

INIBIDORES DA HIV-INTEGRASE: POTENCIAL ABORDAGEM FARMACOLÓGICA PARA TRATAMENTO DA AIDS

Eduardo Borges de Melo*

Curso de Farmácia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua Universitária, 2069, 85814-110 Cascavel - PR, Brasil

Aline Thaís Bruni

Departamento de Física, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000 São José do Rio Preto - SP, Brasil

Márcia Miguel Castro Ferreira

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13084-971 Campinas - SP, Brasil

Recebido em 22/2/05; aceito em 15/7/05; publicado na web em 6/3/06

HIV-INTEGRASE INHIBITORS: POTENTIAL PHARMACOLOGICAL APPROACH FOR AIDS THERAPY. AIDS has the HIV as its etiological agent. Researches has been done to find new pharmacological agents to be used in therapy, because of problems of resistance and side effects. The HIV-integrase inhibitors are some of those new agents that are being studied. This updating focusses on the fundamental information about HIV and HIV-integrase and the main methods being used to develop these new drugs, with examples for each case.

Keywords: AIDS; HIV; integrase.

INTRODUÇÃO

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é uma doença pandêmica que tem como agente etiológico o vírus da imunodeficiência humana (HIV), um retrovírus (vírus que contém RNA, sendo este material convertido em DNA no interior da célula do hospedeiro)¹.

No mundo inteiro, estima-se que 33,4 milhões de pessoas estão contaminadas com o vírus HIV. Na África subsaariana, a AIDS é a principal causa de mortes, sendo que a expectativa de vida nesses países caiu de 62 para 47 anos, segundo a UNAIDS^{2,3}.

No Brasil, de 1980 até dezembro de 2002, foram registrados 257.771 casos da doença, com 113.840 óbitos conhecidos. Através de inquéritos sorológicos realizados pelo Ministério da Saúde, estima-se a existência de 536.000 brasileiros infectados pelo HIV^{1,4}.

É relevante ressaltar três grandes fases na evolução desta epidemia: 1 – uma fase inicial, caracterizada pela infecção entre homens que fazem sexo com outros homens, e por um nível de escolaridade alto dos pacientes; 2 – uma segunda fase, caracterizada pelo incremento de casos devido à transmissão por uso de drogas injetáveis, como a consequente diminuição do grupo etário e maior disseminação entre indivíduos heterossexuais; 3 – terceira e atual fase, quando se acentua a tendência de disseminação entre os heterossexuais, principalmente as mulheres⁵.

Esta última observação merece destaque, já que tem sido relatada em vários países uma “feminização” da epidemia de AIDS. Quanto à distribuição dos casos segundo faixa etária, observou-se na última década um “envelhecimento” da mesma, com aumento persistente de importância das faixas etárias acima de 35 anos, em ambos os sexos. Destacaram-se as faixas entre 35 a 39 e 40 a 49 anos, com aumento da incidência entre as mulheres (6,5 homens para 1 mulher, em média, na década de 80, para 1,7 homens para 1 mulher em 2001)⁴.

Com relação à letalidade, observa-se uma queda entre homens e mulheres, maiores ou menores de 13 anos, em meados da década de 90, principalmente entre 1996 e 1997, período que coincide com a garantia de acesso ao tratamento anti-retroviral de alta eficácia (HAART), conhecido como coquetel de drogas⁴.

No Brasil, a Lei 9113/96 garantiu a todos os indivíduos o acesso, livre de custos, ao coquetel de drogas⁶. Introduzido em 1996, este é uma combinação de fármacos capazes de inibir duas etapas da replicação viral, podendo diminuir em até 100 vezes o ritmo de produção do vírus em comparação com as monoterapias utilizadas até então⁷. Dependendo do estado e da idade do paciente⁸, este pode ser composto por dois ou mais medicamentos diferentes das seguintes classes: (i) inibidores de transcriptase reversa nucleosídico-nucleotídico (ITRN) (Figura 1); (ii) inibidores da transcriptase reversa não-nucleosídico (ITRNN) (Figura 2); (iii) inibidores de protease (IP) (Figura 3) e, mais recentemente, (iv) os inibidores da fusão (IP)^{7,8}, sendo que este último foi recentemente liberado para venda no Brasil.

Mesmo com o surgimento desta terapia, que diminui as partículas virais a níveis indetectáveis, o vírus persiste em reservatórios

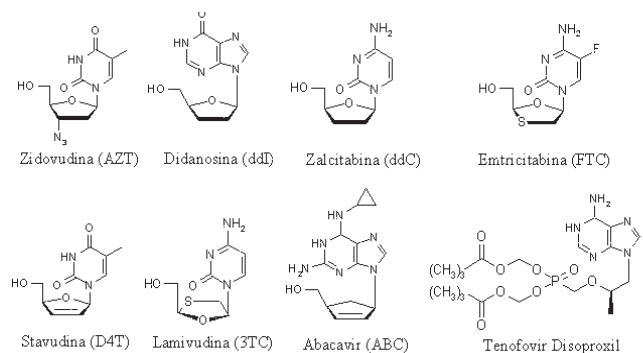


Figura 1. Inibidores da transcriptase reversa nucleosídico-nucleotídico (ITRN). Adaptado da ref. 7

*e-mail: ebmelo@unioeste.br

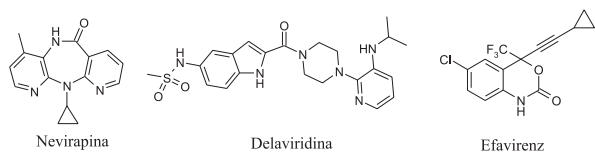


Figura 2. Inibidores da transcriptase reversa não-nucleosídeo (ITRNN). Adaptado da ref. 7

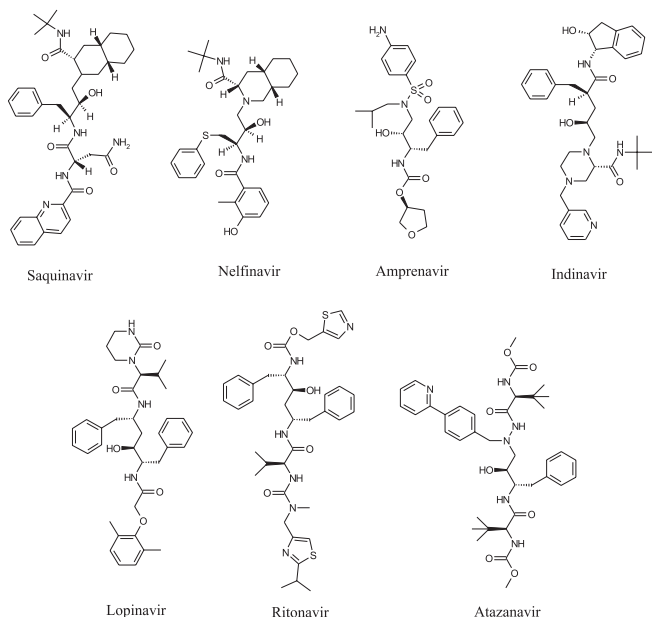


Figura 3. Inibidores da protease (IP). Adaptado da ref. 7

no organismo, como linfócitos T adormecidos. O surgimento e a velocidade de aparecimento de cepas resistentes a diferentes combinações de fármacos disponíveis no mercado também é um fator limitante^{1,7,9}.

