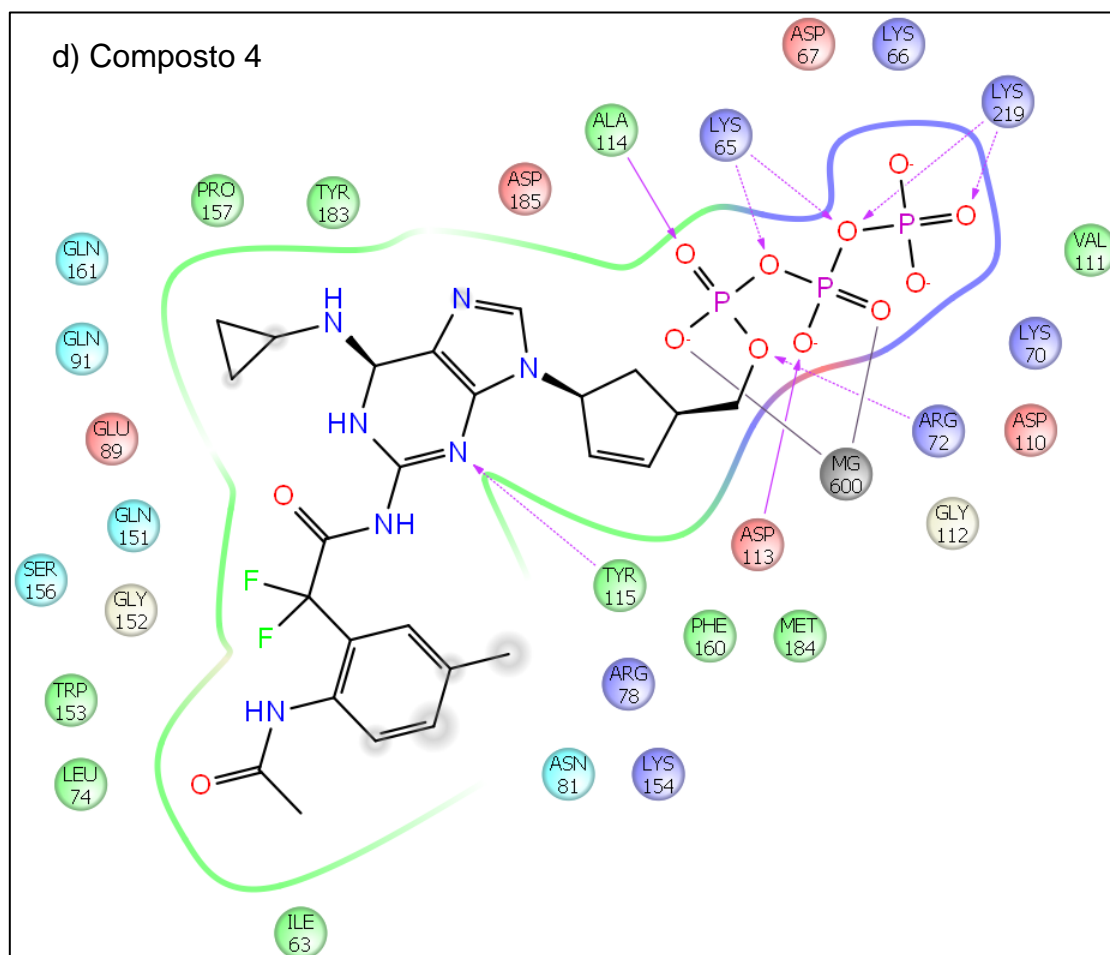
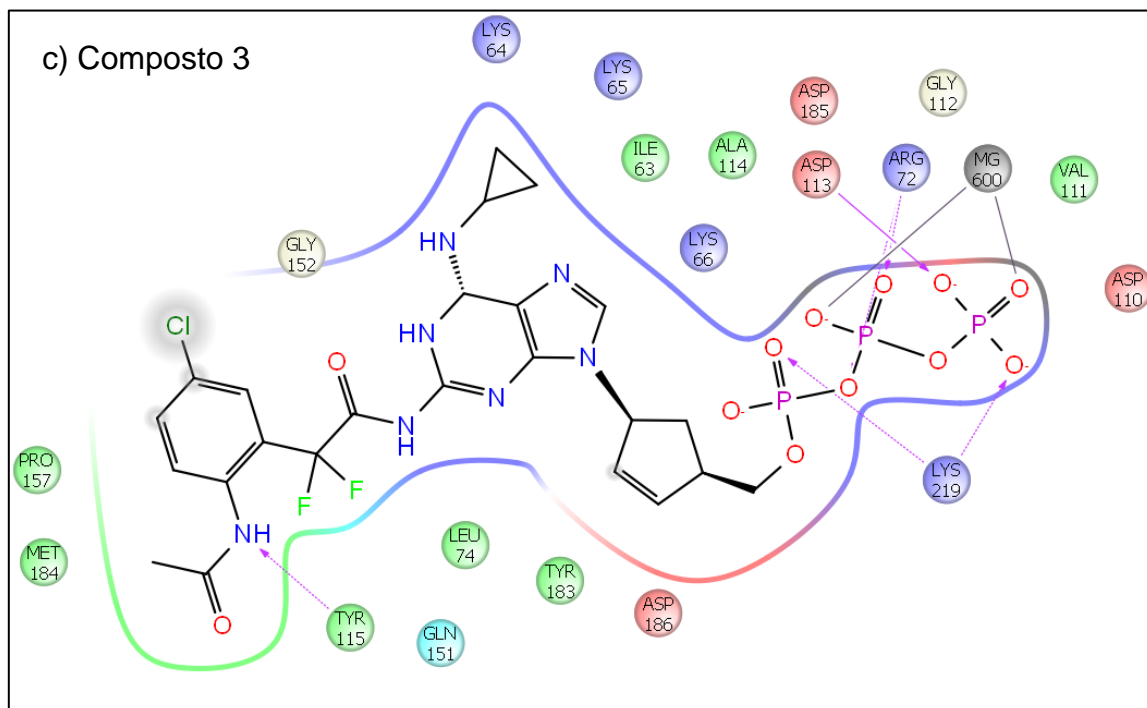
Legenda:

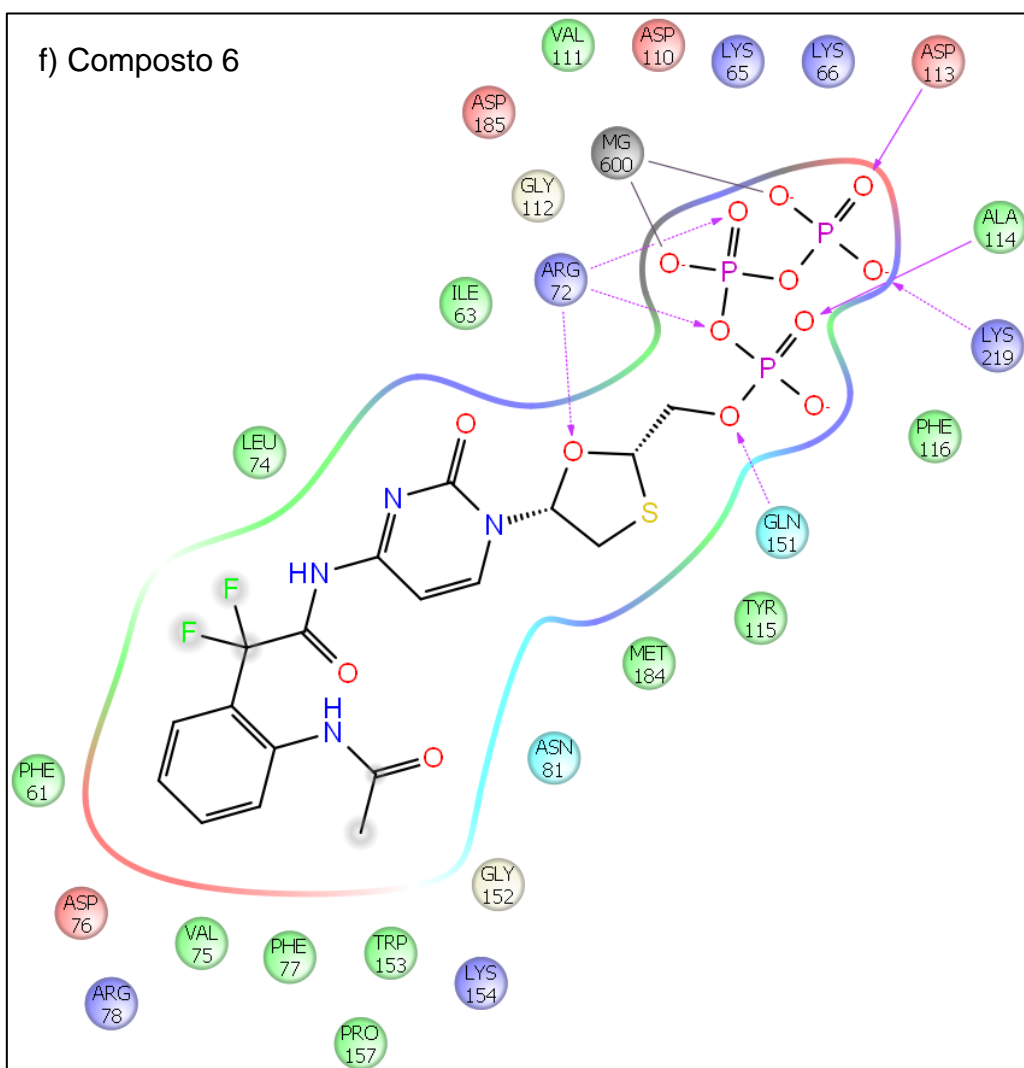
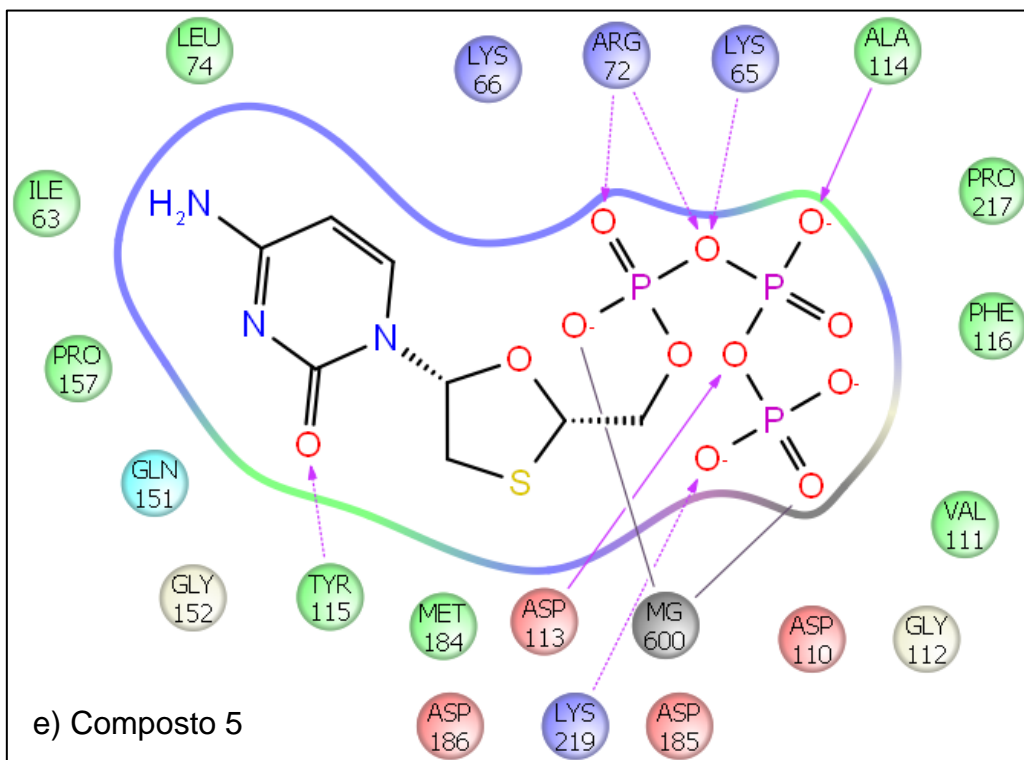
<span style="color: red;">●</span>	Carga negativa	<span style="color: grey;">●</span>	Metal	<span style="color: red;">→</span>	Cátion $\pi$
