



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”**

FACULDADE DE MEDICINA

Heloisa de Carvalho Sampaio

**Avaliação da resistência da protease do vírus da
hepatite C em pacientes em tratamento com o
fármaco Boceprevir**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Pesquisa e
Desenvolvimento (Biotecnologia
Médica).

Orientador: Prof. Dr. Rafael Plana Simões

Coorientadora: Profa. Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto

Botucatu

2017

Heloisa de Carvalho Sampaio

Avaliação da resistência da protease do vírus da
hepatite C em pacientes em tratamento com o
fármaco Boceprevir

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Pesquisa e Desenvolvimento
(Biotecnologia Médica).

Orientador: Prof. Dr. Rafael Plana Simões

Coorientadora: Profa. Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto

Botucatu

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Sampaio, Heloisa de Carvalho.

Avaliação da resistência da protease do vírus da
hepatite C em pacientes em tratamento com o fármaco
Boceprevir / Heloisa de Carvalho Sampaio. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Rafael Plana Simões

Coorientador: Rejane Maria Tommasini Grotto

Capes: 90400003

1. Hepatite C - Tratamento. 2. Mutação (Biologia).
3. Filogenia. 4. Inibidores enzimáticos proteolíticos.
5. Fármacos.

Palavras-chave: NS3; Filogenética; Modelagem molecular;
HCV; Mutação; RVNS.

Heloisa de Carvalho Sampaio

Avaliação da resistência da protease do vírus da hepatite C em pacientes em tratamento com o fármaco Boceprevir

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Orientador: Prof. Dr. Rafael Plana Simões

Coorientadora: Profa. Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto

Comissão Examinadora

Prof Dr Rafael Plana Simões

Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu-UNESP

Dr^a Flávia Hebler Barbosa Trovão

Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP

Prof Dr Carlos Alexandre Henrique Fernandes

Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP

Botucatu 2017

Dedicatória

Dedico esse trabalho a minha família, minha mãe pelas palavras de consolo, meu pai pela paciência e força e minha irmã sempre pronta a ajudar e escutar.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, pois é Ele que nos capacita para todas as coisas.

À minha família pelo amor e compreensão, minha mãe Lúcia que está sempre presente e por suas palavras de esperança, meu pai Benedito por seu apoio e segurança em todos os momentos, minha irmã Nathália pela sua amizade e afeto em todos os momentos.

À minha família em geral avó, tios, tias, primos e primas pela união e amor que sempre me acolhem, pois é na família que temos a base para a vida.

Ao meu Orientador Dr. Rafael Plana Simões, pois sem ele nada disso seria possível.

À minha Coorientadora Dra. Rejane Maria Tommasine Grotto pela sua confiança e todo conhecimento compartilhado.

Aos Professores e colaboradores Dr. Guilherme Targino Valente e Dr. Angelo José Magro pela disposição, auxílio e todo conhecimento agregado.

Às minhas amigas de Laboratório e apartamento Gabriela, Cristiane e Ana Livia que me aguentaram e me ajudaram em muitos momentos difíceis.

Aos meus amigos de Laboratório Regina pela paciência e dedicação que sempre me acolheu, ao Maércio pelos conselhos e conversas estando sempre disposto ajudar, a Sarita pela

disposição e conselhos sempre bem vindos e a Renata pelo ensinamento e amizade desde o começo.

Aos meus novos amigos Flávia por todo conhecimento passado e paciência que sempre teve comigo, sempre ajudando e auxiliando no que fosse preciso, ao Leonardo um amigo em que pude compartilhar esse trabalho, agradeço pela dedicação, disposição e pelas nossas risadas.

À Natália Almeida minha companheira de Mestrado pelas conversas e apoio que sempre me dava.

A todos os meus amigos do Laboratório Cléo, Lauana, Lucas, Carol, Fran, Jack e Eduardo por estarem comigo nessa jornada.

Ao Laboratório de Biologia Molecular, Rotinas Diagnósticas e Pesquisa Aplicada, da Divisão de Hemocentro da UNESP, pela infraestrutura oferecida.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram nesse trajeto um muito obrigada.

Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.

Martin Luther King

Resumo

A Hepatite C é caracterizada por uma infecção crônica e progressiva causada pelo vírus da HCV. A proteína NS3 do vírus está envolvida no seu ciclo replicativo, sendo assim importante alvo de ação de antivirais denominados de ação direta. O inibidor da protease Boceprevir faz parte da primeira geração dessa classe de drogas. Porém, muitos pacientes apresentam resposta virológica não sustentada (RVNS) durante o tratamento devido à incapacidade de supressão da replicação viral. O objetivo desse trabalho foi avaliar a presença de mutações e polimorfismos genéticos na região codificadora da proteína NS3 do HCV em pacientes que apresentam indicação de uso do fármaco Boceprevir que estão associadas com à (RVNS). Amostras de 25 pacientes foram utilizadas para o sequenciamento da proteína NS3 do HCV e avaliadas de acordo com suas mutações através de análise filogenética e de modelagem molecular, mais especificamente, índice de reatividade e simulação de dinâmica molecular. A reconstrução filogenética e as análises de pressão de seleção mostraram que pacientes que apresentaram falha ou recidiva possuem vírus com algumas mutações em regiões na estrutura viral que são próximas aos sítios de ligação com o fármaco Boceprevir. As análises de índice de reatividade mostraram que a probabilidade da ligação covalente ocorrer entre ligante e receptor está associada com a probabilidade de desprotonação do aminoácido S139 da proteína NS3. Já os resultados de dinâmica molecular mostram que a estabilidade da interação fármaco e proteína não é alterada após mutações singulares, sugerindo que o mecanismo de resistência do HCV pode estar associado a uma combinação de mutações ou ainda a aspectos moleculares não analisados no presente trabalho, como mecanismos de acoplamento receptor e ligante e modos de vibração da proteína.

Palavras-chave: HCV, NS3, mutação, RVNS, filogenética, modelagem molecular.

Abstract

Hepatitis C is characterized by a chronic and progressive infection caused by the HCV virus. The NS3 protein of the virus is involved in its replicative cycle, thus being an important target for the action of so-called direct-acting antivirals. The protease inhibitor Boceprevir is part of the first generation of this class of drugs. However, many patients present unsupported virological response (UVR) during treatment because of inability to suppress viral replication. The objective of this work was to evaluate the presence of mutations and genetic polymorphisms in the coding of the VHC NS3 protein in patients with indication of use of the drug Boceprevir that are associated with unsustained virological response. Samples from 25 patients were used for the sequencing of the VHC NS3 protein and evaluated according to their mutations through phylogenetic analysis and molecular modeling, more specifically, reactivity index and molecular dynamics simulation. Phylogenetic reconstruction and selection pressure analyzes have shown that patients who have failed or relapse have viruses with some mutations in regions in the NS3 protein sequence that are close to the drug binding sites Boceprevir. Reactivity index analyzes have shown that the probability of covalent binding between ligand and receptor occurring is associated with the probability of deprotonation of the S139 amino acid of the NS3 protein. The molecular dynamics results show that the stability of the drug and protein interaction is not altered after single mutations, suggesting that the mechanism of resistance of HCV may be associated with a combination of mutations or molecular aspects not analyzed in the present work, as Receptor and ligand coupling mechanisms and modes of protein vibration.

Key words: HCV, NS3, mutation, RVNS, phylogenetic, molecular modeling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema do genoma do HCV, demonstrando as regiões gênicas codificadoras das proteínas estruturais (vermelho) e não estruturais (amarelo), rodeadas por duas regiões não traduzidas (PENIN et al., 2004b).....	20
Figura 2. Representação bidimensional da estrutura do fármaco Boceprevir. (“Boceprevir C27H45N5O5 ChemSpider”, [s.d.].....	22
Figura 3. <i>Pocket</i> de ligação superficial da proteína NS3/4A e o fármaco Boceprevir, o qual está representado em <i>sticks</i> . São indicados locais aproximados das posições P1, P2 e P3, as quais correspondem aos pontos de contato fármaco-proteína. (VENKATRAMAN, 2012)....	23
Figura 4. Interações moleculares do fármaco Boceprevir com resíduos de aminoácidos da proteína NS3. (VENKATRAMAN, 2012).....	23
Figura 5. Região NS3-NS4 e Boceprevir PDB ID 2OC8. (HALFON; LOCARNINI, 2011).	28
Figura 6. Representação das semanas de tratamento.....	34
Figura 7. Mecanismo de reação entre Serina 139 e Boceprevir.	41
Figura 8. Cladograma da análise filogenética dos pacientes em tratamento com o fármaco Boceprevir. As informações dos pacientes com resposta virológica sustentada estão representadas com a cor preta, enquanto as informações dos pacientes com Resposta virológica não sustentada estão representadas com diferentes cores, sendo que informações de mesma cor indicam um mesmo paciente.	46
Figura 9. Mutação A156S acima do fármaco Boceprevir. Os aminoácidos mutados e o fármaco Boceprevir estão representados por <i>sticks</i>	47
Figura 10. Mutação A156S acima do fármaco Boceprevir demonstrando seus átomos.	48
Figura 11. Mutação D168N acima do fármaco Boceprevir. Os aminoácidos mutados e o fármaco Boceprevir estão representados por <i>sticks</i>	48

Figura 12. Mutação D168N acima do fármaco Boceprevir, com seus respectivos átomos.	49
Figura 13. Mutação L153I juntamente com o Boceprevir. Os aminoácidos mutados e o fármaco Boceprevir estão representados por <i>sticks</i>	49
Figura 14. Mutação L153I com seus respectivos átomos ao lado do Boceprevir.	50
Figura 15. Representação dos aminoácidos da proteína NS3 do HCV selvagem (em bastão), do fármaco Boceprevir (em <i>stick</i>) e das interações de hidrogênio entre receptor e ligante (em linhas tracejadas amarelas). Todas as distâncias são medidas em Å.	52
Figura 16. Representação dos aminoácidos da proteína NS3 do HCV selvagem após a dinâmica molecular (em bastão), do fármaco Boceprevir (em <i>stick</i>) e das interações de hidrogênio entre receptor e ligante (em linhas tracejadas amarelas). Todas as distâncias são medidas em Å.	53
Figura 17. Representação dos aminoácidos da proteína NS3 do HCV com a mutação A156S após a dinâmica molecular (em bastão), do fármaco Boceprevir (em <i>stick</i>) e das interações de hidrogênio entre receptor e ligante (em linhas tracejadas amarelas). Todas as distâncias são medidas em Å.	54
Figura 18. Representação dos aminoácidos da proteína NS3 do HCV com a mutação D168N após a dinâmica molecular (em bastão), do fármaco Boceprevir (em <i>stick</i>) e das interações de hidrogênio entre receptor e ligante (em linhas tracejadas amarelas). Todas as distâncias são medidas em Å.	55
Figura 19. Representação dos aminoácidos da proteína NS3 do HCV com a mutação L153I após a dinâmica molecular (em bastão), do fármaco Boceprevir (em <i>stick</i>) e das interações de hidrogênio entre receptor e ligante (em linhas tracejadas amarelas). Todas as distâncias são medidas em Å.	56
Figura 20. Estrutura otimizada da molécula do aminoácido S139 contendo o nome e número de cada elemento da estrutura.	58

Figura 21. Resultados dos índices de Fukui para a molécula do aminoácido S139. A cor vermelha indica átomos mais susceptíveis à reação e a cor azul átomos menos susceptíveis à reação.....	58
Figura 22. Resultados dos índices de Fukui para a molécula do aminoácido S139 desprotonado sobre o átomo O4.....	60
Figura 23. Representação do HOMO do aminoácido S139 e S139 desprotonado.....	60
Figura 24. Estrutura otimizada da molécula fármaco Boceprevir contendo o nome e número de cada elemento da estrutura.....	61
Figura 25. Resultados dos índices de Fukui para a molécula do fármaco Boceprevir.....	62
Figura 26. Resultados dos índices de Fukui para o composto formado pelo aminoácido S139 desprotonado e a molécula do fármaco Boceprevir.....	63
Figura 27. Representação do HOMO do composto formado pelo aminoácido S139 e o fármaco Boceprevir.	64
Figura 28. Representação do HOMO do composto formado pelo aminoácido S139 e o fármaco Boceprevir com protonação sobre o átomo O3.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Síntese das mutações associadas com resistência diferentes tipos de fármacos. (adaptado de HALFON; LOCARNINI, 2011)	25
Tabela 2. Dados extraídos de prontuários de pacientes tratados com Boceprevir	32
Tabela 3. Dados extraídos do prontuário dos pacientes com resposta virológica sustentada.	33
Tabela 4. Tabela de Primers segundo ZERMINIAN, L. B, 2011 (apud (MELLO, I.M.V.G.C, [s.d.]) **)	35
Tabela 5. Síntese das ligações de hidrogênio entre resíduos da proteína NS3 do vírus HCV e o inibidor Boceprevir.....	40
Tabela 6. Pacientes com Falha/Recidiva sequenciados.....	44
Tabela 7. Síntese das distâncias das ligações de hidrogênio consideradas pela literatura como relevantes para a estabilidade da ligação entre a proteína NS3 e o fármaco Boceprevir.	51

LISTA DE ABREVIACÕES

A/Ala: Alanina

D/Asp: Aspartato

DAA: Antivirais de Ação Direta

ESP: Electrostatic Potential

G/Gli: Glicina

HCV: Vírus da Hepatite C

H/His: Histidina

I/Ile: Isoleucina

IFC: ndices de Fukui Condensados

K/Lis: Lisina

L/Leu: Leucina

LRT: Teste de razão de verossimilhança aproximada

M/Met: Metionina

N/Asn: Asparagina

NCBI: National Center for Biotechnology informática

P/Pro: Prolina

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

Q/Gln: Glutamina

R/Arg: Arginina

RHF: Hartree-Fock Restrito

ROHF: Hartree-Fock Restrito Open-Shell

RVNS: Resposta Viroológica não Sustentada

S/Ser: Serina

T/Tre: Treonina

UHF: Hartree-Fock Irrestrito

UI/ML: Unidade Internacional por Mililitros

V/Val: Valina

X: Indefinido

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Boceprevir	21
1.2 Mutações na região NS3.....	24
1.3 Testes Filogenéticos	26
1.4 Pressão de seleção	27
1.5 Modelagem Molecular.....	27
1.6 Considerações sobre o presente trabalho.....	29
2. OBJETIVOS	30
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	31
3.1 Análise do RNA viral	31
3.2 Extração e transcrição do RNA Viral	34
3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	34
3.4 Gel de Agarose e purificação.....	35
3.5 Marcação Fluorescente para sequenciamento	35
3.6 Precipitação para sequenciamento.....	36
3.7 Desnaturação	36
3.8 Sequência consenso	37
3.9 Inferências filogenéticas e pressão de seleção.....	37
3.10 Análise conformacional e dinâmica molecular das proteínas	38
3.11 Índices de Fukui	40
4. RESULTADOS DISCUSSÃO	43

4.1 Sequenciamento do VHC	43
4.2 Pressão de seleção e inferência filogenética.....	45
4.3 Dinâmica molecular.....	46
4.4 Índices de Fukui	57
5. CONCLUSÃO.....	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
7. ANEXOS.....	71
7.1 Comitê de Ética	71
7.2 Mudança de Título.....	72

1. INTRODUÇÃO

A Hepatite C foi classificada pela primeira vez em 1989 e é caracterizada por uma infecção crônica e progressiva do vírus da hepatite C (HCV) (LYRA; FAN; DI BISCEGLIE, 2004). O HCV pertence a família *Flaviviridae*, possuindo aproximadamente 9500 nucleotídeos codificando poliproteína de 3000 aminoácidos (PENIN et al., 2004a).

O HCV apresenta alta variabilidade genética que classifica o vírus em seis genótipos e vários subtipos e quasiespécies, sendo estas uma variação na população viral (HALFON; LOCARNINI, 2011; SIMMONDS et al., 2005). O genótipo 1 apresenta uma distribuição global, sendo o mais frequente. O genótipo 4 é prevalente na África do Norte e Oriente Médio e o 5 e 6 na África do Sul e Hong Kong, respectivamente (ZEIN, 2000). No Brasil, os genótipos 1, 3 e 2 são os mais frequentes, nesta ordem, com predominância do genótipo 1 na maioria dos estados (CAMPIOTTO et al., 2005). Essa alta heterogeneidade no genoma do HCV é consequência da alta taxa replicativa viral e ausência de atividade de reparo da polimerase, que geram mutações no genoma viral (HALFON; LOCARNINI, 2011).