Porém, um dos fatores que torna ainda mais difícil a terapia anti-HIV é a alta incidência de efeitos colaterais causados pelos fármacos atualmente disponíveis. Estudos realizados por Ligani Jr. e colaboradores¹⁰ mostraram ser esta a principal causa de falhas na aderência à terapia anti-retroviral (20,5%), caracterizando-se principalmente por vômitos, diarreias, náuseas e dores abdominais, além de dores de cabeça e, até mesmo, alterações da coloração da pele.

Tudo isto fomenta uma grande necessidade de descoberta e/ou desenvolvimento de novos e eficientes fármacos que atuem sobre a transcriptase reversa (TR), sobre a protease (PR) e em outros pontos do ciclo de replicação viral^{1,7,9}. Todas as etapas de replicação viral anteriormente mencionadas são importantes para o desenvolvimento de fármacos anti-HIV. No entanto, o grande desafio é descobrir possíveis alvos que efetivamente interrompam o ciclo do vírus, sem causar dano à célula normal⁵.

Morfologia do vírus HIV

As estruturas morfológicas dos vírus HIV tipo 1 e 2 incluem proteínas estruturais e funcionais e um genoma de RNA protegidos pelo envelope viral. O envelope é constituído por uma bicamada lipídica e contém uma proteína complexa, conhecida como *env*. Esta proteína é constituída pelas glicoproteínas gp41, transmembrana e gp120, exposta à camada externa do envelope¹¹.

Na face interior o HIV possui a proteína viral denominada p17

(matriz) e, envolvido por esta proteína, está o capsídeo composto pela p24. Na parte mais interna encontram-se os elementos mais importantes: dois filamentos simples de RNA, a proteína p7 (nucleocapsídeo) e três enzimas essenciais, p51 (transcriptase reversa), p11 (protease) e p31 (integrase)^{1,12} (Figura 4).

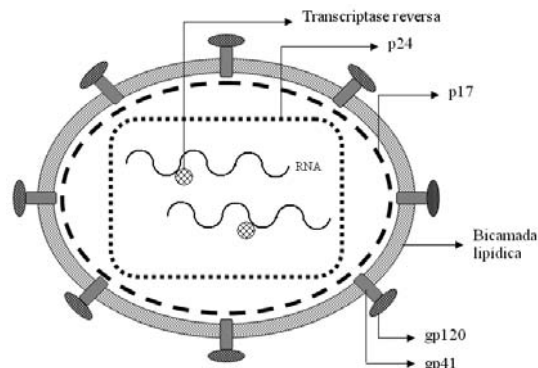


Figura 4. Estrutura do HIV. Adaptado da ref. 4

Cerca de 11 genes codificam a síntese de proteínas estruturais e reguladoras (Figura 5):

- Gene *env* codifica a síntese das proteínas do envelope do vírus, ou seja, gp160, que se cinde posteriormente gerando gp120 e gp41.
- Gene *gag*, gene do antígeno do grupo, que codifica a síntese das proteínas da região central do vírus, ou seja, p55, que posteriormente se cinde em p24 e p17.
- Gene *pol*, que codifica enzimas que atuam na replicação viral, ou seja, p11, p32 e p51.
- Gene *tat*, responsável pela transativação de sinais recebidos pela célula infectada e passados ao genoma viral.
- Gene *rev*, responsável pela regulação da síntese de proteínas virais, isto é, regula a proporção de produção de proteínas reguladoras em relação às estruturais.
- Gene *nef*, regula negativamente a síntese de proteínas virais.
- Gene *vif*, conhecido como fator de virulência, sua presença parece estar associada à maior infectividade viral.
- Segmento RTL, ou “Repetição Terminal Longa”, onde se situam várias proteínas reguladoras do ciclo biológico viral⁵.
- Gene *vpu*¹³, que codifica proteína de mesmo nome, e que tem como função degradar novos receptores CD4, que são formados pela célula infectada, e diminui a formação de proteínas de superfície celular da classe MHC I, que estão envolvidos no reconhecimento das células infectadas por linfócitos T citotóxicos¹.
- Genes *vpx* e *vpr*, cujas funções ainda não estão estabelecidas¹³.

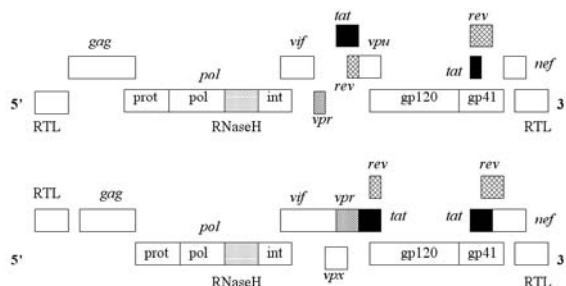


Figura 5. Organização genética dos vírus HIV-1 e HIV-2. Adaptado da ref. 4

O ciclo replicativo do HIV (Figura 6) ocorre no interior do linfócito T e é constituído de várias etapas, cada uma um alvo potencial para desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra a AIDS^{1,13}. Uma revisão dos processos que ocorrem durante este ciclo pode ser encontrada na referência 1.

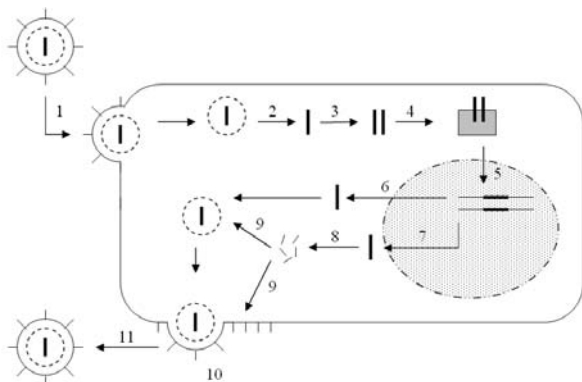


Figura 6. Ciclo replicativo do HIV. Adaptado das refs. 4 e 7. 1: adsorção/fusão; 2: desencapamento; 3: transcrição reversa; 4: formação do complexo DNA viral/integrase; 5: integração; 6: síntese do RNA viral genômico; 7: síntese do RNAm viral; 8: tradução das proteínas virais; 9: montagem; 10: brotamento; 11: maturação

Um dos possíveis novos alvos terapêuticos que têm sido estudados é a enzima HIV-integrase (IN), uma das três enzimas virais necessárias para replicação do vírus HIV (Etapa 4, Figura 3)¹⁴⁻¹⁶, e que recebeu pouca atenção até o momento, em comparação com a TR e PR¹⁷. Este trabalho busca apresentar esta potencial abordagem farmacológica para o tratamento da AIDS e os métodos que estão sendo utilizados para desenvolvimento desta classe de fármacos, com destaque para planejamentos de fármacos auxiliados por computador.