<span style="color: blue;">●</span>	Carga positiva	<span style="color: grey;">●</span>	Água	<span style="color: purple;">→</span>	Lig. H (cadeia principal)
<span style="color: cyan;">●</span>	Polar	<span style="color: orange;">●</span>	Sítio de hidratação	<span style="color: purple;">→</span>	Lig. H (cadeia lateral)
<span style="color: green;">●</span>	Hidrofóbico	<span style="color: orange;">⊗</span>	Sítio de hidratação deslocado	<span style="color: grey;">●</span>	Coordenação metal
<span style="color: yellow;">●</span>	Glicina	<span style="color: green;">—</span>	Interação $\pi$ - $\pi$	<span style="color: grey;">●</span>	Exposição solvente

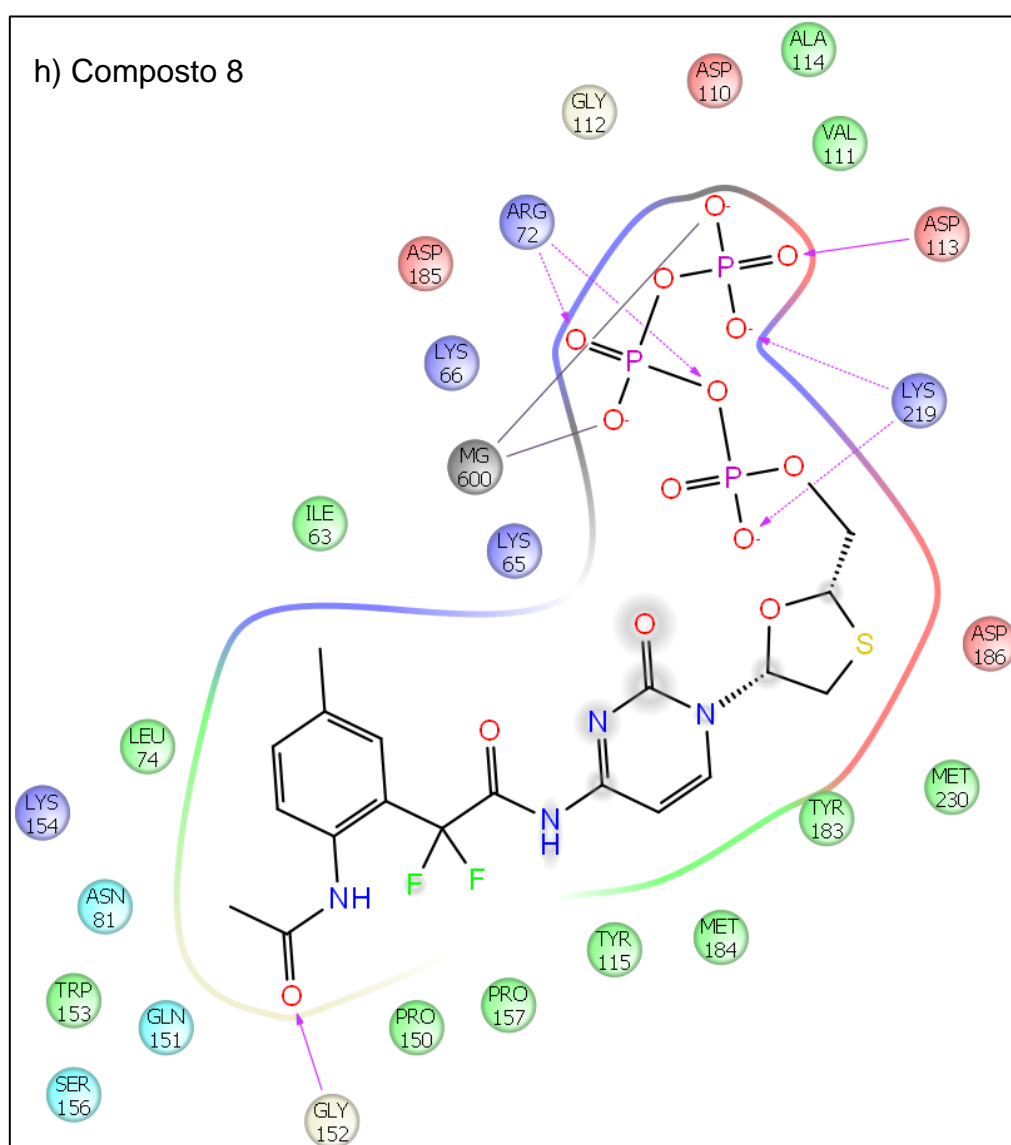
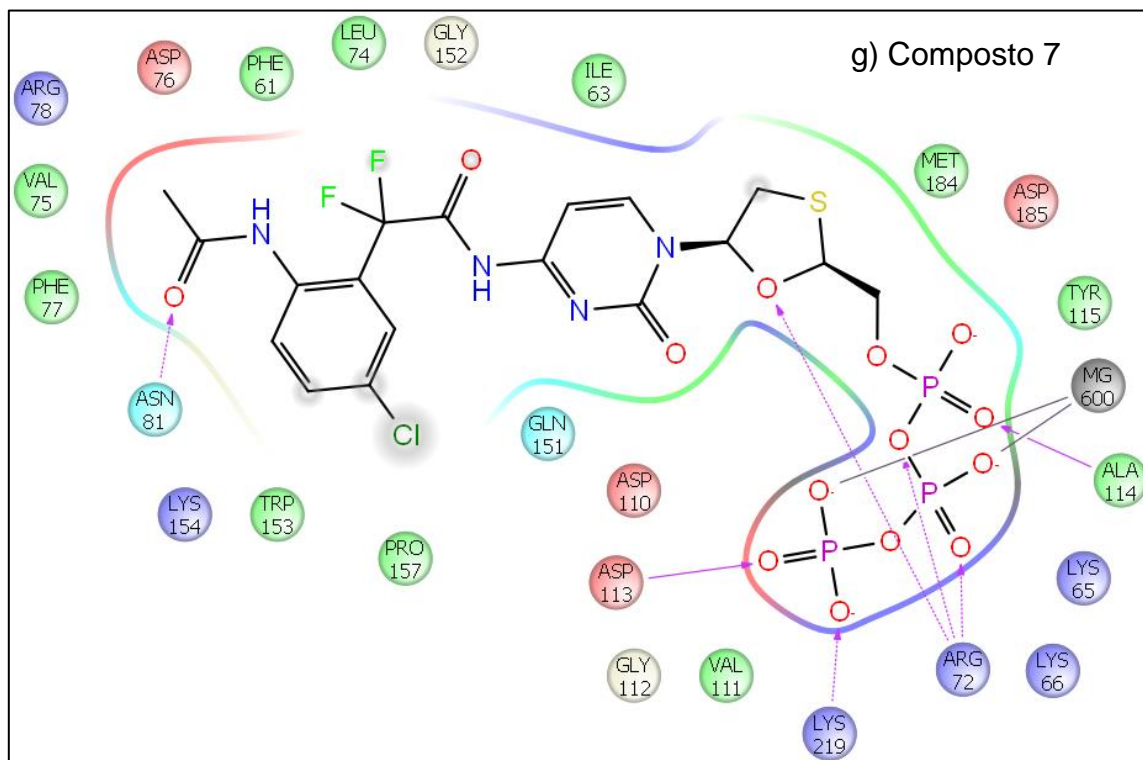
**Figura 5:** Mapas de interações dos compostos com um cut-off de 5 Å, (a) Composto 1, (b) Composto 2, (c) Composto 4, (d) Composto 5, (e) Composto 7, (g) Composto 8.