O HCV codifica diversas proteínas. Das proteínas não estruturais, a NS2 é uma proteína de membrana integral, não glicosilada, com a função de clivar a junção NS2-NS3 da poliproteína (PENIN et al., 2004a). A proteína NS3 helicase está envolvida no ciclo replicativo do vírus (LOVE et al., 1996). A helicase corresponde à porção C-terminal da proteína NS3, já a porção NS3 serina-protease de tipo quimiotripsina (NS3/4A) representa a porção N-terminal da proteína, sendo responsável pela clivagem das poliproteínas virais durante esse ciclo (PENIN et al., 2004a; SHIRYAEV; CHELTSOV; STRONGIN, 2012). Porém o domínio de proteína NS3 necessita do cofator NS4A para sua ativação, sendo a NS4A uma proteína anfipática que direciona a um alinhamento adequado da His-57, Asp-81 e Ser-139 da tríade catalítica. Após a ativação, o domínio apresenta um local de ligação de zinco, sendo coordenado por três resíduos Cys (Cys-97, Cys-99 e Cys-145) e His-149

(SHIRYAEV; CHELTSOV; STRONGIN, 2012). O sítio ativo está localizado em uma superfície entre dois domínios β barris pouco profundos (VENKATRAMAN, 2012). A Figura 1 apresenta uma síntese do exposto neste parágrafo.

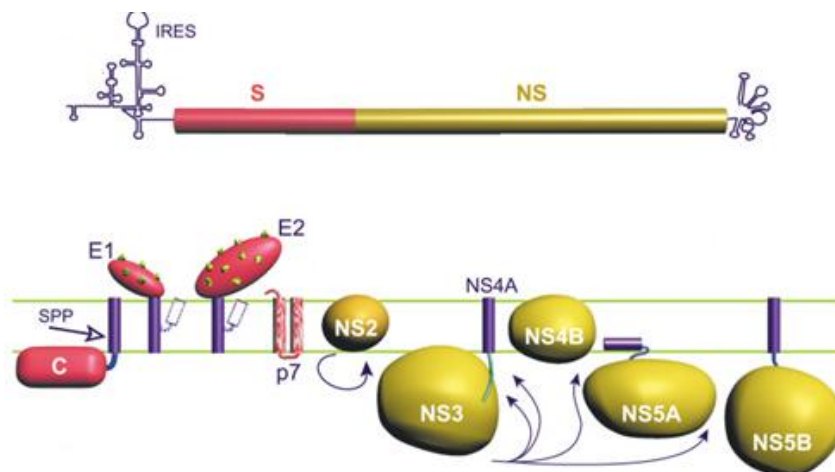


Figura 1 Esquema do genoma do HCV, demonstrando as regiões gênicas codificadoras das proteínas estruturais (vermelho) e não estruturais (amarelo), rodeadas por duas regiões não traduzidas (PENIN et al., 2004b).

Após a infecção da célula hospedeira e liberação do RNA viral pela partícula protetora, ocorre a tradução do RNA em poliproteínas. Tal estrutura é clivada proteoliticamente em diversos pontos gerando dez produtos. Cada proteína clivada terá uma função específica. As proteínas estruturais serão utilizadas para formar novas partículas virais. Já as proteínas não estruturais participam na replicação do genoma viral, ou seja, o RNA é utilizado como molde para a síntese de uma nova cadeia negativa, que na próxima replicação produzirá um RNA de cadeia positiva. O processo de replicação é catalisado pela NS3 helicase e pela NS5B polimerase (SHIRYAEV; CHELTSOV; STRONGIN, 2012).

Até 2011; a base para o tratamento da Hepatite C crônica consistia na combinação de Interferon Alfa peguilado e Ribavirina. Já as drogas pertencentes à classe dos inibidores de protease possuem alvos de ação nos sítios de replicação do HCV, fazendo parte dessa classe

os fármacos Boceprevir e Telaprevir. Porém, esses dois últimos fármacos possuem ação apenas no genótipo tipo 1 e seus subtipos.

A proteína NS3 passou a constituir importante alvo de ação de antivirais, denominados os quais tendem a elevar a resposta virológica sustentada (RVS) dos pacientes com Hepatite C crônica. Por outro lado, antivirais que atuam diretamente no vírus podem conduzir à emergência de variantes resistentes. Os inibidores da protease Boceprevir e Telaprevir fizeram parte da primeira geração desse tipo de droga, porém ainda apresentam mecanismos de resistências cruzada, ou seja, quando uma determinada mutação participa da resistência a uma droga, ela também confere resistência à outra droga da mesma classe. A resistência ao fármaco está ligada à incapacidade de supressão da replicação viral, onde vários fatores contribuem para tal acontecimento, como a elevada replicação viral, reduzida fidelidade da polimerase viral, pressão seletiva exercida pela droga e barreira genética da droga (HALFON; LOCARNINI, 2011).

1.1 Boceprevir

Comercialmente apresentado como Victrelis, o Boceprevir é um fármaco indicado para o tratamento em pacientes em estágio crônico de infecção com o HCV de genótipo 1. A administração do fármaco é combinada com Alfapeginterferona e Ribavirina. O principal objetivo no tratamento de pacientes com HCV é a busca pela resposta virológica sustentada, ou seja, que o vírus se mantenha não detectado seis meses após o final do tratamento. (ZERMINIAN, L. B, 2011)

Sendo classificado como um antiviral de ação direta, o Boceprevir levou mais de 10 anos de pesquisa para sua formulação final. Para o desenvolvimento do Boceprevir, várias bibliotecas foram analisadas procurando uma estrutura molecular em potencial que pudesse ser otimizada para a ação antiviral. Para isso, foi considerado o projeto de uma droga levando

em conta a estrutura da molécula alvo (proteína NS3) e a estabilidade da estrutura molecular do fármaco, de forma que a droga pudesse ser bem absorvida e que exercer sua função *in vivo*. O Boceprevir é um composto orgânico com fórmula molecular $C_{27}H_{45}N_5O_5$ e sua estrutura é ilustrada de forma bidimensional na Figura 2. Por possuir uma cadeia principal de estrutura linear, esse fármaco também, assim como o fármaco Telaprevir, é classificado em diversas publicações como fármaco de cadeia linear.

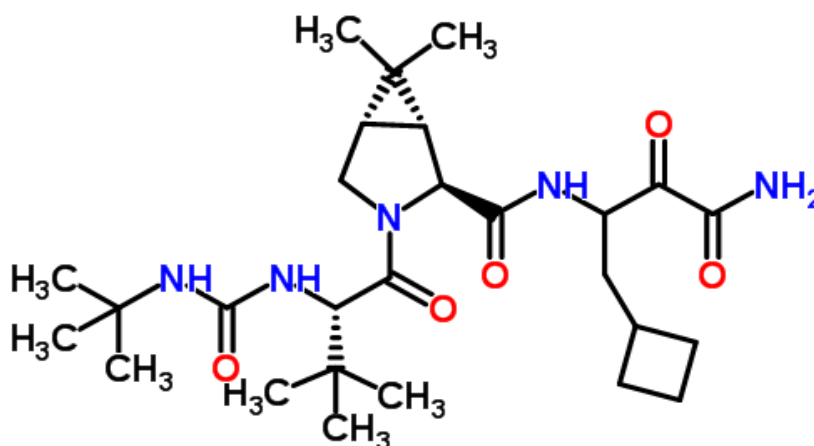


Figura 2. Representação bidimensional da estrutura do fármaco Boceprevir. (“Boceprevir | $C_{27}H_{45}N_5O_5$ | ChemSpider”, [s.d.])

Em sua formulação final, diversas ligações entre o fármaco Boceprevir e a proteína NS3 foram identificados (VENKATRAMAN, 2012). Essas interações estão ilustradas nas Figuras 3 e 4, onde os resíduos que constituem a tríade catalítica da proteína são destacados em amarelo.

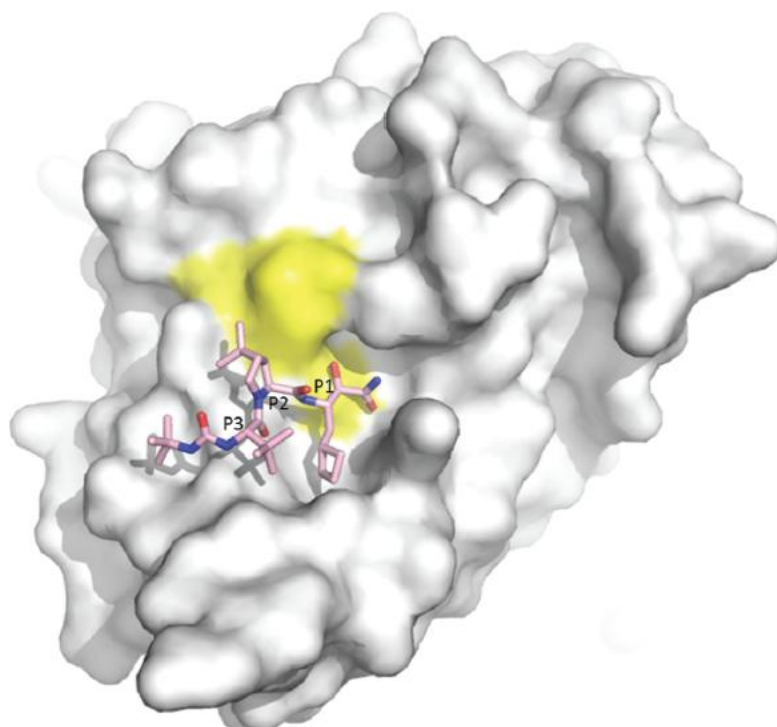


Figura 3. *Pocket* de ligação superficial da proteína NS3/4A e o fármaco Boceprevir, o qual está representado em *sticks*. São indicados locais aproximados das posições P1, P2 e P3, as quais correspondem aos pontos de contato fármaco-proteína. (HOWE; VENKATRAMAN, 2013)

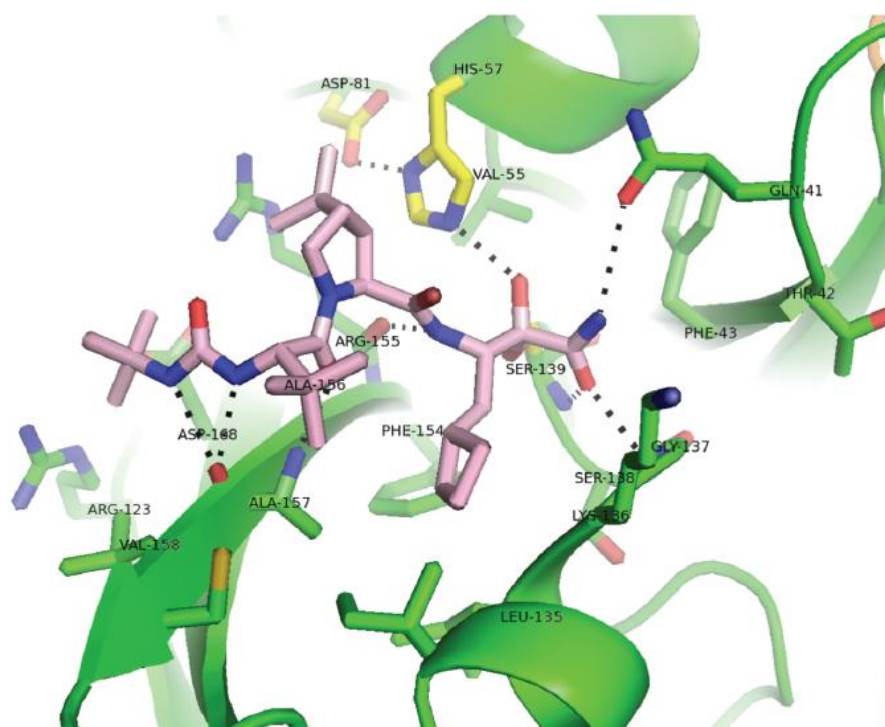


Figura 4. Interações moleculares do fármaco Boceprevir com resíduos de aminoácidos da proteína NS3. (HOWE; VENKATRAMAN, 2013)

Além das ligações de hidrogênio apresentadas na Figura 4, alguns trabalhos reportam a existência de uma ligação covalente reversível formada entre fármacos classificados como de cadeia linear e o resíduo S139 da proteína viral. Essa ligação se deve a uma armadilha eletrofílica projetada durante o desenvolvimento dos fármacos de cadeia linear (HALFON; LOCARNINI, 2011; HOWE; VENKATRAMAN, 2013). Contudo, apesar dessa ligação covalente ser descrita pela literatura como imprescindível para a atuação dessa categoria de fármacos, não há um estudo detalhado sobre os mecanismos e a viabilidade da existência dessa interação do ponto de vista de estrutura eletrônica, assim como o uma análise de correlação entre as mutações do vírus e a probabilidade de que essa ligação covalente ocorra.

1.2 Mutações na região NS3

As mutações virais decorrem de uma ou mais alterações no genoma viral, ou seja, qualquer alteração no vírus selvagem é caracterizada como uma mutação. Processos como ausência de reparo da polimerase viral e alta replicação estão associados a tais mutações, o que pode acarretar no fato que várias populações virais podem coabitar no mesmo indivíduo (quasiespécies). Assim, a predominância de uma população depende da capacidade replicativa ou *fitness* viral, o que pode ser correlacionado com a pressão seletiva do sistema imunológico e com as mutações resultantes de drogas antivirais.

Ao se abordar duas subpopulações virais no mesmo indivíduo, as resistências primárias e secundárias devem ser analisadas. A resistência primária leva em consideração que pacientes nunca tratados podem possuir duas variantes genéticas e que, quando tratados com medicamentos DAA, teriam uma rápida seleção viral. A resistência secundária parte do pressuposto que o medicamento de modo indireto e aleatório possibilitaria o surgimento de

mutações resistentes que apresentam vantagens seletivas em relação ao vírus selvagem (ZERMINIAN, L. B, 2011)

A literatura reporta algumas mutações que estão relacionadas à alta resistência aos inibidores da protease. Shiryayev et al. (2012) mostraram por meio de uma simulação de acoplamento proteína-ligante que as mutações mais comuns encontradas na região NS3 são V36M, R155K, A156T, D168A e V170A sendo que destas V36M, R155K, A156T e V170A estão relacionadas à diminuição da sensibilidade ao fármaco Boceprevir.

Halfon e Locarnini (2011) fizeram uma ampla revisão bibliográfica sobre os mecanismos de resistência do HCV ao tratamento com fármacos. Os resultados estão sintetizados em um quadro contendo as mutações relevantes, as quais são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Síntese das mutações associadas com resistência diferentes tipos de fármacos. (adaptado de HALFON; LOCARNINI, 2011)

	V36A/ M	T54A	V55A	Q80R/ K	R155K/ T/Q	A156S	A156V/ T	D168A/ V/T/H	V170A
Telaprevir (linear)	X	X	X		X	X	X		X
Boceprevir (linear)	X	X	X		X	X	X		X
SCH-900518 (linear)	X	X			X	X	X		X
BILN-2061 (macro-cíclico)					X		X	X	
ITMN-191 (macro-cíclico)					X	X	X	X	
MK-7009 (macro-cíclico)		X			X	X	X	X	
TMC-435350 (macro-cíclico)				X	X		X	X	
BI-201335 (linear)					X		X	X	X
MK-5172 (macro-cíclico)							X	X	
GS-9256 (macro-cíclico)					X		X	X	
ABT-450 (macro-cíclico)					X		X	X	

BMS-791325 (macro-cíclico)					X		X	X	
-------------------------------	--	--	--	--	---	--	---	---	--

Associando todos os dados da literatura, é possível descrever que as mutações da protease NS3 que de alguma forma estão associadas com a resistência ao tratamento com o fármaco Boceprevir são: V36A/M; T54A/S; V55A; R155K/T/Q; A156S/V/T; V170A.

1.3 Testes Filogenéticos

A Filogenia consiste na busca genealógica de um grupo de organismos e em suas possíveis relações de ancestralidade e descendência. (PEDERNEIRAS, L.C, 2011)

A partir da ideia de ancestralidade, busca-se investigar a evolução e as relações entre genes e organismos. Partindo desse suposto, os métodos filogenéticos consideram as semelhanças entre os genes como homólogas, ou seja, que partilham de um mesmo antepassado, recente o suficiente para conter certas similaridades (PEDERNEIRAS, L.C, 2011).