A HIV-INTEGRASE

A enzima de 32 KDa HIV-IN é codificada pela terminação 3' do gene viral *pol*, assim como a TR e PR, e é a única responsável por inserir o DNA próviral no cromossomo-alvo do hospedeiro, sendo essencial para a replicação viral^{18,19}. Este processo é mediado pela IN tanto *in vitro* como *in vivo*¹⁹.

Uma das vantagens da HIV-IN é que não apresenta qualquer homólogo celular, o que auxiliaria no desenvolvimento de drogas com menor índice de efeitos colaterais²⁰. Além disso, a IN utiliza um único sítio ativo para acomodar duas diferentes configurações dos substratos de DNA (DNA hospedeiro e DNA próviral). Isto pode restringir a habilidade para desenvolvimento de resistência¹², já que estas enzimas são altamente conservadas nos retrovírus¹⁴.

A HIV-1 IN é composta de uma cadeia polipeptídica simples que se dobra em três domínios funcionais e pertence à superfamília das polinucleotidil transferases²¹. O domínio principal da HIV-1 IN (resíduos 50-212) contém os sítios endonuclease e polinucleotidil transferase, com três resíduos ácidos, D64 e D116 (aspartato), junto com E152 (glutamato), sendo estes altamente conservados nesta família. Comumente designados como "DDE"¹⁴, estes resíduos ligam-se a dois íons Mg^{+2} que são essenciais para a clivagem/formação da ligação fosfodiéster^{15,22}.

Os resíduos 213 a 288 formam o domínio de ligação C-terminal do DNA, que aparenta ter função de ligar e orientar o DNA próviral durante o processo de integração¹⁵. A incorporação do DNA

próviral ao genoma do hospedeiro é um processo com vários passos e é essencial para a infecção.

Inicialmente, a integrase forma um complexo estável com regiões de repetição terminal longa (RTL) de seqüências específicas do DNA proviral dupla-hélice, previamente sintetizado pela TR. Em seguida, ocorre o processamento endonucleolítico da terminação 3' (reação de *processamento 3' - P3'* - ou passo da clivagem) de ambas as fitas. Neste passo, a seqüência dinucleotídica terminal GT na seqüência 5'-ACTG---CAGT-3' é clivada, formando duas terminações ---CA-3'-OH. Origina-se, então, um DNA dupla-fita onde ambas as terminações 5' (---CA-5') encontram-se desemparelhadas^{15,17,19}.

O complexo de pré-integração (CPI), formado pelo DNA próviral 3' processado e pela HIV-IN, é transportado através da membrana nuclear. A integração com o DNA hospedeiro (reação de *transferência de fita - TF*) também é realizada pela IN, onde esta exerce sua função catalítica final, cortando o DNA hospedeiro e ligando covalentemente a terminação ---CA-3'-OH do DNA proviral à terminação fosfato-5' formada, dando origem a um produto de reação aberto. Em seguida ocorre uma reação de ligação da terminação ---CA-5', com remoção de dois nucleotídeos desemparelhados da terminação 5' do DNA próviral e reparação dos espaços entre as seqüências virais e do hospedeiro^{15,17,19}. Acredita-se que a integrase se dissocia por si mesma do DNA e que o reparo da falha entre a terminação 5' do DNA próviral e a terminação 3' do DNA hospedeiro ocorre pela ação de nucleotídeo polimerases endógenas do hospedeiro formando, assim, o próviro maduro^{15,22}. Todo o processo é resumido graficamente da Figura 7.

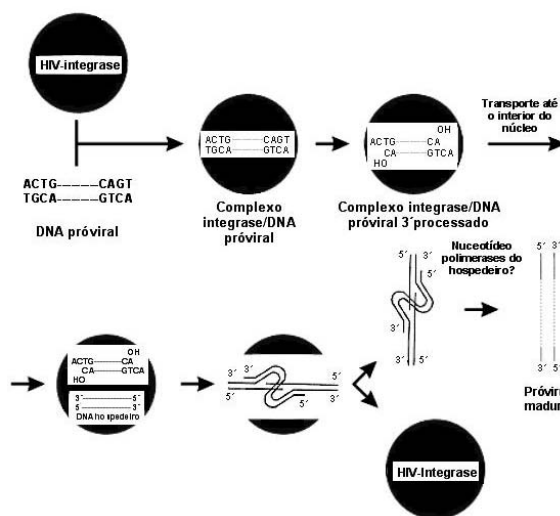


Figura 7. Resumo gráfico do processo de integração do DNA próviral ao DNA hospedeiro. Baseado nos esquemas das refs. 15, 19 e 22

Ambas as fases 3P' e TF representam reações de transesterificação^{17,19}.

Apesar de diversos laboratórios e grupos de pesquisa estarem trabalhando no desenvolvimento de inibidores da HIV-IN, ainda não surgiu nenhum composto que possa efetivamente ser utilizado na terapêutica¹⁴. A falta de informações detalhadas sobre a interação da IN com seus substratos tem dificultado a busca por inibidores potentes e seletivos. Além disso, até 1999 não havia sido realizada nenhuma determinação cristalográfica de um agente inibidor complexoado ao sítio-ativo desta enzima, o que foi resolvido por Goldur e colaboradores⁹ que realizaram uma determinação cristalográfica desta enzima ligada ao inibidor 5CITEP (1) (Figura 8),

sendo este hoje considerado um composto-protótipo para a pesquisa de novos potenciais agentes desta classe.

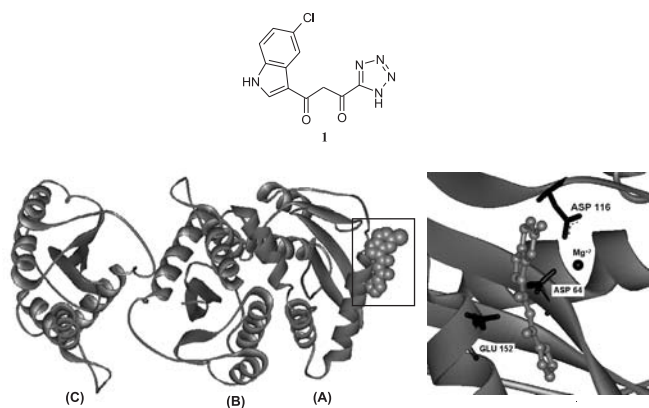


Figura 8. Estrutura do complexo cristalográfico 5CITEP (1) e HIV-IN. Este complexo apresenta três subunidades idênticas, A, B e C. A região expandida apresenta o sítio onde 1 se complexou (face da subunidade A). Três resíduos de aminoácidos e o átomo de magnésio, os elementos essenciais para a atividade catalítica da enzima, são apresentados. Adaptado das refs. 9 e 23

A falta de um equivalente celular, assim como é uma vantagem no que se refere a menores chances de ocorrência de efeitos colaterais, também pode ser considerada uma desvantagem, já que não existe um mediador endógeno cuja estrutura química possa ser utilizada como protótipo, de forma semelhante ao que foi realizado com a cimetidina, desenvolvida a partir da histamina²⁴ (Figura 9). As poucas pesquisas realizadas com retrovírus em anos anteriores¹⁴ também contribuíram para que ainda não estejam disponíveis fármacos inibidores da HIV-IN. Assim, esforços no desenvolvimento destes agentes terapêuticos têm se baseado nos métodos apresentados a seguir.