# ANEXO D – MAPAS DE INTERAÇÕES DOS COMPOSTOS REFERENTE AO TERCEIRO PROCEDIMENTO DE DOCKING

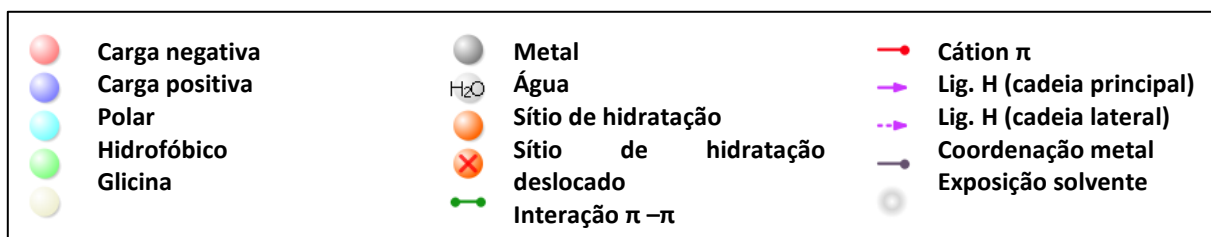








Legenda:



**Figura 6:** Mapas de interações dos compostos com um cut-off de 5 Å, (a) Composto 1, (b) Composto 2, (c) Composto 3, (d) Composto 4, (e) Composto 5, (f) Composto 6, (g) Composto 7, (h) Composto 8.