Ao observar o código genético, constatou-se que sequências de nucleotídeos evoluem mais rapidamente do que as proteínas que elas codificam, com isso podem ocorrer à inserção ou deleção de nucleotídeos. Para alguns organismos como vírus, a filogenética tornou-se um método para análise de mutações, tanto inserções como deleções, e também como forma de calcular o mais recente ancestral comum (LEMEY, 2009). Dessa forma, esse tipo de análise pode ser utilizado como ferramenta para identificar mutações no HCV que possam estar associadas com resistência viral a partir de informações genéticas do vírus antes do tratamento antiviral e após a RVNS.

1.4 Pressão de seleção

Através da análise de pressão, pode-se observar quais genes estão sofrendo uma pressão de seleção e também se tal pressão é positiva, negativa ou neutra. A pressão de seleção positiva é a pressão sofrida pelo gene do vírus de modo que as mutações originadas passem para as descendências de modo a agregar vantagens virais. Já na pressão de seleção neutra, também ocorre uma pressão no gene, porém, esta mutação não passaria para as descendências. E na Pressão de seleção negativa, a pressão sofrida pelo gene muda de maneira inviável para a sobrevivência do vírus. Deste modo o teste de pressão de seleção identifica genes que estão sobre uma pressão seletiva (LEMEY, 2009).

A evolução viral ocorre em resposta a vários fatores e um desses é a mutação. O *fitness* viral corresponde à sua capacidade de adaptação em um determinado organismo, por meio da eliminação de mutações deletérias ou aumento de mutações favoráveis (QUEIRÓZ, 2010).

1.5 Modelagem Molecular

Por meio da compreensão da origem molecular da atividade biológica dos fármacos, pode-se empregar técnicas de modelagem e dinâmica molecular. Essas técnicas permitem elucidar os mecanismos químicos e a dinâmica de interação entre os receptores e ligantes (ALENCASTRO, R.B, 1997).

A estrutura conformacional e a estrutura eletrônica da proteína tem relação direta com sua atividade (CESARINO et al., 2016). Nesse sentido, os cálculos teóricos da estrutura molecular e a caracterização bioquímica e biofísica da proteína se caracterizam como importantes instrumentos para a compreensão da relação entre a proteína e progressão da

doença, tornando seu estudo de fundamental importância para o entendimento da doença e de seu papel na relação patógeno-hospedeiro.

Já as técnicas de dinâmica molecular têm como objetivo encontrar conformações moleculares e mecanismos de interação entre o fármaco e os sítios ativos da proteína. Esses mecanismos de interação entre receptor e ligantes com ação inibidora podem fornecer a base para o entendimento dos mecanismos de resistência viral e também para o desenvolvimento de novas drogas. Nesse contexto, as técnicas de modelagem molecular também podem colaborar para a compreensão dos mecanismos de resistência do HCV ao tratamento com o fármaco Boceprevir.

Conforme descrito previamente, já são reportadas pela literatura diversas mutações que sabidamente estão associadas com resistência viral. O trabalho de Halfon e Locarnini (2011) apresenta uma análise de modelagem molecular das principais mutações do HCV e como essas mutações podem alterar a interação ligante-receptor, especialmente para os casos em que os aminoácidos mutados não são diretamente ligados ao inibidor. Segundo Halfon e Locarnini (2011) as mutações nos aminoácidos A156, V36 e T54 são mais fortemente associadas à resistência ao Boceprevir.

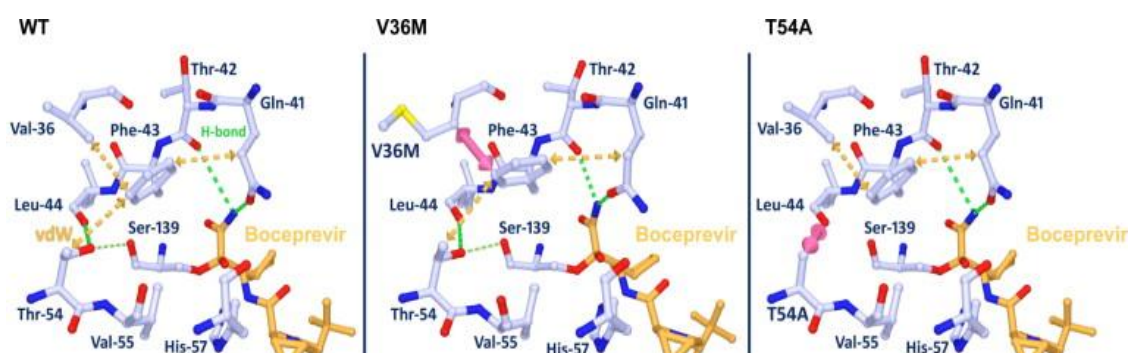


Figura 5. Região NS3-NS4 e Boceprevir PDB ID 2OC8. (HALFON; LOCARNINI, 2011)

Individualmente, as substituições V36A e T54A conferem uma baixa resistência ao Boceprevir. Os resíduos V36 e T54 estão localizados próximos ao domínio catalítico da protease, mas não estão perto da localização do Boceprevir. Desta maneira, tais mutações

conferem um mecanismo de resistência indireta, pois o aminoácido V36 faz interações de van der Waals com o resíduo vizinho F43 que esta em contato com Q41 que, por sua vez, está em contato com os inibidores da protease. Mais precisamente, a mutação V36M confere a perda do contato com o aminoácido F43, proporcionando uma maior flexibilidade à cadeia lateral da fenilalanina. Por tal fato, ocorre uma desestabilização na Q41, o que diminui sua interação de hidrogênio com a molécula do fármaco Boceprevir. (HALFON; LOCARNINI, 2011)

Já o aminoácido T54 faz ligações de hidrogênio com L44 e uma interação de van der Waals com a F43. Forma-se então uma rede de ligações de hidrogênio entre os aminoácidos L44, T54 e S139, sendo a S139 essencial para a atividade proteolítica da protease e para a formação do complexo covalente com o Boceprevir. Desta forma, apesar do aminoácido T54 formar um contato fraco com a S139, a mutação no aminoácido T54 pode provocar alterações nesse contato e, dessa forma, ser responsável pela resistência à ao fármaco. Por meio da análise de fenótipo, identificou-se que o Boceprevir é mais propenso à resistência contra a mutação T54A (HALFON; LOCARNINI, 2011).

1.6 Considerações sobre o presente trabalho

Por todo o exposto, apesar de já existirem mecanismos de mutação associados à resistência ao tratamento com o fármaco Boceprevir reportados pela literatura, o presente trabalho propõe uma abordagem do problema de resistência ao uso do fármaco Boceprevir em pacientes infectados com o vírus da hepatite C, abrangendo análises de diferentes áreas do conhecimento que na literatura estão dispostas de forma desconexas. Sumarizando, é proposta uma coleta de amostras de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu portadores da infecção crônica pelo HCV, seguida de um sequenciamento do vírus. Após essa etapa, serão realizadas análises filogenéticas de pressão de seleção para identificar as mutações que estão associadas à resistência ao fármaco. Por final, utilizando técnicas de

modelagem molecular, serão analisadas as possíveis alterações conformacionais das moléculas da proteína NS3 e identificadas as possíveis alterações nos sítios ativos da molécula causada pelas mutações do vírus que possam esclarecer os mecanismos de resistência ao fármaco Boceprevir.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho é:

- avaliar a presença de mutações e polimorfismos genéticos na região codificadora da proteína NS3 do VHC em pacientes que apresentam indicação de uso do inibidor de protease Boceprevir e verificar se essas mutações podem estar associadas à resistência ao fármaco.

Já os objetivos específicos são:

- realizar sequenciamento do gene da proteína NS3 em pacientes da região de Botucatu infectados com o vírus HCV em tratamento utilizando o medicamento Boceprevir;
- analisar, por meio de reconstrução filogenética e análises de pressão de seleção, as possíveis mutações do RNA viral que estão associadas à resistência ao fármaco Boceprevir;
- avaliar, por meio de cálculos de estrutura eletrônica, a viabilidade da interação covalente entre o sítio eletrofílico do fármaco Boceprevir e o aminoácido Ser-139 da proteína NS3 e se as mutações virais podem alterar probabilidade de que essa mutação ocorra;
- verificar, através de análises de dinâmica molecular, se as mutações identificadas como relevantes para a resistência ao tratamento podem provocar alterações nas interações proteína/ligante (NS3-NS4A/Boceprevir).

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Análise do RNA viral

Foi utilizado o excedente da coleta de sangue de rotina realizada por ocasião da realização do exame de carga viral do HCV, provenientes de 25 pacientes atendidos no Ambulatório de Hepato-Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, portadores da infecção crônica pelo HVC e que apresentavam, indicação para uso de inibidores da protease Boceprevir.

Foram critérios de exclusão pacientes com idade inferior a 18 anos, gestantes, pacientes coinfectados com outros vírus ou, portadores de qualquer outra patologia de etiologia hepática.

A Tabela 2 apresenta dados que foram retirados dos prontuários dos pacientes em tratamento com o fármaco Boceprevir. Observa-se o número de identificação de cada paciente seguido da carga viral da primeira semana da coleta TW0, a semana da falha/recidiva de cada paciente, o tipo de genótipo do vírus seguido pelo grau de fibrose hepática e a semana da falha/recidiva.

Tabela 2. Dados extraídos de prontuários de pacientes tratados com Boceprevir

Nº	TW0	Falha/Recidiva	Genótipo	Fibrose	Semana
1	3.558.774 UI/ML Log 6,55	1.009 UI/ML Log 3	1b	F3/F4	Sem semana da falha/recidiva
2	2.059.265 UI/ML Log 6,31	78 UI/ML Log 1,89	1a	F4	Sem semana da falha/recidiva
4	624.472 UI/ML Log 5,8	23 UI/ML Log 1,36	1a	F4	Sem semana da falha/recidiva
5	156.667 UI/ML Log 5,19	60.722 UI/ML Log 4,78	1a	F0	REC PÓS TTO TW12
6	978.426 UI/ML Log 5,99	73.365 UI/ML Log 4,78	1	F3	Sem semana de falha/recidiva
7	1.903.397 UI/ML Log 6,28	807.551 UI/ML Log 5,91	1b	F4	Sem semana de falha/recidiva
8	2.903.181 UI/ML Log 6,46	114.358 UI/ML Log 5,06	1	F4	FALHA TW 12
9	1.637.073 UI/ML Log 6,21	70.367 UI/ML Log 4,85	1a	F4	REC PÓS TTO TW 12
10	329.904 UI/ML Log 5,52	541.790 UI/ML Log 5,73	1a	F4	FALHA TW 12
11	1.648.234 UI/ML Log 6,22	135.771 UI/ML Log 5,13	1a	F2	Sem semana falha/recidiva
12	324.036 UI/ML Log 5,51	53.368 UI/ML Log 4,73	1b	F3	REC PÓS TTO
13	239.000 UI/ML Log 5,38	69.809 UI/ML Log 4,84	1a	F4	REC PÓS TTO TW 12
14	1.399.281 UI/ML Log 6,15	104.526 UI/ML Log 5,02	1a	F4	FALHA TW 12
15	770.312 UI/ML Log 5,89	168 UI/ML Log 2,23	1a/1b	F3	Sem semana da falha/recidiva
18	2.227.583 UI/ML Log 6,35	106.544 UI/ML Log 5,03	1a	F4	FALHA TW 12
20	348.722 UI/ML Log 5,54	268 UI/ML Log 2,43	1b	F4	Sem semana da falha/recidiva
21	956.364 UI/ML Log 5,98	424.718 UI/ML Log 5,63	1b	F3	Sem semana TW0/ suspensão TW 9
22	871.359 UI/ML Log 5,94	612.609 UI/ML Log 5,79	1b	F1	Sem semana da falha/recidiva

TW: semana de tratamento; REC: recidiva; TTO: tratamento; UI/ML: unidade internacional
por mL

Observa-se na tabela 2 que alguns pacientes não foi possível sequenciar a semana da falha possuindo somente a TW0, ou seja, só a primeira semana de tratamento. A TW0 em questão é a semana onde o paciente iniciou o tratamento, a primeira coleta de sangue sem ainda estar tomando a medicação.

A Tabela 3 apresenta pacientes em tratamento com o fármaco Boceprevir e que não apresentam falha/recidiva no tratamento, ou seja, pacientes que mantêm uma resposta virológica sustentada, seguida do genótipo e grau de fibrose hepática.

Tabela 3. Dados extraídos do prontuário dos pacientes com resposta virológica sustentada.

Nº	TW0	Genótipo	Fibrose
52	1.003.411 UI/ML Log 6,00	1b	F3
53	4.929.976 UI/ML Log 6,69	1	F4
55	818.600 UI/ML Log 5,91	1a	F3
58	697.450 UI/ML Log 5,84	1a	F2
61	4.501.457 UI/ML Log 6,65	1a	F4
64	650.392 UI/ML Log 5,81	1b	F4
74	670.055 UI/ML Log 5,83	1a	F4

UI/ML: unidade internacional por mL

A figura 6 demonstra as semanas de tratamento de um modo geral e seus intervalos, e onde cada paciente que foi sequenciado teria falhado/recidivado, lembrando que nem todos os pacientes possuem essa condição.

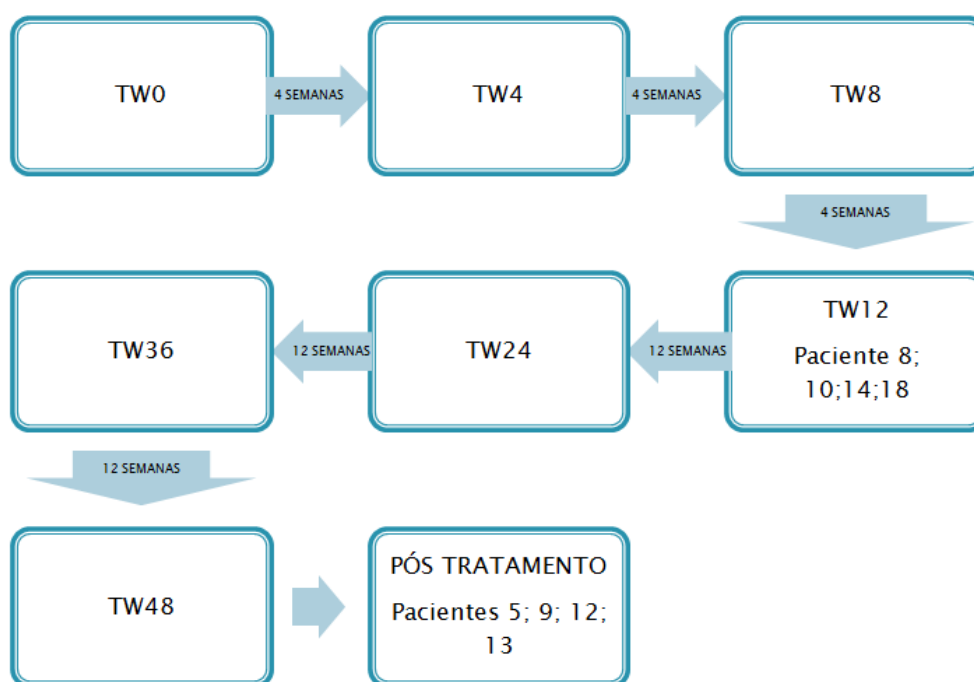


Figura 6. Representação das semanas de tratamento. Arquivo pessoal, 2017.

3.2 Extração e transcrição do RNA Viral

O RNA viral foi extraído do plasma de pacientes utilizando o protocolo de extração (QIAamp Viral RNA Mini Kit) (QIAGEN USA), de acordo com as recomendações do fabricante.

A transcrição reversa do RNA viral para cDNA foi realizada utilizando o Kit High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystem, USA) conforme recomendações do fabricante.

3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a amplificação da região NS3 foi utilizado uma reação contendo 1x de tampão TE (Tris-EDTA) 1,5 mM de Mg-Cl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2μM de cada *primer* (Tabela 3), 1 U de Platinum Taq DNA Polimerase e 2,5 μL de cDNA em um total de 25 μL de reação.

As condições de termociclagem foram 94°C por 5 minutos, 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 7 minutos.

A reação de Nested foi realizada quando necessário em amostras que não amplificaram na PCR, seguindo o mesmo protocolo, porém com uma diluição de 1/10 das amostras.