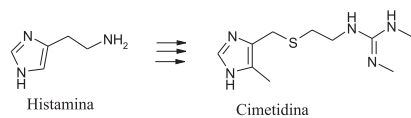


Figura 9. Estruturas da histamina (protótipo) e cimetidina (derivado). Baseado em esquemas da ref. 24

Busca por compostos naturais bioativos

Compostos de origem natural podem ser utilizados como agentes terapêuticos para uma grande gama de doenças. Estes também podem tornar-se excelentes compostos-protótipos para desenvolvimento de derivados mais potentes ou com melhoria de alguma propriedade biológica ou físico-química que permita que sejam utilizados como fármacos.

O grupamento catecol é um grupo químico comumente encontrado em inibidores da IN, tanto naqueles de origem natural quanto os de origem sintética. A curcumina (2), um bis-catecol, é isolada de rizomas de *Curcuma longa* e é utilizada como tempero e corante alimentar (curry)²⁵, além de ser um potencial agente contraceptivo local²⁶, pois inibe a mobilidade dos espermatozoides. Este composto, e derivados, como os apresentados na Figura 10, têm sido estudados como potenciais agentes inibidores da HIV-IN²⁷. O próprio composto 2 apresenta fraca atividade inibidora do processo TF ($IC_{50} = 140 \mu\text{M}$). Porém, outros produtos naturais diretamente relacionados, e sem os grupamentos metoxila de 3 e 4, apresentam

aumento da atividade. Quando estas metoxilas são substituídas por grupamentos hidroxila, fornecendo via síntese o derivado 5, a atividade atinge o máximo²⁸. Por outro lado, a redução dos grupamentos vinílicos gerando o composto 6, praticamente elimina a atividade. O ácido rosmarínico (7), estruturalmente semelhante, isolado de diversas plantas, como da *Perilla frutescens*, *Rosmarinus officinalis* e *Melissa officinalis*²⁹, também apresenta alto grau de inibição da fase TF²⁸.

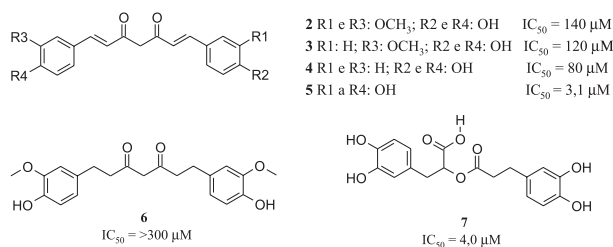


Figura 10. Compostos 2 a 7. Adaptado das refs. 27 e 28

Os compostos da classe dos ácidos dicafeoilquínicos 8 a 10 inibem a HIV-IN em concentrações submicromoleculares²⁴, sendo esta inibição irreversível³⁰. Estes compostos, isolados de plantas medicinais encontradas na Bolívia³¹, e seu derivado sintético, o ácido L-chicórico (11), são potentes inibidores *in vitro* da IN. Estudos realizados de quimioterapia combinada entre o ácido L-chicórico (11), o ITRN AZT e o IP AG1350 mostraram melhora substancial na atividade anti-HIV *in vitro*, mostrando que a inclusão de inibidores da integrase no coquetel de drogas pode melhorar a terapêutica atualmente disponível para AIDS³². Estes compostos (Figura 11) apresentam inibição da HIV-IN que varia de 0,06 a 0,66 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ²⁵.

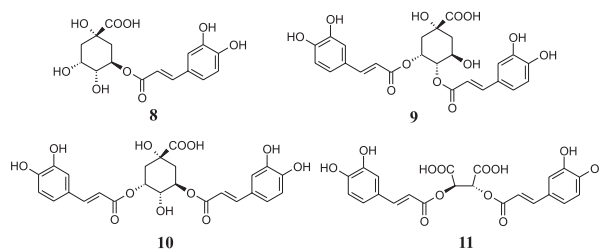


Figura 11. Compostos 8 a 11. Adaptado da ref. 25

Compostos de origem natural podem ser muito úteis como protótipos para novos inibidores. Por ex., Mazumder e colaboradores³³ demonstraram que oligonucleotídeos de origem natural também são capazes de interferir com o processo de integração, por competição com o DNA viral pela ligação com a IN. Entretanto, estudos mostraram que estes compostos são rapidamente clivados por nucleases celulares. Alterações na ligação fosfato internucleotídico e na posição da ligação da base nitrogenada no anel ribose, como as realizadas nos compostos 12 a 15 (Figura 12), resultam em alteração da atividade, com possível aumento da resistência a nucleases, aumento da atividade inibitória da IN³³⁻³⁶ e seleção pelo processo de transferência de fita, a exemplo do que ocorre com diversos compostos com grupamento dicetona³⁴.

Metabólitos secundários de fungos com atividade inibidora da HIV-IN têm sido freqüentemente descritos. Recentemente, Sigh e colaboradores descreveram vários compostos bicíclicos inibidores, como a integrasona (16), o ácido intégrico (17) e o ácido cispórico (18), que inibiram o processo TF *in vitro* (Figura 13)³⁷⁻⁴⁰.

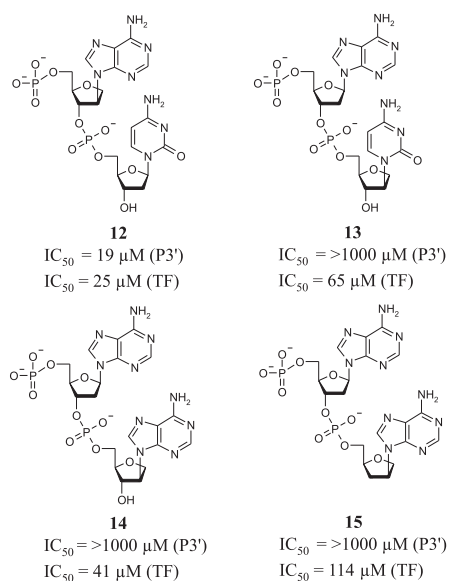


Figura 12. Compostos 12 a 13. Adaptado da ref. 33

Já a equisetina (**19**) foi encontrada durante uma busca (“screening”) por produtos naturais marinhos com atividade anti-HIV⁴¹. Isolada do fungo marinho *Fusarium heterosporum*, este composto pode inibir tanto a fase P3’ quanto o processo de transferência de fita com IC₅₀ de aproximadamente 10 μM em ambas as etapas.