Tabela 4. Tabela de Primers segundo ZERMINIAN, L. B, 2011 (apud (MELLO, I.M.V.G.C, [s.d.]) **)

Primers	Sequências	Posição	Referências
NS2_487_1a	GAR CCM GTC GTC TTC TCC	2915-2932	Mello et al. **
NS3_F3AS_1a	TGG TGG ACA GAG CRA CCT CCT	4109-4089	Mello et al. **
NS3_F2AS_1a	GGT RGA GTA CGT GAT GGG G	3886-3868	Mello et al. **
NS3 F2_1a	TAC TTG AAA GGC TCC TC	3479-3495	Mello et al. **

NS: não estrutural, AS: *antisense*. R= A ou G; M= A ou C.

* Posição de acordo com a sequência VHC-1 (nº de acesso no *GenBank*: M62321).

**Dados não publicados.

3.4 Gel de Agarose e purificação

Para confirmar a amplificação da região de interesse, 5 µL do produto de PCR foi aplicado em gel de agarose 1% contendo 1:1000x de Gel Red. A corrida foi mantida em 100V a 200 mA por 45 minutos, em tampão TBE (Tris-Borato 45mM-EDTA 1mM). As bandas foram visualizadas em transiluminador UV.

Os PCRs ou NESTED que amplificaram foram purificados utilizando Kit invisorb® Fragment Clean Up (invitex Germany), conforme especificações do fabricante.

3.5 Marcação Fluorescente para sequenciamento

Para reação de marcação fluorescente foi utilizado o Kit ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing v.3.1. (Applied Biosystems, USA), com um volume total de 20 µL de reação sendo 0,4 µM de primer da região genômica NS3, 14 µL de Big Dye 1x de tampão, 3 µL do produto de PCR purificando previamente e água qsp. A reação foi

confeccionada em placas de 96 poços. Obedecendo às seguintes condições de termociclagem: 95°C por 5 minutos 40 ciclos de 95°C 10 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos.

3.6 Precipitação para sequenciamento

Após marcação fluorescente cada amostra foi precipitada pela adição de 50 µL etanol (PA), 100 mM de acetato de sódio e 4 mM de EDTA. A placa foi selada e homogeneizada em vortex por 1 minuto e incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida a placa foi centrifugada 2000 X g por 45 minutos a 4 °C. Para remover o álcool, a placa foi centrifugada invertida a 200 x g e subsequentemente adicionado etanol 70% em cada poço, centrifugada novamente 200 x g por 15 minutos a 4 °C. Para remoção de etanol a placa foi centrifugada novamente nas mesmas condições citadas anteriormente. Por fim, a placa foi seca a 90°C por 2 minutos.

3.7 Desnaturação

Após estar seca, a placa contendo a reação de marcação fluorescente, foi desnaturada utilizando formamida deionizada Hi-Fi (Applied Biosystems, CA, USA) com aquecimento à 94°C por 3 minutos. A eletroforese foi conduzida no equipamento 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA).

Os eletroferogramas obtidos do sequenciador foram analisados utilizando o *software* Geneious Pro 4.8.5. Os nucleotídeos que tiveram uma probabilidade de erro maior que 0.05 foram cortados e removidos da análise.

3.8 Sequência consenso

A partir da sequência consenso de nucleotídeos será obtida a sequência de aminoácidos da proteína no frame correto utilizando as ferramentas do software BioEdit (HALL, 1999). A sequência consenso foi retirada do banco de dados a partir da sequência do genoma completo do vírus da hepatite C, genótipo tipo 1.

3.9 Inferências filogenéticas e pressão de seleção

Para as análises de pressão de seleção, as sequências de nucleotídeo de RNA foram convertidas em DNA e a sequência de alguns pacientes foram desconsideradas devido à baixa confiabilidade. As sequências foram inicialmente alinhadas pelo *software* MUSCLE (EDGAR R.C, 2004). Para o cálculo de saturação foi utilizado o *software* DAMBE (XIA, 2013). Para o modelo evolutivo foi utilizado o *software* ProtTest (ABASCAL; ZARDOYA; POSADA, 2005). O critério Bayesiano foi utilizado para a escolha do melhor modelo, que foi o JTT.

A árvore foi construída com sequências de DNA e visualizada através do Seaview (ABASCAL; ZARDOYA; POSADA, 2005). Para isso, a reconstrução filogenética foi realizada utilizando as sequências nucleotídicas (teste de modelo utilizando o JModelTest (BAZINET; ZWICKL; CUMMINGS, 2014). Utilizando máxima verossimilhança (ML) e inferência bayesiana por meio dos programas PhyML (GUINDON S, 2003) e Beast (DRUMMOND *et al.*, 2012). E respectivamente os ramos foram suportados e a posterior probabilidade para as inferências baseadas em ML.

Alternativamente, sítios sob pressão de seleção foram buscadas *site-by-site* em alguns ramos da árvore filogenética obtida das sequências nucleotídicas.

3.10 Análise conformacional e dinâmica molecular das proteínas

O processo inicial para os estudos conformacionais consistiu na preparação das moléculas da proteína NS3/NS4A e do fármaco Boceprevir. Como referência foi utilizada a estrutura do PDB depositado por Prongay *et al.* (2007), de código 2OC8, contendo a protease NS3/NS4A já complexada com o inibidor Boceprevir. A estrutura da proteína foi determinada pelo método de difração de raios X, com resolução de 2,65 Å.

Utilizando o *software* Pymol, os aminoácidos da molécula da proteína foram alterados de acordo com as mutações consideradas relevantes pelos resultados das análises filogenéticas e resultados previamente reportados pela literatura. Desse modo foram geradas novas estruturas, sendo uma nova estrutura para cada mutação de resíduo considerada relevante.

Na sequência, foi utilizado o servidor PDB 2PQR para avaliar possíveis protonações da molécula. Para isso foi utilizado o campo de força Charmm e pH 7. Os aminoácidos com protonação ou desprotonação significativa foram devidamente indicados para as simulações subsequentes. O *software* VDM (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996) foi utilizado para identificar os resíduos com alteração significativa de pka.

Aos resultados de protonação/desprotonação foram incluídos às avaliações de pka já descritas pela literatura para a molécula da proteína NS3/NS4A. Mais especificamente, a proteína NS3 apresenta dois sítios que coordenam átomos de zinco (Zn), sendo cada sítio formado por três resíduos de cisteína (C97, C99 e C145) e um resíduo histidina (H149) (SHIRYAEV; CHELTsov; STRONGIN, 2012). Para simular essa coordenação, todos os referidos resíduos foram devidamente desprotonados, sendo que a topologia desses novos resíduos foi obtida do trabalho de FOLOPPE e colaboradores (FOLOPPE *et al.*, 2001), que apresentam um estudo do estado de coordenação de Zn²⁺ similar.

O servidor CGenFF foi utilizado para a determinação da topologia do ligante Boceprevir utilizando o campo de força Charmm (VANOMMESLAEGHE *et al.*, 2010).

Para a otimização inicial da estrutura molecular do composto receptor-ligante foi realizada uma dinâmica molecular curta no vácuo utilizando o campo de força Charmm36 em solvente implícito em um tempo de 100 pico-segundos, seguida de uma minimização de energia pelos métodos *Steepest Descent* (SD) e *Newton Raphson* (ABNR) em 500 passos de minimização para remoção das ligações de van der Waals incorretas.

As simulações de dinâmica molecular foram utilizadas para avaliar a estabilidade das interações entre o fármaco ligante e a proteína do vírus em sua estrutura selvagem e para as estruturas mutadas da molécula do receptor NS3/NS4A. Para isso foi utilizado o campo de força Charmm36 juntamente com o modelo de solvatação Transferable Intermolecular Potentials 3P (TIP3P) em uma caixa de simulação de dimensões 91 x 68 x 73 Å, determinadas tendo como referência o tamanho do complexo NS3/NS4A. O algoritmo SHAKE foi utilizado para restringir todos os comprimentos das ligações de átomos de hidrogênios com átomos pesados, estabelecendo um comprimento máximo de ligação de 10 Å. O tempo de simulação para todas as simulações foi de 100 ns, a 300K. Para todas essas simulações foi utilizado o *software* Charmm (BROOKS *et al.*, 2009).

As interações entre receptor e ligante foram analisadas através da determinação das distâncias de ligações de átomos da molécula do fármaco e átomos do receptor que interagem com o ligante, distância essa que pode ser determinada pela equação:

$$d_{ij}(t) = \sqrt{\left(x_i(t) - x_j(t)\right)^2 + \left(y_i(t) - y_j(t)\right)^2 + \left(z_i(t) - z_j(t)\right)^2} \quad (1)$$

onde $(x_i(t), y_i(t), z_i(t))$ e $(x_j(t), y_j(t), z_j(t))$ correspondem às posições dos átomos i e j , respectivamente, no tempo t ; e $d_{ij}(t)$ corresponde à distância entre os átomos i e j , no tempo t .

Para essa análise de distância, foram selecionadas apenas as ligações de hidrogênio já descritas pela literatura consideradas como imprescindíveis para a estabilidade da interação

ligante-receptor e, dessa forma, imprescindíveis para a atuação do fármaco. A Tabela 5 apresenta uma lista dessas ligações.

Tabela 5. Síntese das ligações de hidrogênio entre resíduos da proteína NS3 do vírus HCV e o inibidor Boceprevir.

Resíduo da proteína NS3	Átomo/Grupo do resíduo	Átomo/Grupo do fármaco
Gln-41	O	N
Thr-42	O	N
His-57	N	O
Gly-137	N	O
Ser-139	N	O
Arg-155	O	N
Ala-157	N	O
Ala-157	O	N
Ala-157	O	N

Todas essas informações buscam determinar computacionalmente quais as mutações que podem estar associadas com maior e menor capacidade inibitória e, dessa forma, estabelecer correlações entre estrutura molecular e atividade inibidora.

3.11 Índices de Fukui

As análises dos Índices de Fukui Condensados (IFC) foram realizadas para verificar a viabilidade da ligação covalente do fármaco Boceprevir com o aminoácido S139 reportada em algumas pesquisas. A estrutura inicial do fármaco Boceprevir utilizado para essas análises foi obtida no repositório ChemSpider (“Boceprevir | C₂₇H₄₅N₅O₅ | ChemSpider”, 2016).

A estrutura do resíduo serina foi obtida do PDB depositado por Prongay *et al.* (2007) de código 2OC8, contendo a protease NS3/NS4A complexada com o inibidor Boceprevir. Contudo, no referido PDB, o aminoácido em questão encontra-se ligado covalentemente aos demais aminoácidos da proteína NS3 e também do fármaco Boceprevir. Sendo assim, para as

análises de população eletrônica, essas ligações foram substituídas por terminais de átomos de hidrogênio para a estabilização da molécula.

Dessa maneira, o mecanismo de reação a ser avaliado e que descreve a ligação covalente entre as moléculas é apresentado na Figura 7.

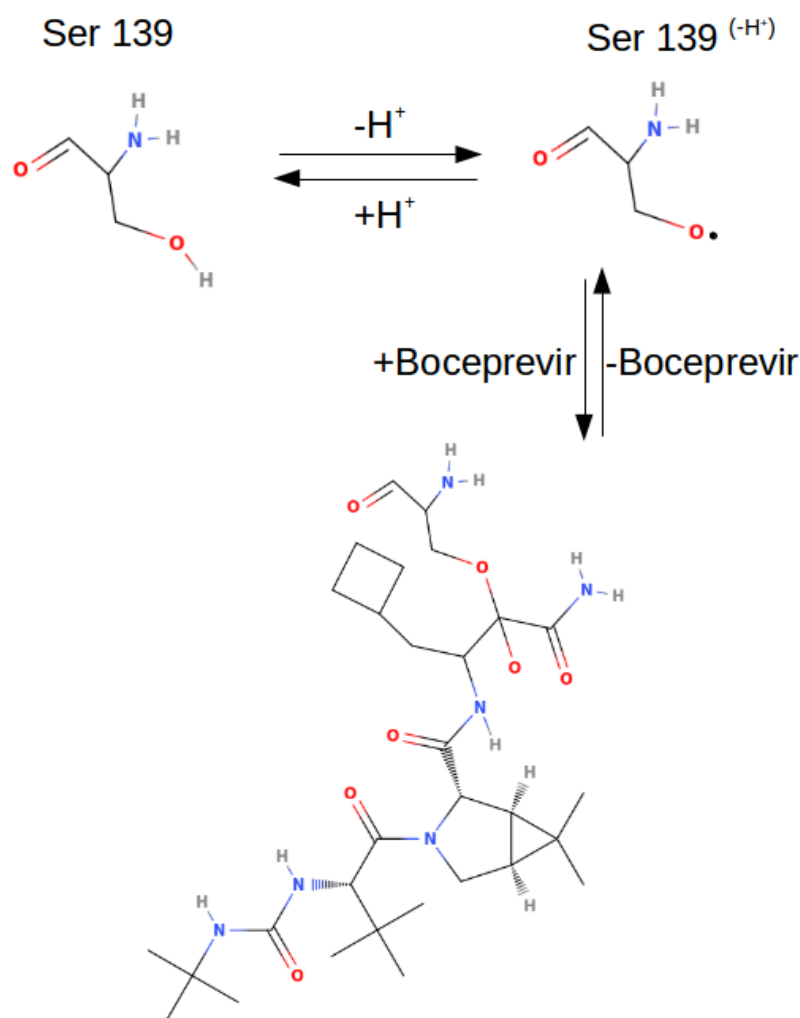


Figura 7. Mecanismo de reação entre Serina 139 e Boceprevir.

Os IFC permitem estudar os sítios de maior reatividade sobre cada átomo do fármaco Boceprevir. No presente trabalho, os IFC dos átomos foram calculados através de uma abordagem DFT, utilizando-se de um conjunto de funções de base STO-3G e do funcional híbrido B3LYP. As abordagens no método DFT são análogas respectivamente ao RHF

(*Restricted Hartree-Fock*), ROHF (*Restricted Open-shell Hartree-Fock*) e UHF (*Unrestricted Hartree-Fock*) no método HF (CESARINO et al., 2016).

As populações eletrônicas foram obtidas através do cálculo de cargas pelo método e análise populacional de Mulliken. A presença do solvente foi simulada através do método COSMO. Os cálculos foram realizados com o auxílio do pacote computacional GAMESS (SCHMIDT et al., 1993).

Dependendo do tipo de reação, três IFC distintos podem ser definidos:

$$\begin{aligned} f_k^+ &= q_k(N+1) - q_k(N) && \text{para ataque nucleofílico no átomo } k \\ f_k^- &= q_k(N) - q_k(N-1) && \text{para ataque eletrofílico no átomo } k \\ f_k^0 &= \frac{1}{2} [q_k(N+1) - q_k(N-1)] && \text{para ataque radicalar no átomo } k \end{aligned} \quad (2)$$

onde $q_k(N+1)$, $q_k(N)$ e $q_k(N-1)$ representam, respectivamente, a população aniônica, catiônica e neutra no átomo k (BATAGIN, A, 2009).

A otimização das estruturas também foi realizada utilizando a abordagem DFT, com um conjunto de funções de base STO-3G e funcional híbrido B3LYP.

4. RESULTADOS DISCUSSÃO

4.1 Sequenciamento do VHC

Por meio das técnicas de Biologia Molecular foram analisadas amostras de plasma excedentes da coleta de dois grupos de pacientes em tratamento com o fármaco Boceprevir. O primeiro grupo apresentou falha ou recidiva em alguma semana durante ou após o tratamento. O segundo grupo apresentou resposta virológica sustentada, ou seja, a carga viral dos pacientes desse grupo se manteve indetectável ao longo do tratamento.

A Tabela 6 apresenta informações sobre os pacientes com falha/recidiva. A identificação de cada paciente é feita por uma numeração. Nas colunas seguintes são apresentadas: as mutações observadas; a carga viral na semana TW0 (em unidades internacionais por ML e seu respectivo Log; a carga viral na semana de falha/recidiva; o genótipo do paciente e seu subtipo; o grau de fibrose hepática; a semana da falha ou recidiva e, por final, a identificação trata-se de um caso de falha ou recidiva.

Tabela 6. Pacientes com Falha/Recidiva sequenciados.