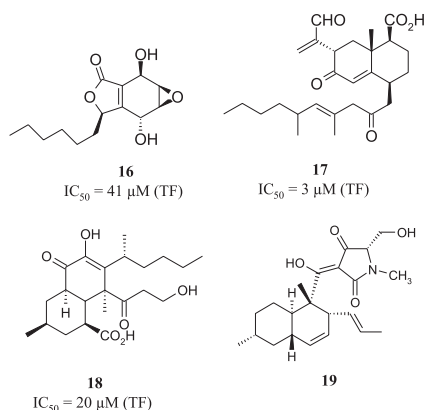


Figura 13. Compostos 16 a 19. Adaptado das refs. 37 a 40

Pesquisa baseada na hipótese farmacofórica

O grupo farmacofórico de uma molécula refere-se ao arranjo tridimensional de átomos ou grupos funcionais necessários para a ligação de um composto em uma enzima ou receptor específico. A busca farmacofórica em bancos de dados 3D tem como objetivo identificar moléculas que possuam em sua estrutura um grupo tridimensional em particular⁴². Estas pesquisas em bancos, como o NCI 3D (banco de dados de estruturas tridimensionais do Instituto Nacional do Câncer, dos EUA)⁴³, são implementadas por programas de modelagem molecular que realizam comparações entre as estruturas tridimensionais dos compostos neles depositados⁴⁴.

Neamati e colaboradores em uma série de trabalhos^{42,45,46} procuraram identificar um grupamento farmacofórico em comum em algumas classes de compostos com atividade inibidora da HIV-IN. Foi possível identificar um grupo presente em 4-hidroxycumarinas que apresentavam atividade inibitória das fases P3’ e TF. Este

grupamento, formado por dois grupos carbonílicos e duas hidroxilas, não está presente na 4-hidroxycumarina isolada, mas apenas no dímero ou no tetrâmero desta classe (Figura 14)⁴².

A partir desta informação, foram propostos dois possíveis grupos farmacofóricos, formados por dois triângulos iguais com lados de 4,76, 2,87 e 5,62 Å (Figura 14).

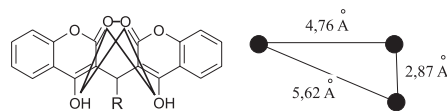


Figura 14. Proposta farmacofórica sugerida. Adaptado da ref. 42

Esta proposta farmacofórica foi utilizada para busca em uma base de 206.876 compostos, sendo que 304 possuíam o grupamento em uma ou mais conformações. Destes, 29 foram ensaiados. Todos mostraram algum grau de inibição, sendo os quatro mais ativos mostrados abaixo (compostos **20** a **23**, Figura 15)⁴². Outros exemplos podem ser obtidos nas referências 45 e 46.

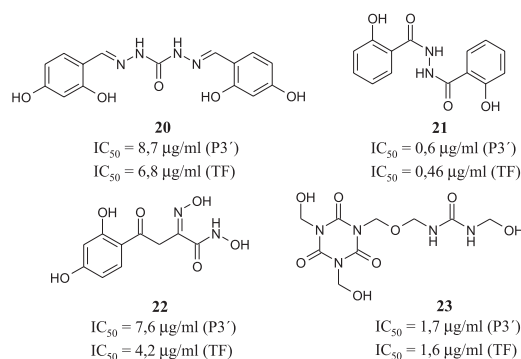


Figura 15. Compostos 20 a 23. Adaptado da ref. 42

Planejamento de fármacos auxiliado por computador

O planejamento de fármacos auxiliado por computador envolve todas as técnicas computacionais utilizadas para descobrir, planejar e otimizar compostos biologicamente ativos com uso suposto de fármacos⁴⁷. Estes procedimentos envolvem o uso de modelagem molecular, pesquisa em bancos de dados (englobando a hipótese farmacofórica), técnicas de QSAR-2D e 3D, “docking” e planejamento *de novo*. Estas e outras técnicas computacionais têm sido utilizadas por diversos grupos para pesquisar os vários aspectos necessários para desenvolvimento de inibidores da HIV-IN.

Após a cristalização do complexo IN/SCITEP⁹ (Figura 8) e o depósito da estrutura deste no “Protein Data Bank” (PDB)⁴⁸, um dos bancos de dados de estruturas cristalográficas mais importantes da atualidade, ocorreu um salto na pesquisa de potenciais inibidores auxiliado por computador. A informação forneceu um protótipo que pode ser utilizado como ponto de partida para este tipo de estudo. O S-1360 (**24**) (Figura 16), um análogo de **1**, é o primeiro fármaco inibidor da IN atualmente em testes clínicos de fase II^{20,49}.

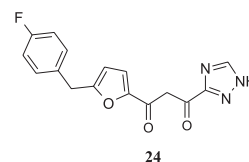


Figura 16. S-1360, primeiro inibidor da HIV-integrase a entrar em testes clínicos. Adaptado da ref. 20

Técnicas de “docking”³⁹ (uma tradução aproximada seria *ancoramento*) foram utilizadas por Dayam e Neamati²⁰ para identificar a conformação ativa de **24**, assim como sua possível orientação dentro do sítio ativo. Para isto utilizou-se a estrutura da integrase cristalizada com o 5CITEP (**1**) disponível no PDB²³.

Estudos de “docking” consistem na utilização de técnicas computacionais para exploração dos possíveis modos de interação de um substrato a um dado receptor, a uma enzima ou a outro sítio de ligação⁴⁷. Este método tem sido amplamente utilizado para auxiliar na compreensão das interações moleculares entre a IN e seus inibidores. Alguns estudos mostraram que existe uma correlação linear entre os valores de IC₅₀ e a energia livre de ligação dos complexos inibidores/enzima obtidos¹⁶.

Esta técnica permitiu a proposição de inibidores da HIV-IN utilizando a técnica de replicação molecular⁵⁰. Recentemente, Schames⁵¹, Long⁵² e seus respectivos colaboradores utilizaram estes métodos para planejar novos inibidores dímeros da classe das β-dicetonas. Estudos realizados por Sotriffer e colaboradores⁵³ indicam que o sítio ativo formado pela tríade catalítica Asp64, Asp116 e Glu152 (Figura 8) pode não ser o único essencial para a atividade catalítica desta enzima.

Long e colaboradores⁵² identificaram uma “trincheira”, localizada no laço desordenado, formada pela seqüência de aminoácidos Ile141 – Asn144, como um potencial novo sítio de ligação. Assim sendo, propuseram β-dicetonas “borboletas”, como **25** e **26** (Figura 17), que apresentam capacidade potencial de interagir com estes dois sítios ao mesmo tempo. Já Schames e colaboradores⁵¹ utilizaram técnicas de “docking” para explorar resultados de estudos bioquímicos e estruturais^{54,55} que sugeriram que um multímero (provavelmente um tetrâmero) da HIV-IN seja necessário para uma completa reação de integração. Neste modelo, os sítios catalíticos de duas das quatro subunidades encontrar-se-iam próximos durante o processo de integração⁵⁵. Baseando-se nestas informações, foram propostos compostos dímeros de β-dicetonas, como **27** e **28** (Figura 17), que podem realizar ligações de coordenação simultâneas com os átomos de magnésio (Mg⁺²) localizados nestes dois sítios⁵¹.