Nº	Mutação	TW0	Falha/Recidiva	Genótipo	Fibrose	Semana	Falha/ Recidiva
5	A7T; Q34X ; T98A	156.667 UI/ML Log 5,19	60.722 UI/ML Log 4,78	1a	F0	Pós TT0	Recidiva
8	V35I; T40A; S42T; V48I; T54S; T61S; K62R; L64I; G66S; I71V; T72I; Q86P; P89Q; V32I; S147A; R155K; M175X; T196S	2.903.181 UI/ML Log 6,46	114.358 UI/ML Log 5,06	1	F4	TW 12	Falha
9	R155I; D168N*	1.637.037 UI/ML Log 6,21	70,367 UI/ML Log 4,85	1a	F4	Pós TT0	Recidiva
10	A40X	329.904 UI/ML Log 5,52	541.790 UI/ML Log 5,73	1a	F4	TW 12	Falha
12	A40T	324.036 UI/ML Log 5,51	53.368 UI/ML Log 4,73	1b	F3	Pós TT0	Recidiva
13	T40A; L80Q; S189T	239.000 UI/ML Log 5,38	69.809 UI/ML Log 4,84	1a	F4	Pós TT0	Recidiva
14	L21X; V36M; A156S*	1.399.281 UI/ML Log 6,15	104.526 UI/ML Log 5,02	1a	F4	TW 12	Falha
18	L153I*;V183M	2.227.583 UI/ML Log 6,37	106.544 UI/ML Log 5,03	1a	F4	TW 12	Falha

* Mutações selecionadas para as análises de dinâmica molecular.

Observou-se pela Tabela 6 algumas mutações de aminoácidos já descritas na literatura e que estão relacionadas à diminuição da sensibilidade ao Boceprevir. Essas trocas são: V36M, T54S, R155K e A156S. Dessas mutações, foi escolhida a troca A156S para as análises de dinâmica molecular. Essa escolha deve ao fato desse aminoácido estar muito próximos ao sítio de ligação do fármaco Boceprevir.

As demais mutações observadas ocorrem em aminoácidos distantes da tríade catalítica da proteína NS3, exceto pelas mutações D168N e L153I. Essas mutações são muito próximas aos sítios de ligação dos fármacos de cadeia linear.

4.2 Pressão de seleção e inferência filogenética.

Através da análise de pressão de seleção observaram-se quais regiões estão sofrendo uma possível pressão seletiva pela atuação do fármaco Boceprevir. Essa análise mostrou que existe pressão positiva nos aminoácidos vizinhos ao aminoácido A40. Nesse contexto, das mutações observadas, as trocas S42T, V36M, V35I são as mais próximas do aminoácido A40. Outro fato relevante é que os pacientes identificados como 10 e 12 possuem resposta virológica não sustentada, sendo que a mutação da proteína NS3 em ambos ocorre de forma singular na posição 40, indicando que essa região pode, de fato, estar associada à resistência ao inibidor do VHC.

A análise fenótipos extremos mostrou que as trocas nos aminoácidos T54 e S181 podem ser importantes para a resistência viral. Trata-se de um importante resultado, pois é congruente com resultados já reportados em outras pesquisas que mostram que as mutações T54A/S têm relação direta com a resistência ao tratamento com fármaco.

Já os resultados de inferência filogenética, apesar de apresentar alguns ramos bem suportados, não mostram um padrão consistente para classificação de grupos de indivíduos

com RVS e RVNS, conforme pode observado pelo cladograma apresentado na Figura 8. Tal resultado pode ser consequência do pequeno número amostral utilizado para essa análise.

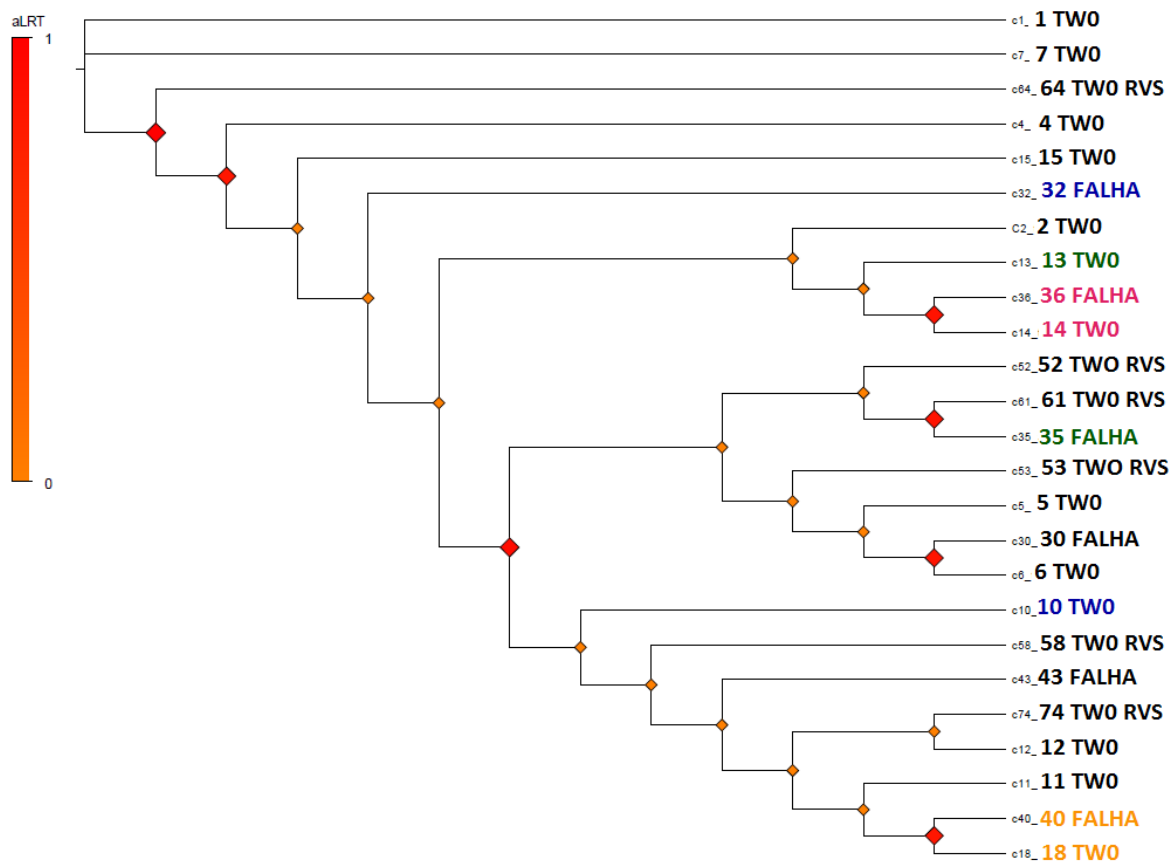


Figura 8. Cladograma da análise filogenética dos pacientes em tratamento com o fármaco Boceprevir. As informações dos pacientes com resposta virológica sustentada estão representadas com a cor preta, enquanto as informações dos pacientes com Resposta virológica não sustentada estão representadas com diferentes cores, sendo que informações de mesma cor indicam um mesmo paciente.

4.3 Dinâmica molecular

As simulações de dinâmica molecular foram realizadas inicialmente com a molécula selvagem do vírus para estabelecer um padrão de referência para a interação fármaco-proteína. Também foi selecionada a mutação A156S por ser reconhecidamente associada à resistência ao fármaco Boceprevir e, dessa maneira, poder ser utilizada como uma referência

da interação receptor/ligante em uma situação de resistência. Por final, foram selecionadas as mutações L153I e D168N por ainda não terem sido reportadas pela literatura como associadas à resistência viral. As figuras na sequência (Figuras 9 a 14) demonstram a região da tríade catalítica da proteína NS3 com as mutações selecionadas para as análises de dinâmica molecular. Essas mutações estão representadas em *sticks* para facilitar sua identificação. Também é apresentado nas figuras a estrutura do fármaco Boceprevir.

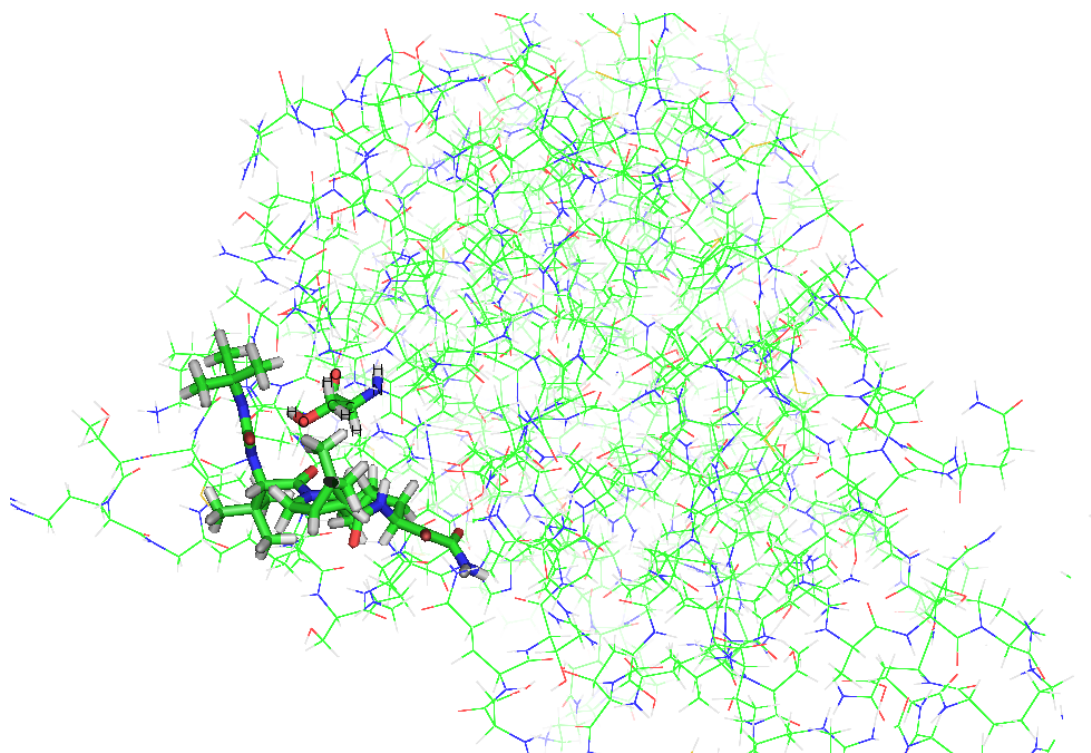


Figura 9. Mutação A156S acima do fármaco Boceprevir. Os aminoácidos mutados e o fármaco Boceprevir estão representados por *sticks*.

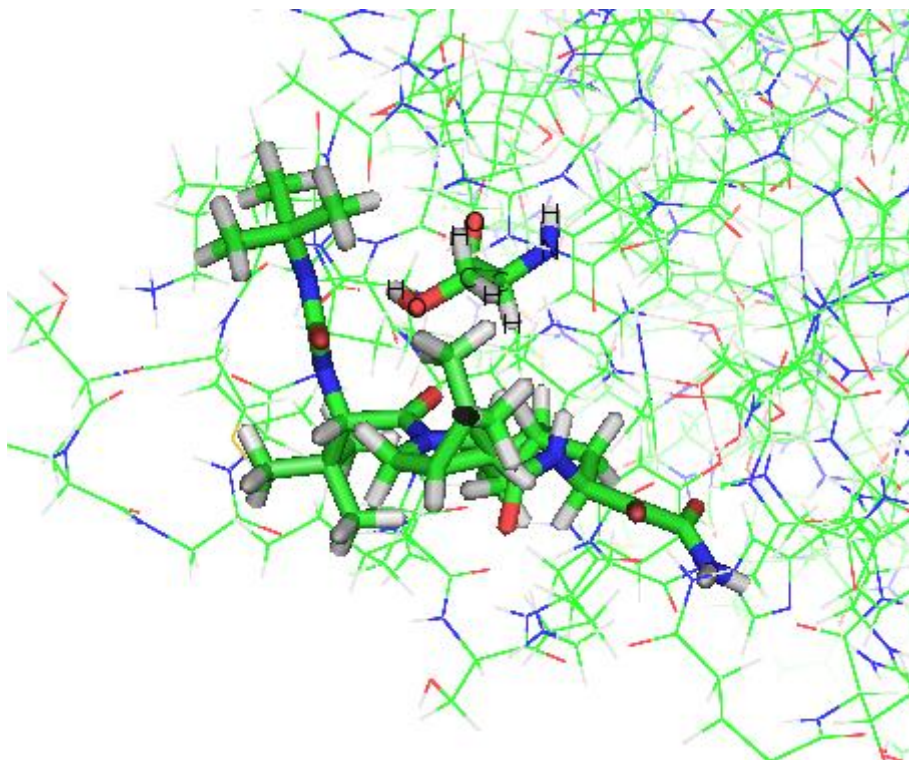


Figura 10. Mutação A156S acima do fármaco Boceprevir demonstrando seus átomos.

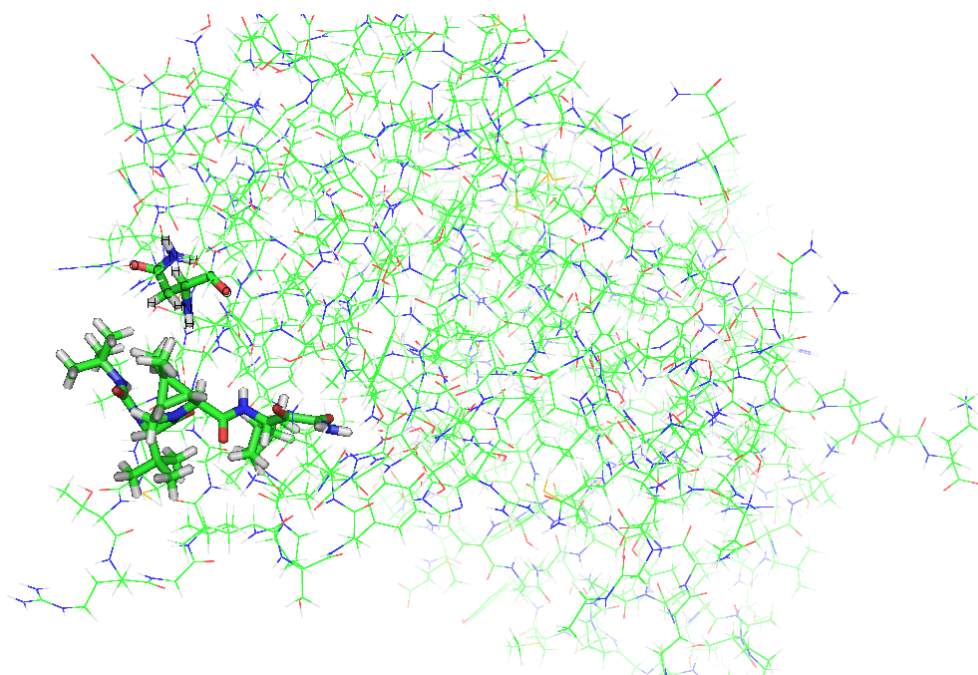


Figura 11. Mutação D168N acima do fármaco Boceprevir. Os aminoácidos mutados e o fármaco Boceprevir estão representados por *sticks*.

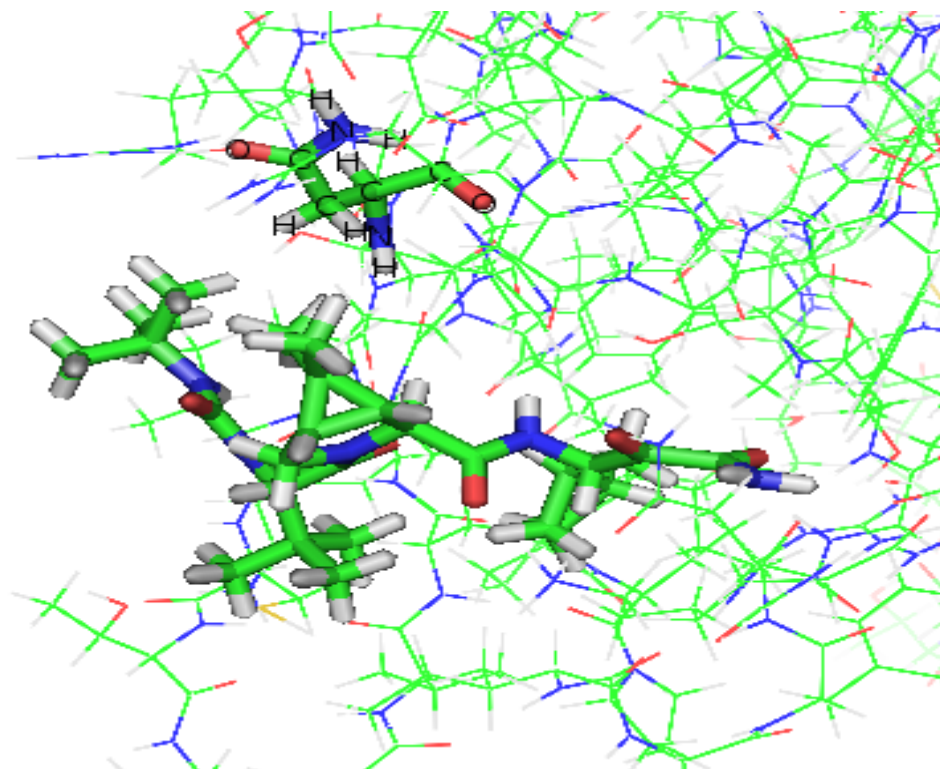


Figura 12. Mutação D168N acima do fármaco Boceprevir, com seus respectivos átomos.