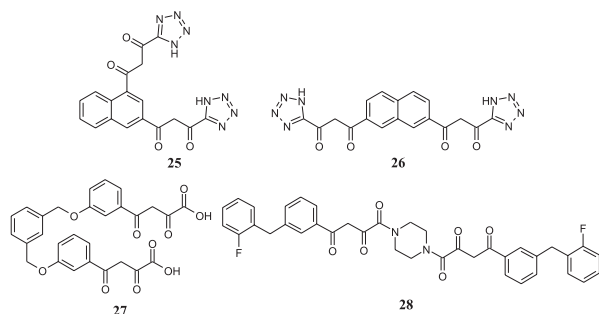


Figura 17. Compostos **25** a **28**. Adaptado das refs. 51 e 52

Já o grupo de Costi⁵⁶ sintetizou os compostos **29** e **30** (Figura 18) e utilizou “docking” para realizar um refinamento destes no sítio ativo do complexo obtido por Goldgur e colaboradores⁹, visando encontrar alinhamentos ligante-receptor que pudessem ser utilizados como base para estudos de QSAR-3D e, para definir um padrão de busca farmacofórica. Os bons alinhamentos obtidos entre estes compostos e o 5CITEP (**1**) forneceram boas chances de que estes apresentassem atividade em ensaios *in vitro*, o que acabou sendo observado⁵⁶.

No intuito de determinar quais descritores químicos são importantes para planejamento de novos agentes inibidores²⁰, dife-

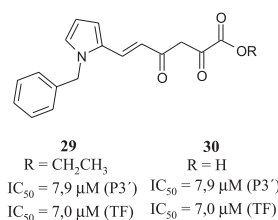


Figura 18. Compostos **29** e **30**. Adaptado da ref. 56

rentes estudos de relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR)⁵⁷⁻⁶⁰ têm sido realizados com diversas classes de compostos. Estes objetivam a definição de equações matemáticas simples ou multiparamétricas, envolvendo correlações entre atividade biológica e descritores estruturais eletrônicos, hidrofóbicos e estéricos. A definição destas equações, a partir do conjunto de dados, é normalmente obtida com o auxílio de programas de computador⁶¹, como o Billin Program⁶¹, o Build QSAR⁶² ou o Pirouette⁶³.

A técnica de QSAR-3D denominada Estudos de Análise Comparativa de Campos de Força (CoMFA) baseia-se na premissa de que a interação ligante-receptor relaciona-se com forças estéricas e eletrostáticas⁵⁸. A estrutura tridimensional de mínima energia de uma molécula é colocada dentro de uma área cúbica, onde “sondas” estudarão as propriedades eletrostáticas e estéricas do composto. Outras propriedades, tais como hidrofobia e ligação de hidrogênio, também podem ser incorporadas na análise⁴⁷. Em seguida, utilizando a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), um método de regressão estatística muito utilizado em estudos de QSAR por quimiometria⁶⁴, um modelo é construído. Modelos de QSAR-3D com R² acima de 0,8 são considerados de boa capacidade preditiva⁵⁸. Este é um processo muito útil, principalmente quando a estrutura tridimensional do receptor não é conhecida.

Ma e colaboradores⁶⁵ utilizaram técnicas de CoMFA e “docking” para estudar diversos inibidores para a fase P3' da classe das stirilquinolinas, entre eles o composto **31** (Figura 19). Os melhores resultados foram encontrados quando o modelo foi construído com uma combinação de campos estérico, eletrônico e de potencial de formação de ligação de hidrogênio. O modelo gerado forneceu um R² de 0,754, com favorecimento da atividade por grupos volumosos próximos ao grupo carboxila do átomo 7 do anel quinolina e aos grupos hidroxila ligados aos átomos 3' e 4' do anel fenila; restrição estérica próxima à posição 8; cargas positivas próximas à região do hidrogênio em C7, do nitrogênio do anel quinolina e de C3' do anel fenila; cargas negativas próximas ao oxigênio carbonílico em C7 e, grupos aceptores de ligação de hidrogênio nas regiões C7, C3' e C4'.

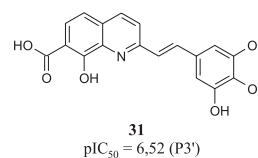


Figura 19. Composto **31**. Adaptado da ref. 65

Estudos de “docking” associados mostraram que a proximidade dos oxigênios da carbonila carboxílica em posição C7 e a hidroxila em posição C8 podem coordenar com o íon de Mg⁺² do sítio catalítico da enzima. Adicionalmente, um grupo aceptor de ligação de hidrogênio em C3' pode formar ligações com resíduos na IN que auxilia a aumentar a atividade biológica das stirilquinolinas⁶⁵.

QSAR-3D também foi utilizado por Raghavan e colaboradores

para um grupo de 15 flavonas que inibem as fases P3' e TF *in vitro*⁵⁸. Os compostos mais ativos, **32** e **33**, estão representados na Figura 20. Este estudo demonstrou que a atividade desta classe de compostos está relacionada 79% com fatores eletrostáticos e 21% com fatores estéricos. O modelo sugere que grupos volumosos favorecem a atividade quando presentes na região de C6 e desfavorecem quando se encontram nas regiões de C7 e C3. Cargas positivas nas regiões de C3' e C4' e negativas nas de C6 e C5' podem favorecer o aumento da atividade. O R^2 obtido através da validação cruzada foi de 0,81.

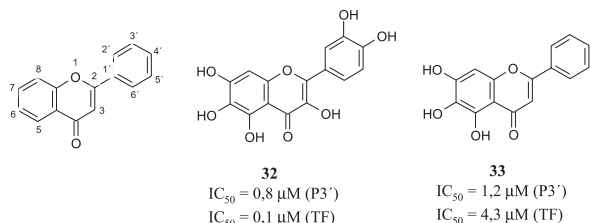


Figura 20. Estrutura básica das flavonas estudadas. Compostos **32** (quercetagina) e **33** (baicaleina) são os mais ativos do grupo em ambos os processos. Adaptado da ref. 58

Makhija e Kulkarni⁵⁹ estudaram um grande grupo composto por 81 substâncias divididas utilizando Aproximação por Função Genética (GFA)⁶⁶. Este grupo foi dividido em catecóis, englobando vários derivados dos ácidos dicafeoilquínicos, da curcumina (**2**) e do ácido chicórico (**11**), e não-catecóis, sendo suas estruturas básicas apresentadas na Figura 21. Todos os compostos apresentaram atividade em ambos os processos.

O método GFA gera diferentes modelos (equações) de QSAR a partir de vários descritores calculados por modelagem molecular. Esta população de modelos fornece uma melhor relação atividade biológica/propriedades físico-químicas que apenas uma equação de correlação⁶⁶. Estas são em seguida escolhidas aleatoriamente e cruzamentos (“crossovers”) são realizados, gerando “equações-filhas”. Se, de acordo com a validação pela medida LOF (“lack-of-fit”), estas possuem um melhor poder preditivo que suas progenitoras, então elas serão preservadas⁵⁹.