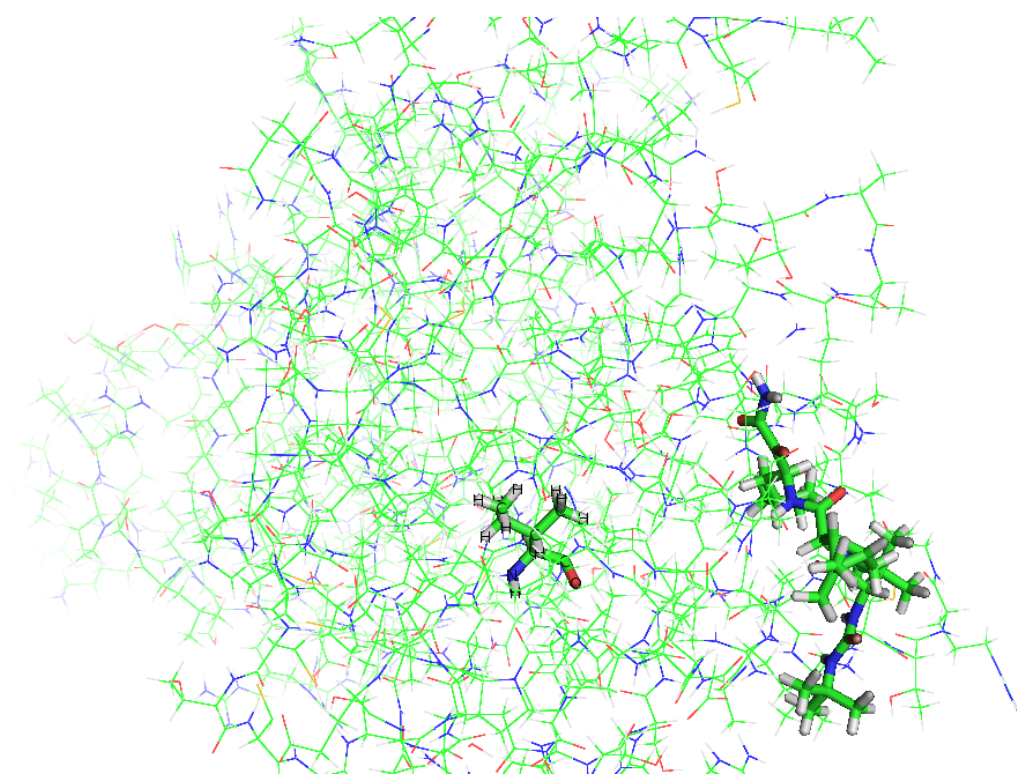


Figura 13. Mutação L153I juntamente com o Boceprevir. Os aminoácidos mutados e o fármaco Boceprevir estão representados por *sticks*.

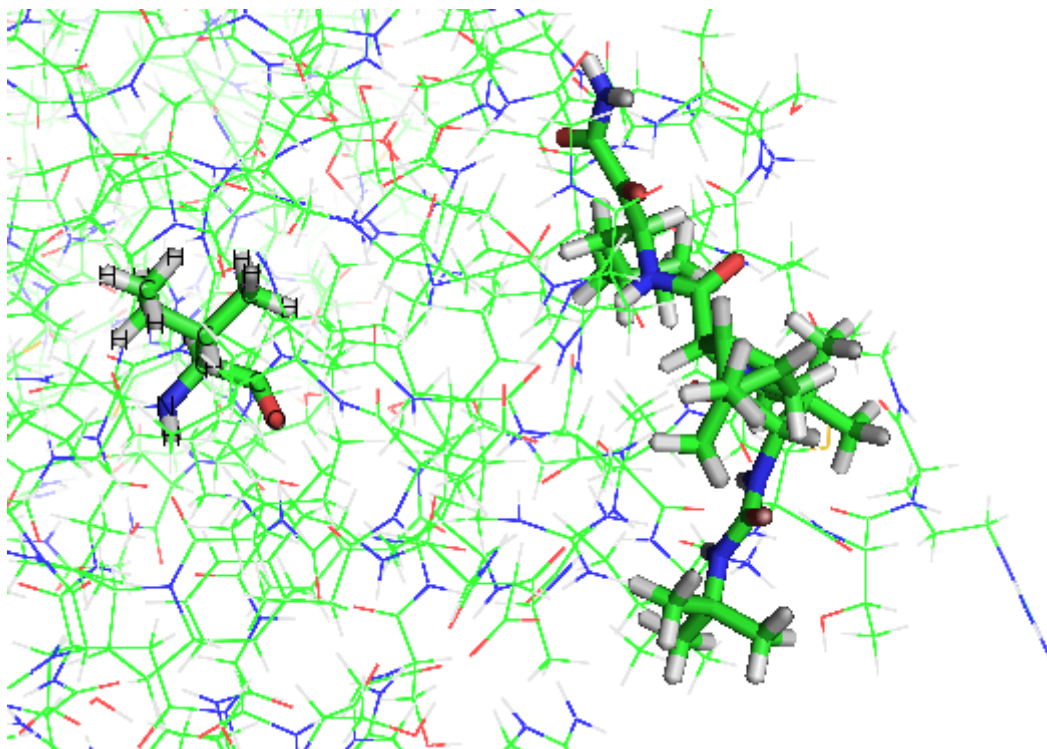


Figura 14. Mutação L153I com seus respectivos átomos ao lado do Boceprevir.

A Tabela 7 sintetiza as distâncias das ligações de hidrogênio que mantém o fármaco Boceprevir ligado à proteína NS3 em cinco situações distintas: 1) para a proteína NS3/4A selvagem obtida diretamente das informações da estrutura depositada no PDB de referência; 2) para a proteína NS3/4A selvagem após a realização da dinâmica molecular; 3) para a proteína NS3/4A com a mutação A156S (já descrita na literatura como correlacionada com resistência ao fármaco) após a realização da dinâmica molecular ; 4) para a proteína NS3/4A com a mutação D156N (observada nos resultados do presente trabalho) após a realização da dinâmica molecular e; 5) para a proteína NS3/4A com a mutação L153I (observada nos resultados do presente trabalho) após a realização da dinâmica molecular. As ligações de hidrogênio ocorrem entre átomos do fármaco Boceprevir e os aminoácidos glutamina 41, treonina 42, histidina 57, glicina 137, serina 139, arginina 155 e alanina 157 da proteína NS3 do HCV.

Tabela 7. Síntese das distâncias das ligações de hidrogênio consideradas pela literatura como relevantes para a estabilidade da ligação entre a proteína NS3 e o fármaco Boceprevir.

Resíduo NS3	Átomo/Grupo do resíduo	Átomo/Grupo do fármaco	Comprimento de ligação (Å)				
			PDB (DRX)	Dinâmica Molecular (100 ns)			
			NS3/4A Selvagem	NS3/4A Selvagem	A156S	D168N	L153I
Gln-41	O	NH	3,8	5,3	3,3	3,4	4,2
Thr-42	O	NH	2,8	3,8	3,0	3,2	3,3
His-57	NH	O	3,4	3,8	4,1*	4,0*	3,4
Gly-137	NH	O	2,8	2,9	2,8	3,2*	3,0*
Ser-139	NH	O	2,9	3,4	3,3	3,0	3,1
Arg-155	O	NH	3,7	4,0	3,8	3,7	4,2*
Ala-157	NH	O	3,0	3,5	2,7	3,3	2,9
Ala-157	O	NH	2,8	3,1	2,7	3,0	2,8
Ala-157	O	NH	2,9	3,1	3,5*	3,0	2,9

* Distâncias maiores que a forma selvagem.

Podem-se observar pelos resultados apresentados na Tabela 7 que apenas algumas distâncias de ligação de hidrogênio das proteínas mutadas foram maiores que os resultados obtidos para sua forma selvagem. Essas distâncias foram marcadas com (*) para sua melhor identificação. Contudo, realizando um Teste T para amostras pareadas, pode-se concluir que não há diferença estatística para as distâncias de ligação de hidrogênio para a proteína selvagem e para as proteínas mutadas após a realização da dinâmica molecular.

A Figura 15 apresenta uma ilustração das estruturas moleculares dos aminoácidos da proteína NS3/4A e do fármaco Boceprevir indicando as nove ligações de hidrogênio entre receptor e ligante essenciais para a manutenção da atividade inibitória do ligante. Essa estrutura foi obtida diretamente das informações do PDB depositado por Prongay et al. (2007), de código 2OC8.

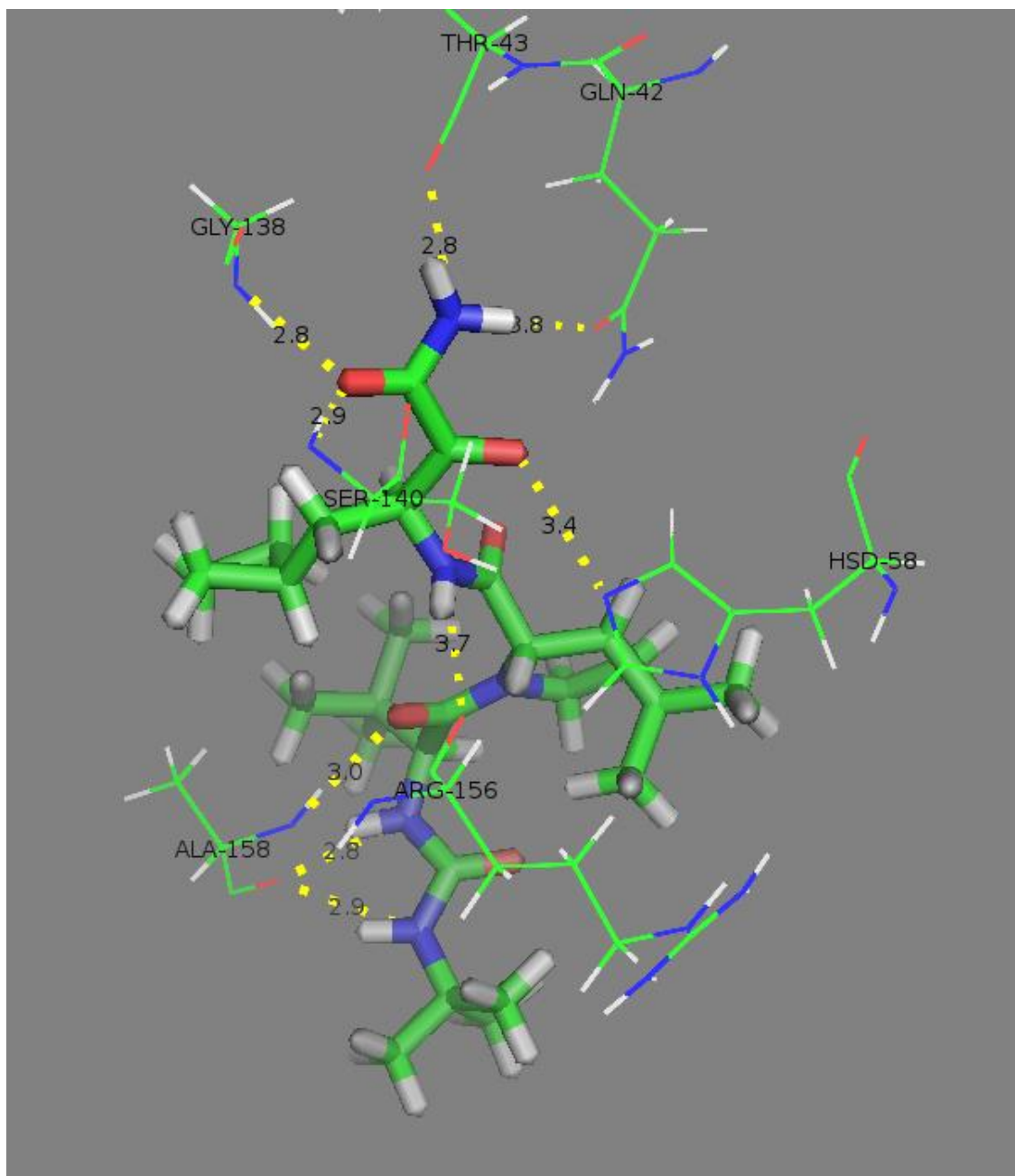


Figura 15. Representação dos aminoácidos da proteína NS3 do HCV selvagem (em bastão), do fármaco Boceprevir (em *stick*) e das interações de hidrogênio entre receptor e ligante (em linhas tracejadas amarelas). Todas as distâncias são medidas em Å.

As Figuras 16, 17, 18 e 19, na sequência, apresentam as distâncias de ligações de hidrogênio após as simulações de dinâmica molecular para a proteína NS3: selvagem, com a mutação A156S, com a mutação D156N e com a mutação L153I, respectivamente.

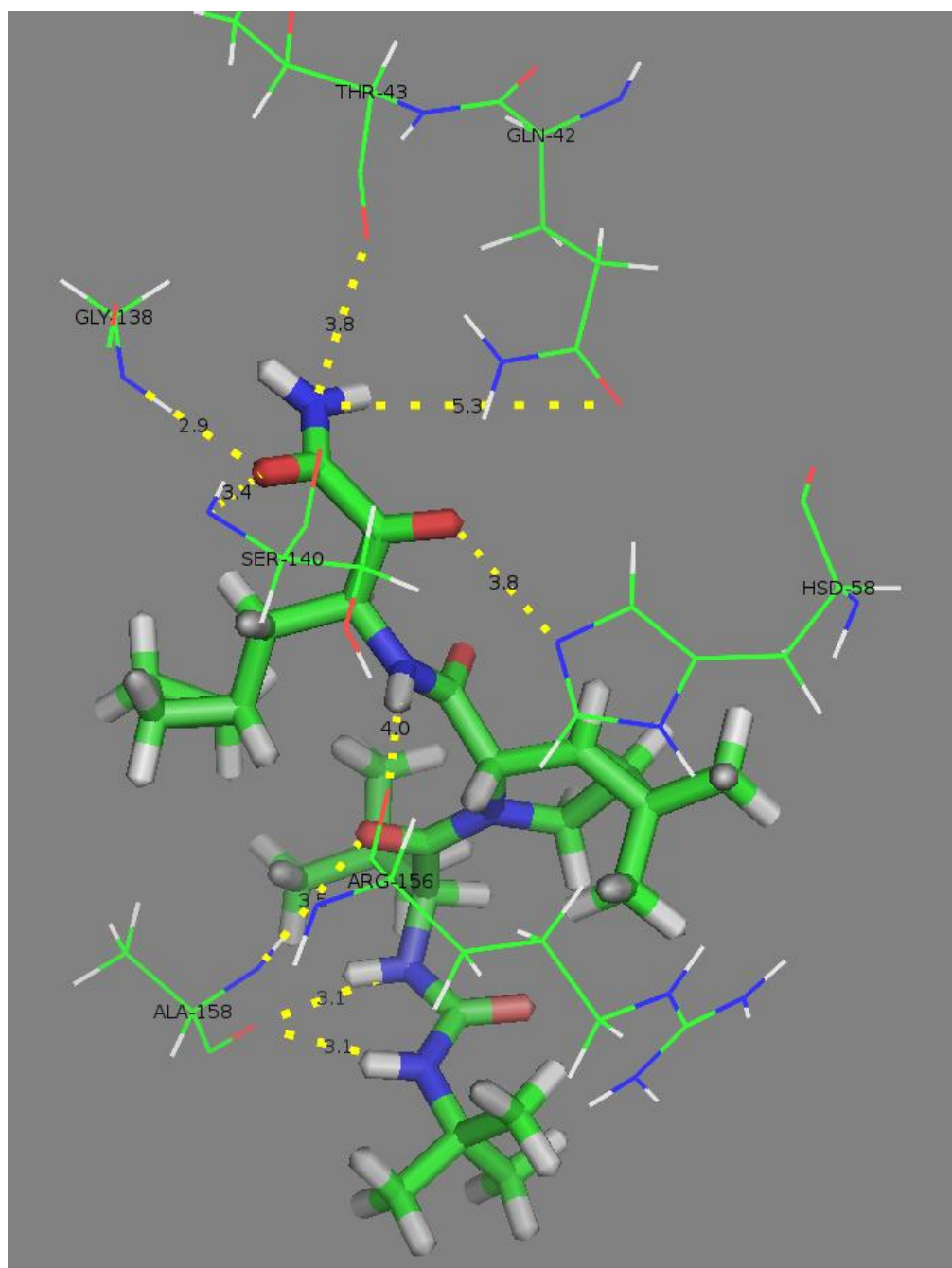


Figura 16. Representação dos aminoácidos da proteína NS3 do HCV selvagem após a dinâmica molecular (em bastão), do fármaco Boceprevir (em *stick*) e das interações de hidrogênio entre receptor e ligante (em linhas tracejadas amarelas). Todas as distâncias são medidas em Å.