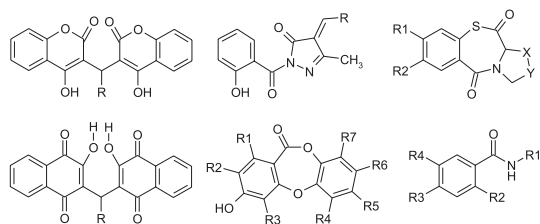


Figura 21. Estruturas básicas dos não-catecóis estudados por Makhija e Kulkarni. Adaptado da ref. 59

O estudo utilizou 32 descritores diferentes, sendo seis descritores MSA⁶⁷ (gerados pelo método de Análise Molecular de Forma), oito estéricos, nove eletrônicos, quatro estruturais e cinco termodinâmicos. Os dois subgrupos (catecóis e não-catecóis) foram analisados separadamente.

Para os não-catecóis, descritores estéricos, termodinâmicos e MSA contribuíram significativamente para a atividade inibidora do processamento 3' [R^2 da validação cruzada (VC) entre 0,616 e 0,634 e R^2 preditivo (PR) entre 0,507 e 0,628], enquanto para o processo de transferência de fita os descritores mais importantes

foram os estéricos, termodinâmicos e estruturais (R^2_{VC} entre 0,544 e 0,592 e R^2_{PR} entre 0,440 e 0,787).

Já para os catecóis os descritores mais importantes em ambos os processos foram os MSA e termodinâmicos (R^2_{VC} entre 0,754 e 0,780 e R^2_{PR} entre 0,534 e 0,688 para o processamento 3' e R^2_{VC} entre 0,808 e 0,837 e R^2_{PR} entre 0,533 e 0,736)⁴⁹. Todas as equações obtidas estão disponíveis na referência 59.

Recentemente, Makhija e colaboradores⁶⁸ utilizaram o planejamento de fármacos pelo método *de novo*. Este estudo realiza a construção em incrementos de um modelo de ligante dentro do sítio ativo do receptor ou enzima, cuja estrutura é conhecida por dados de raios-X ou de ressonância magnética nuclear (RMN)⁴⁷. O programa utilizado foi o “Leapfrog”⁶⁸.

A partir de um modelo farmacofórico obtido por CoMFA foi proposta uma série inédita de novos inibidores (Figura 22). Cada novo ligante proposto pelo programa teve suas energias relativas de ligação comparadas com seu precursor. Esta energia foi calculada considerando os três componentes utilizados pelo programa⁶⁸: entalpias estéricas e eletrostáticas do processo de ligação calculadas pelo campo de força Tripos; energias de dessolvatação do sítio-ativo e energias do ligante. Estes foram considerados como novos compostos-protótipos, já que apresentaram atividade baixa e moderada após sua síntese e ensaios biológicos.

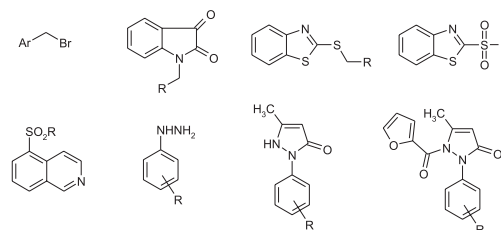


Figura 22. Estruturas básicas dos compostos propostos por Makhija e colaboradores pelo método *de novo*. Adaptado da ref. 68. Ar = grupos aromáticos variados

CONCLUSÃO

Apesar da existência de diversos pontos da replicação do vírus HIV que podem ser considerados novos alvos potenciais para desenvolvimento de novos agentes para terapia farmacológica da AIDS, até o momento apenas inibidores da transcriptase reversa e da protease estão disponíveis. Estes compostos são utilizados para compor o coquetel de drogas, atualmente em uso em todo o mundo e distribuído gratuitamente pelo governo brasileiro para pacientes infectados em tratamento. Mesmo com os resultados positivos nesta abordagem farmacológica, a cura da AIDS ainda não foi alcançada, uma vez que vírus residentes em linfócitos T de memória não são erradicados através desta farmacoterapia¹. Além disso, os medicamentos atualmente disponíveis apresentam alta incidência de desenvolvimento de resistência e de efeitos colaterais, o que aumenta a necessidade de busca e/ou desenvolvimento de agentes terapêuticos. Os inibidores da HIV-integrase pertencem a uma destas possíveis novas classes, sendo que o primeiro potencial novo membro, o S-1360 (**24**), se encontra em estudos clínicos de fase II⁶⁹. A utilização de métodos que englobem o planejamento racional destes agentes, muitos dos quais poderão ser baseados em compostos já existentes ou em produtos naturais que foram ou serão encontrados, poderá auxiliar para que em breve estes fármacos estejam disponíveis, aumentando assim a eficiência da farmacoterapia anti-HIV.

AGRADECIMENTOS

À UNIOESTE (E. B. Melo), IQ/UNICAMP (M. M. C. Ferreira),
à CAPES-IBLCE/UNESP (A. T. Bruni).