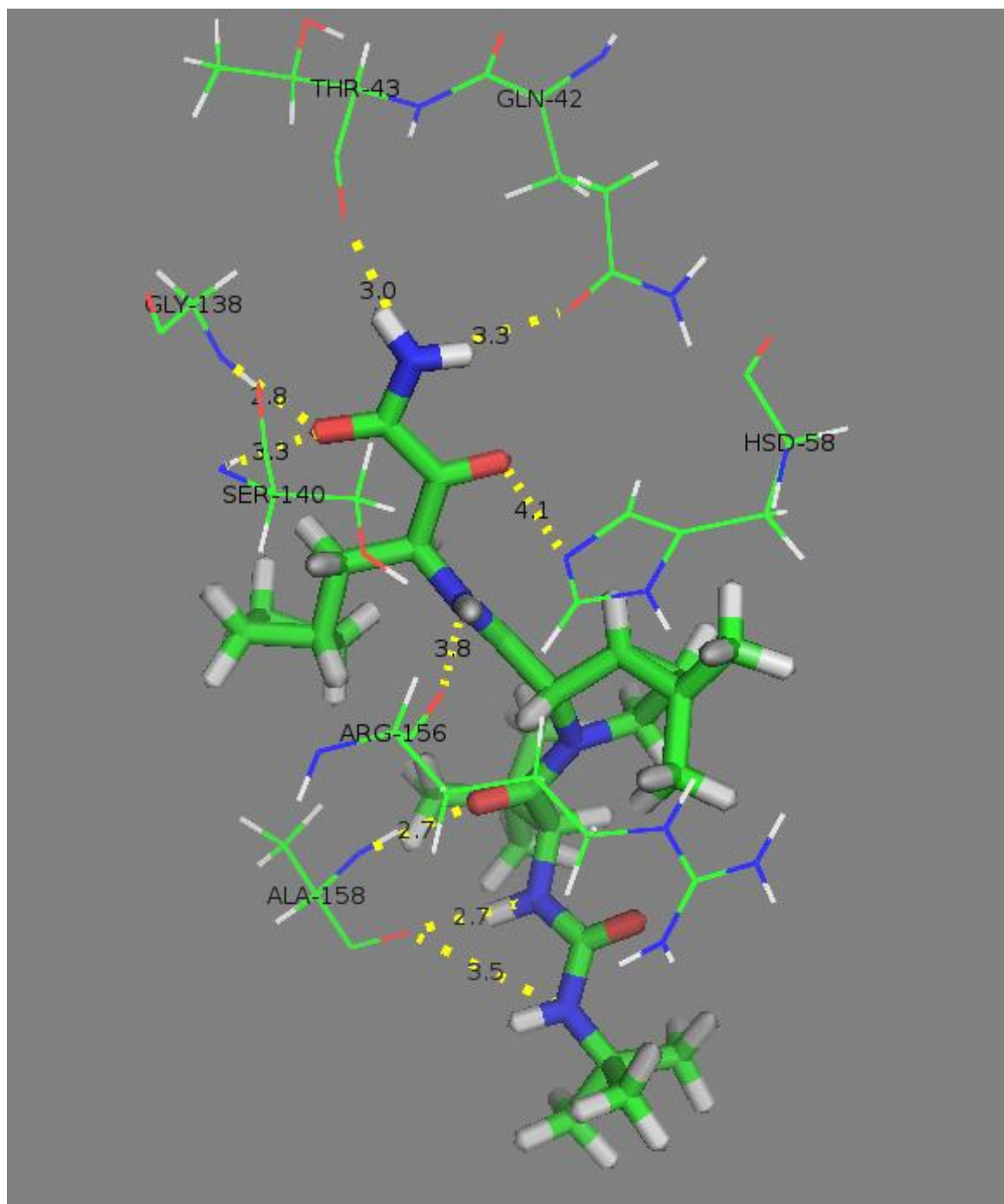


Figura 17. Representação dos aminoácidos da proteína NS3 do HCV com a mutação A156S após a dinâmica molecular (em bastão), do fármaco Boceprevir (em *stick*) e das interações de hidrogênio entre receptor e ligante (em linhas tracejadas amarelas). Todas as distâncias são medidas em Å.

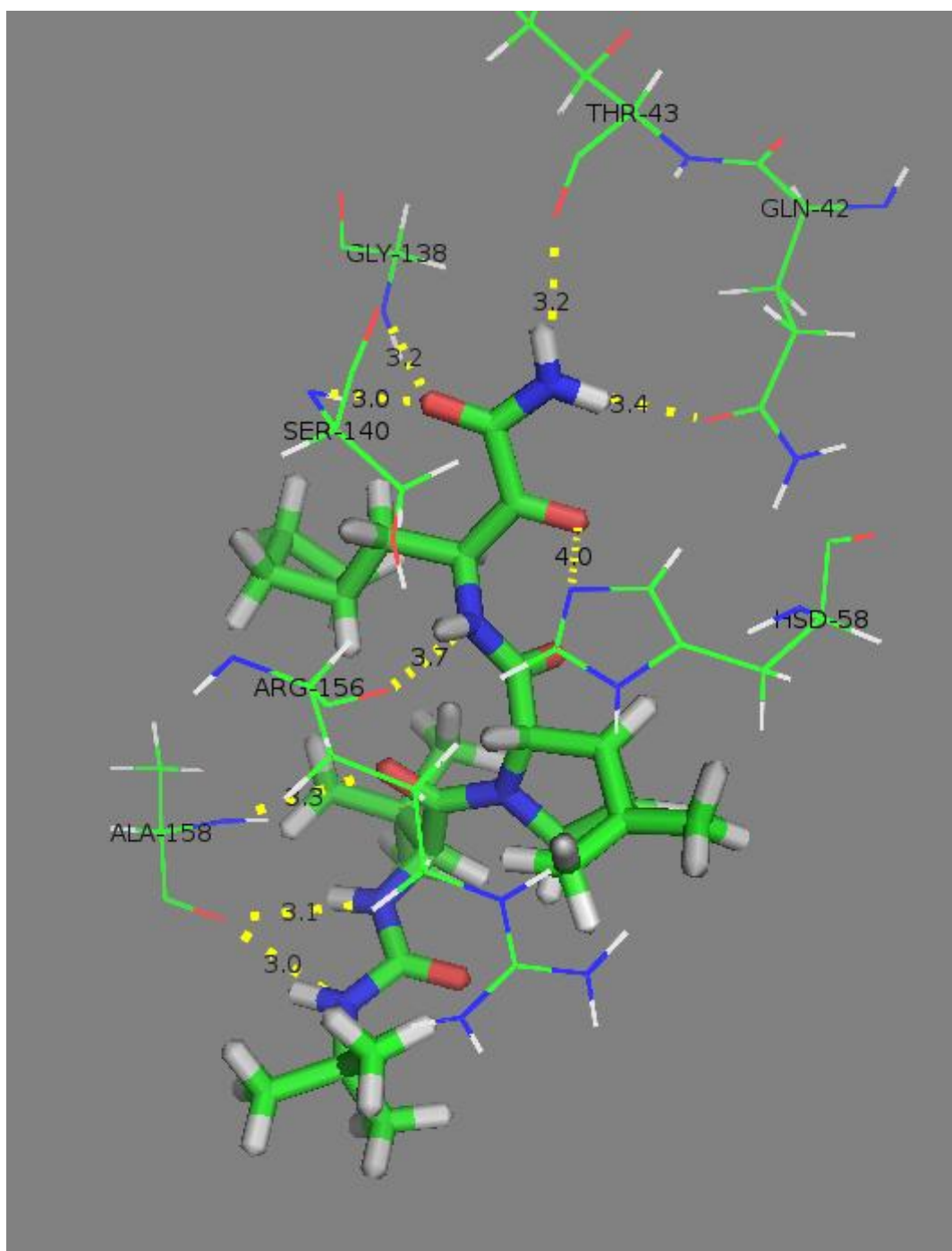


Figura 18. Representação dos aminoácidos da proteína NS3 do HCV com a mutação D168N após a dinâmica molecular (em bastão), do fármaco Boceprevir (em *stick*) e das interações de hidrogênio entre receptor e ligante (em linhas tracejadas amarelas). Todas as distâncias são medidas em Å.

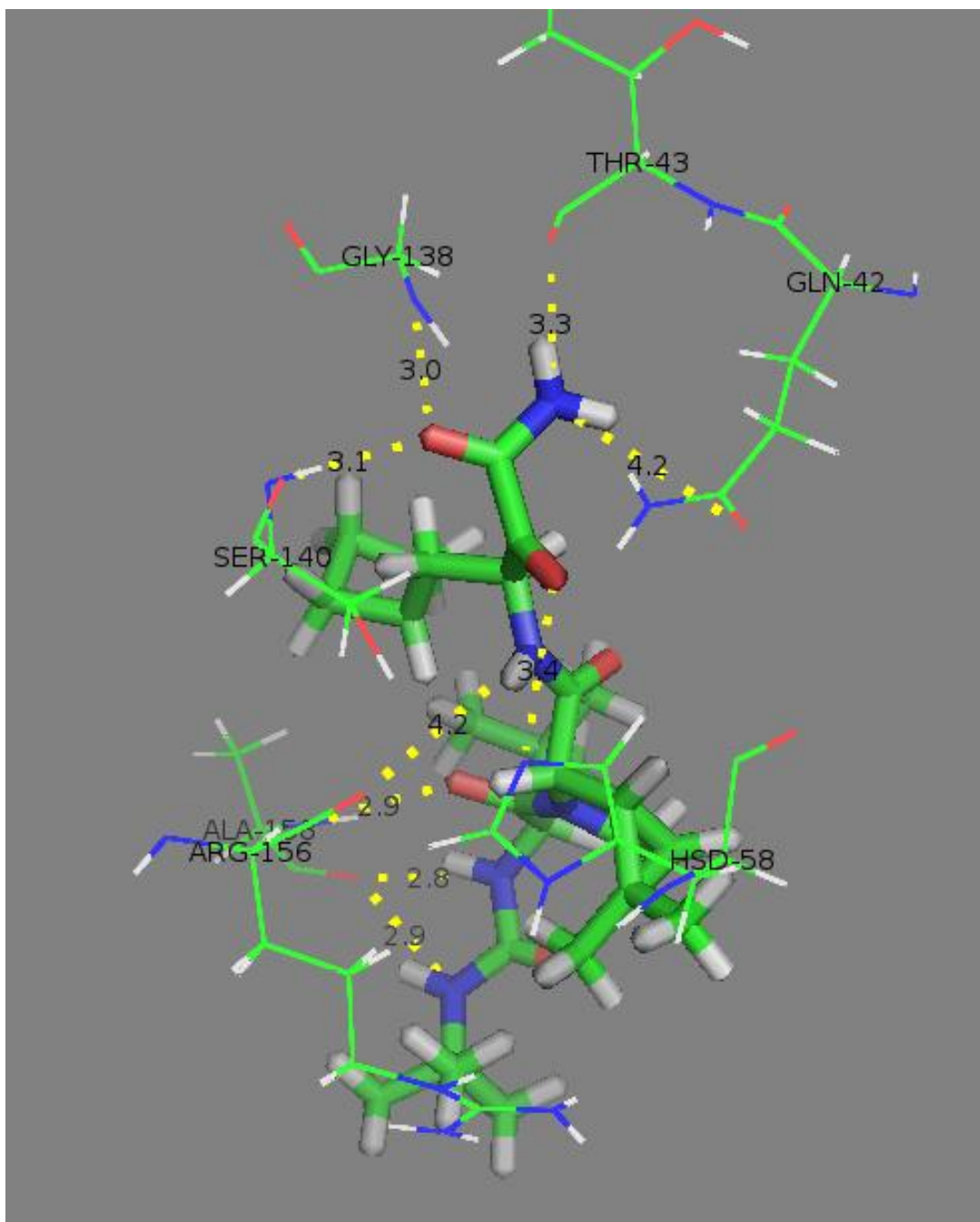


Figura 19. Representação dos aminoácidos da proteína NS3 do HCV com a mutação L153I após a dinâmica molecular (em bastão), do fármaco Boceprevir (em *stick*) e das interações de hidrogênio entre receptor e ligante (em linhas tracejadas amarelas). Todas as distâncias são medidas em Å.

Os resultados mostram claramente que as mutações pontuais observadas não provocam um distanciamento entre a molécula do fármaco e da proteína do vírus. Esse resultado sugere as análises descritas a seguir.

A primeira inferência que pode ser feita é que as mutações analisadas, de forma singular, podem não conferir à proteína do vírus resistência ao fármaco Boceprevir. Essa inferência é fortalecida quando se analisa a tabela de mutações de pacientes com RVNS, na qual observa-se que a única mutação singular que confere resistência ao inibidor é a que ocorre no aminoácido A40. Todos os demais pacientes com RVNS são portadores de vírus com uma associação de mutações. Esse resultado indica que estudos futuros de análise de dinâmica molecular devem ser realizados considerando essas associações de mutações.

Outro ponto que deve ser destacado é que as análises de dinâmica molecular foram realizadas com o fármaco já ligado à estrutura da proteína NS3, sendo que o mecanismo de resistência pode estar associado ao processo de acoplamento ligante receptor. Sendo assim, análises de *docking* molecular podem complementar e ajudar a elucidar os mecanismos de resistência viral.

Por final, seria importante também realizar uma análise sistemática dos modos de vibração (modos normais) da proteína do vírus isolada e mutada para verificar se as vibrações de baixa frequência e alta amplitude podem bloquear o acesso do fármaco ao receptor.

4.4 Índices de Fukui

A Figura 20 apresenta a estrutura otimizada da molécula do aminoácido S139 contendo o nome e número de cada elemento da estrutura. A numeração apresentada para os átomos é a mesma utilizada pelo PDB 2OC8. Foram adicionados átomos de hidrogênio aos terminais da molécula ligados à proteína NS3 para não afetar os cálculos de otimização molecular e de distribuição eletrônica.

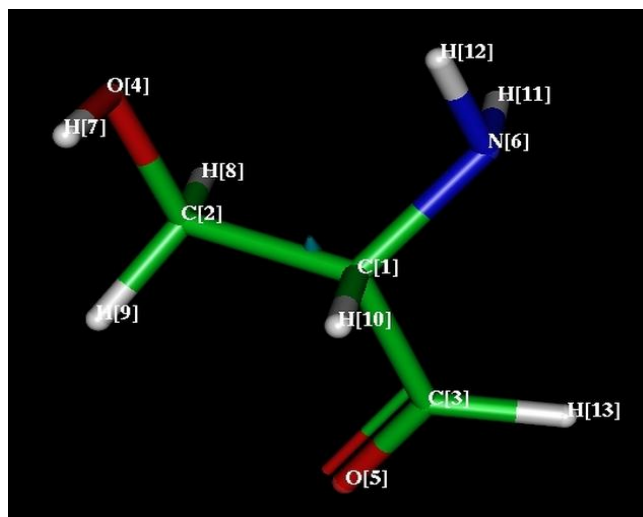


Figura 20. Estrutura otimizada da molécula do aminoácido S139 contendo o nome e número de cada elemento da estrutura.

A Figura 21 apresenta os resultados dos índices de Fukui para a molécula do aminoácido S139. Conforme exposto, f^- indica a susceptibilidade de cada átomo sofrer uma ataque eletrofílico, f^+ susceptibilidade a ataque nucleofílico e f^0 susceptibilidade a ataque radicalar.