REFERÊNCIAS

- Peçanha, E. P.; Antunes, O. A. C.; Tanuri, A.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 1108.
- http://www.AIDS.gov.br/final/biblioteca/bol_dezembro_2002/artigo2.asp, acessada em Fevereiro 2006.
- UNAIDS; *Report on the Global HIV/AIDS epidemics*, 2002.
- http://www.aids.gov.br/final/biblioteca/bol_dezembro_2002/boletim.asp, acessada em Fevereiro 2006.
- Melo, E. B.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2001.
- <http://www.aids.gov.br/final/biblioteca/drug/drug2.htm>, acessada em Fevereiro 2006.
- Souza, M. V. N.; Almeida, M. V.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 366; LaBonte, J.; Lebbos, J.; Kirkpatrick, P.; *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2003**, *2*, 345.
- <http://www.aids.gov.br/final/tratamento/adulto.pdf>, acessada em Outubro 2003; <http://www.aids.gov.br/final/tratamento/crianca.pdf>, acessada em Fevereiro 2006.
- Goldgur, Y.; Craigie, R.; Cohen, G. H.; Fujiwara, T.; Yoshinaga, T.; Fujishita, T.; Sugimoto, H.; Endo, T.; Murai, H.; Davies, D. R.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *23*, 13040.
- Ligani Jr, L. L.; Greco, D. B.; Carneiro, M.; *Rev. Saúde Pub.* **2001**, *35*, 495.
- Challand, R.; Young, R. J.; *Antiviral Chemotherapy*, Spectrum Press: Oxford, 1997, cap 1.
- <http://www.avert.org/virus.htm>, acessada em Fevereiro 2006.
- Mitsuya, H.; Shirasaka, T.; Broder, S. Em *Design of Anti-AIDS Drugs*; De Clerq, E., ed.; Elsevier Press: Amsterdam, 1990, cap. 2.
- Pommier, Y.; Marchand, C.; Neamati, N.; *Antiviral Res.* **2000**, *47*, 139.
- Young, S. D.; *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2001**, *4*, 402.
- Neamati, N.; Sunder, S.; Pommier, Y.; *Drug Discov. Today* **1997**, *2*, 487.
- Taktakishvili, M.; Neamati, N.; Pommier, Y.; Pal, S.; Nair, V.; *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5671.
- Pluymers, W.; Pais, G.; Van Maele, B.; Pannecouque, C.; Fikkert, V.; Burke Jr., T. R.; De Clercq, E.; Witvrouw, M.; Neamati, N.; Debyser, Z.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 3292.
- Gupta, S. P.; Nagappa, A. N.; *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1843.
- Dayam, R.; Neamati, N.; *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9*, 1789.
- Adesokan, A. A.; Roberts, V. A.; Lee, K. W.; Lins, R. D.; Briggs, J. M.; *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 821.
- Thomas, M.; Brady, L.; *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 167.
- Arquivo depositado no Protein Data Bank (<http://www.pdb.org>). Código 1QS4.
- Barreiro, A.; Fraga, C. A. M.; *Química Medicinal: as Bases Moleculares da Ação dos Fármacos*, Artmed Ed. Ltda: Porto Alegre, 2001, cap. 3.
- De Clercq, E.; *Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 323.
- Rithaporn, T.; Monga, M.; Rajasekaran, M.; *Contraception* **2003**, *68*, 219.
- Mazumder, A.; Raghavan, K.; Weistein, J.; Kohn, K. W.; Pommier, Y.; *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *49*, 1165.
- Mazumder, A.; Neamati, N.; Sunder, S.; Schultz, J.; Pertz, H.; Eckart, E.; Pommier, Y.; *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3057.
- Englberger, W.; Hadding, U.; Etschenberg, E.; Graf, E.; Leyck, S.; Winkelmann, J.; Parnham, M. J.; *Int. J. Immunopharmacol.* **1988**, *10*, 729; Lamaison, J. L.; Petitjean-Freytet, C.; Carnat, A.; *Ann. Pharm. Fr.* **1990**, *48*, 103; Kim, D. S.; Kim, H. R.; Woo, E. R.; Hong, S. T.; Chae, H. J.; *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *70*, 1066.
- Zhu, K.; Cordeiro, M. L.; Atienza, J.; Robinson Jr, W. E.; Chow, S. A.; *J. Virol.* **1999**, *73*, 3309.
- Robinson Jr, W. E.; Reinecke, M. G.; Abdel-Malek, S.; Jia, Q.; Chow, S. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 6326.
- Robinson Jr, W. E.; *Antiviral Res.* **1998**, *39*, 101.
- Mazumder, A.; Uchida, H.; Neamati, N.; Sunder, S.; Jaworska-Maslanka, M.; Wiekstrom, E.; Zeng, F.; Jones, R. A.; Mandes, R. F.; Chenaut, H. K.; Pommier, Y.; *Mol. Pharmacol.* **1997**, *51*, 567.
- Chi, G.; Neamati, N.; Nair, V.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4815.
- Taktakishvili, M.; Neamati, N.; Pommier, Y.; Pal, S.; Nair, V. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5671.
- Nair, V.; Pal, S.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 289.
- Heralth, K. B.; Jayasuriya, H.; Bills, G. F.; Polishook, J. D.; Dombrowski, A. W.; Guan, Z.; Felock, P. J.; Hazuda, D. J.; Singh, S. B.; *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 872.
- Singh, S. B.; Zink, D.; Polishook, J.; Valentino, D.; Shaflee, A.; Silverman, K.; Felock, P.; Teran, A.; Vilella, D.; Hazuda, D. J.; Lingham, R. B.; *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8775.
- Singh, S. B.; Felock, P.; Hazuda, D. J.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 235.
- Jayasuriya, H.; Guan, Z.; Polishook, J. D.; Dombrowski, A. W.; Felock, P. J.; Hazuda, D. J.; Singh, S. B.; *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 551.
- Hazuda, D.; Blau, C. U.; Felock, P.; Hastings, J.; Pramanik, B.; Wolfe, A.; Bushman, F.; Farnet, C.; Goetz, M.; Williams, M.; Silverman, K.; Lingham, R.; Singh, S.; *Antiviral Chem. Chemother.* **1999**, *10*, 63.
- Hong, H.; Neamati, N.; Wang, S.; Nicklaus, M. C.; Mazumder, A.; Zhao, H.; Burke Jr., T. R.; Pommier, Y.; Milne, G. W. A.; *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 930.
- Milne, G. W. A.; Nicklaus, M. C.; Driscoll, J. S.; Wang, S.; *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1994**, *34*, 1219.
- Sadowski, J.; Gasteiger, J.; Klebe, G.; *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1994**, *34*, 1000.
- Nicklaus, M. C.; Neamati, N.; Hong, H.; Mazumder, A.; Sunder, S.; Chen, J.; Milne, G. W. A.; Pommier, Y.; *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 920.
- Neamati, N.; Hong, H.; Mazumder, A.; Wang, S.; Sunder, S.; Nicklaus, M. C.; Milne, G. W. A.; Proska, B.; Pommier, Y.; *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 942.
- Sant'Anna, C. M. R.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 505.
- Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E.; *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235.
- Witvrouw, M.; Fikkert, V.; Pannecouque, C.; Van Remoortel, B.; DeClerq, E.; Debyser, Z.; *Antiviral Res.* **2004**, *62*, A28.
- Bourguignon, J. Em *The Practice of Medicinal Chemistry*; Wermuth, C. C., ed.; Academic Press: San Diego, 1996, cap. 15.
- Schames, J. R.; Henchman, R. H.; Siegel, J. S.; Sotriffer, C. A.; Ni, H.; McCammon, J. A.; *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1879.
- Long, Y.; Jiang, X.; Dayam, R.; Sanchez, T.; Shoemaker, R.; Sei, S.; Neamati, N.; *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2561.
- Sotriffer, C. A.; Ni, H.; McCammon, J. A.; *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6136.
- Heuer, T. S.; Brown, P. O.; *Biochemistry* **1998**, *37*, 6667.
- Wang, J. Y.; Ling, H.; Yang, W.; Craige, R.; *EMBO J.* **2001**, *20*, 7333.
- Costi, R.; Di Santo, R.; Artico, M.; Roux, A.; Ragno, R.; Massa, S.; Tramontano, E.; La Colla, M.; Loddo, R.; Marongiu, M. E.; Pani, A.; La Colla, P.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1745.
- Makhija, M. T.; Kulkarni, V. M.; *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2001**, *41*, 1569.
- Raghavan, K.; Buolamwini, J. K.; Fesen, M. R.; Pommier, Y.; Kohn, K. W.; Weinstein, J. N.; *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 890.
- Makhija, M. T.; Kulkarni, V. M.; *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 1483.
- Buolamwini, J. K.; Assefa, H.; *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 841.
- Tavares, L. C.; *Quim. Nova* **2002**, *27*, 631.
- Oliveira, D. B.; Gáudio, A. C.; *Quant. Struct.-Act. Relat.* **2000**, *19*, 599.
- Infomatrix Inc.; *Pirouette® for Windows*; Woodinville, EUA, 2000.
- Ferreira, M. M. C.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, *13*, 742.
- Ma, X.; Zhang, X.; Tan, J.; Chen, W.; Wang, C.; *Acta Pharmacol. Sin.* **2004**, *25*, 950.
- Rogers, D.; Hopfinger, A. J.; *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* **1994**, *34*, 854.
- Hopfinger, A. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7196.
- Makhija, M. T.; Kasliwal, R. T.; Kulkarni, V. M.; Neamati, N.; *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2317.
- Billich, A.; *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2003**, *4*, 20.