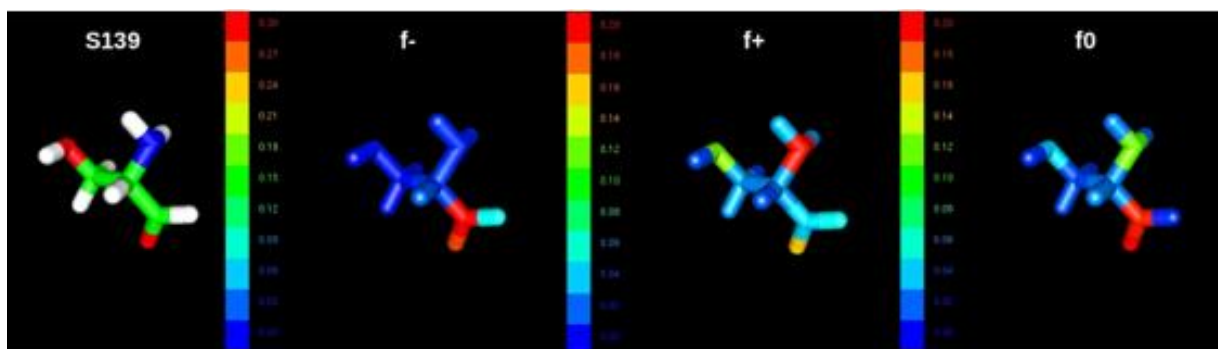


Figura 21. Resultados dos índices de Fukui para a molécula do aminoácido S139. A cor vermelha indica átomos mais susceptíveis à reação e a cor azul átomos menos susceptíveis à reação.

De acordo com a literatura, a reação covalente com fármaco Boceprevir ocorre sobre o átomo O4 da molécula do aminoácido S139 (HOWE; VENKATRAMAN, 2013; KWO et al., 2010; VENKATRAMAN, 2012). Essa reação ocorre por um ataque eletrofílico da molécula

do fármaco sobre aminoácido. Contudo, pela Figura 21, observa-se que o átomo O4 não é suscetível a ataque eletrofílico (f⁻). Na verdade, os cálculos dos índices de reatividade mostram que, exceto pelos átomos de carbono, o O4 é o átomo mais estável do aminoácido.

Pelo resultado, é evidente que o átomo mais suscetível a reagir covalentemente com a S139 é o O5, o qual faz uma dupla ligação com o átomo C3. Por tal fato, um mecanismo viável de ligação seria a transformação da ligação dupla entre os átomos C3 e O5 em uma ligação simples, deixando o átomo O5 livre para realizar uma ligação covalente com a molécula do fármaco Boceprevir. Contudo, esse mecanismo não é compatível com as estruturas apresentadas no PDB 2OC8, utilizado como referência.

Dessa maneira, é necessário que ocorra um processo de desprotonação sobre o átomo O4 da S139 para que a ligação covalente com a molécula do fármaco ocorra. Essa desprotonação pode ocorrer devido a um ataque nucleofílico de ânions do solvente sobre o átomo de hidrogênio ligado ao O4. Os resultados dos índices de reatividade mostram que, apesar de não ser o átomo mais suscetível a ataque nucleofílico (f⁺), há probabilidade de que ocorra a reação de desprotonação sobre o átomo O4. Isso porque caso o átomo N6 (o mais suscetível a ataque nucleofílico) seja desprotonado, ele necessariamente passa a fazer uma dupla ligação com o C1, que por sua vez também terá que ser desprotonado para estabilização da molécula, resultando em um mecanismo pouco viável de dupla desprotonação do aminoácido. Já um ataque nucleofílico sobre o O5, o qual também possui susceptibilidade para esse tipo de reação, não provocaria desprotonação da S139, mas apenas a adsorção de um íon do solvente sobre esse átomo, já que o O5 não está ligado diretamente a nenhum átomo de hidrogênio.

Considerando então a viabilidade da desprotonação do aminoácido S139, a Figura 22 apresenta então os índices de reatividade para o aminoácido S139 em seu estado de desprotonação simples sobre o átomo O4.

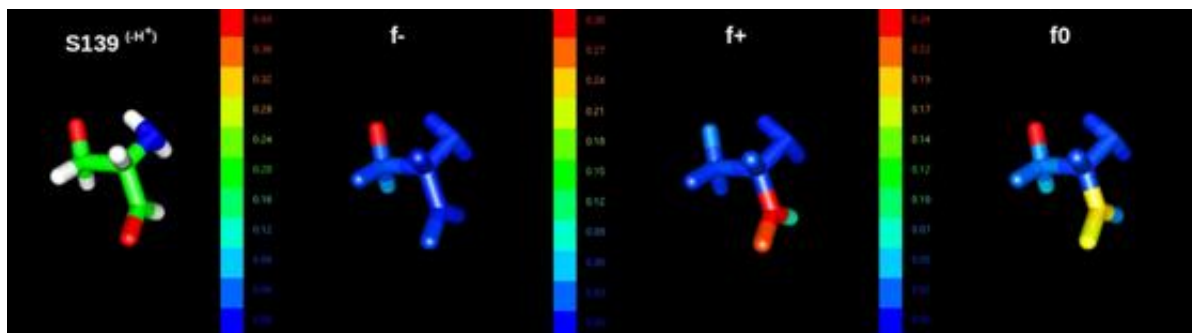


Figura 22. Resultados dos índices de Fukui para a molécula do aminoácido S139 desprotonado sobre o átomo O4.

A partir dos resultados apresentados na Figura 22 é possível observar que, no estado desprotonado, a S139 possui maior susceptibilidade de um ataque eletrofílico justamente sobre o átomo O4, conforme descrito pela literatura e indicando que esse pode ser um mecanismo viável para que a ligação covalente entre o ligante e o receptor ocorra. Essa informação pode ser confirmada analisando o HOMO das moléculas do aminoácido em seu estado fundamental e no estado desprotonado, conforme é apresentado na Figura 23.

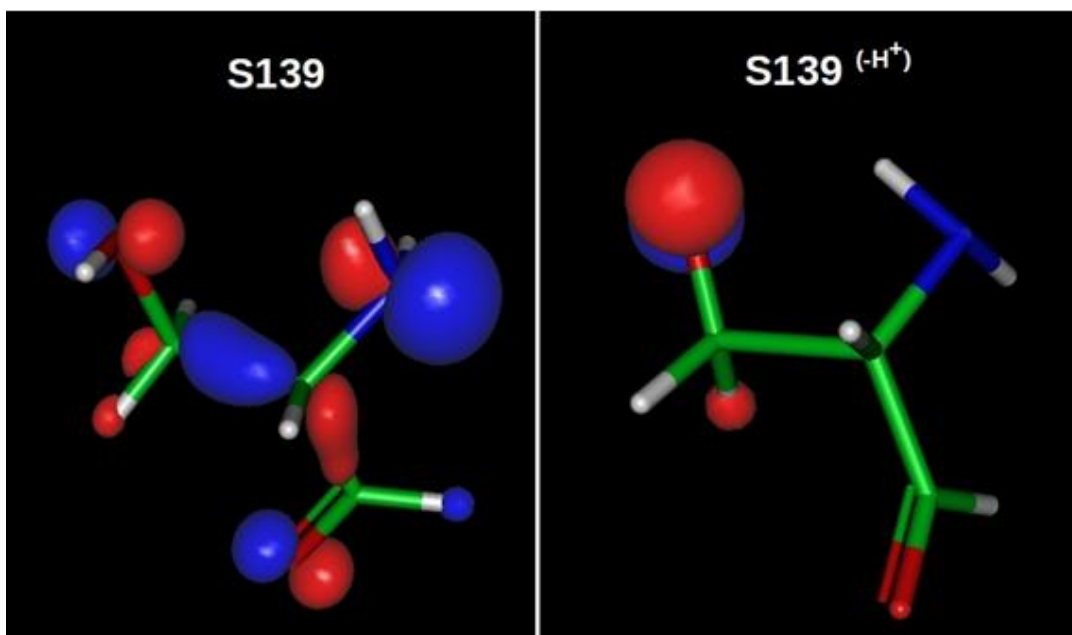


Figura 23. Representação do HOMO do aminoácido S139 e S139 desprotonado.

Como pode ser observado na Figura 23, no estado fundamental do aminoácido S139, o HOMO está compartilhado por diversos átomos da molécula. Contudo, no estado desprotonado, o HOMO está localizado quase que em sua totalidade sobre o O4, o que corrobora com os resultados dos índices de reatividade. Associando esses resultados, é possível confirmar a viabilidade da reação covalente ocorrer sobre o O4 do aminoácido S139, desde que a desprotonação desse aminoácido ocorra previamente.

Em continuidade da análise da viabilidade da reação covalente entre receptor e ligante ocorrer, são apresentados os resultados dos índices de Fukui para a molécula do fármaco Boceprevir. A Figura 24 apresenta a estrutura molecular do fármaco com o nome e o número de cada átomo da estrutura, seguida pela Figura 25, a qual apresenta os resultados dos índices de Fukui para a molécula do Boceprevir.

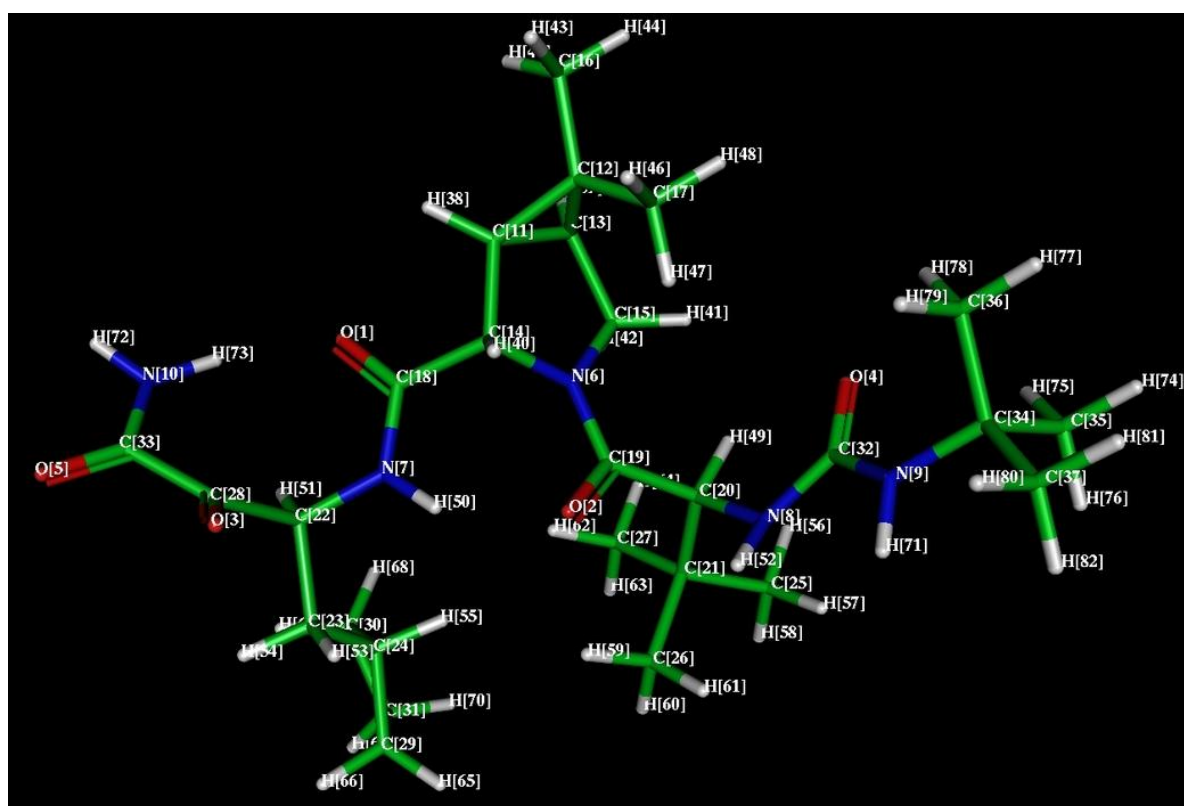


Figura 24. Estrutura otimizada da molécula fármaco Boceprevir contendo o nome e número de cada elemento da estrutura.

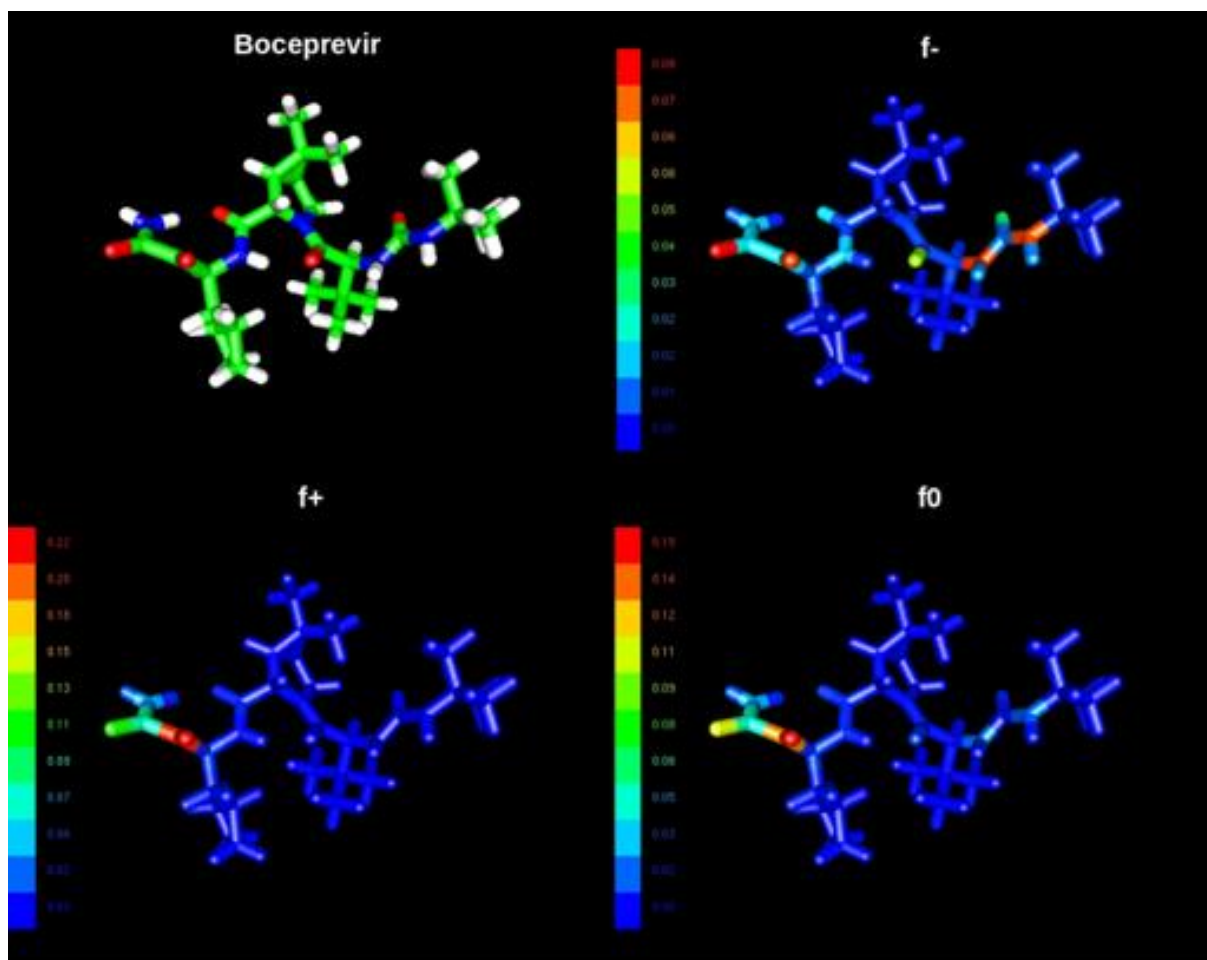


Figura 25. Resultados dos índices de Fukui para a molécula do fármaco Boceprevir.

Conforme já descrito pela literatura, o fármaco possui uma armadilha eletrofílica, ou seja, um sítio com grande afinidade para receber elétrons (HOWE; VENKATRAMAN, 2013). Esse sítio, o qual pode ser identificado nos resultados dos índices f^+ , está localizado sobre os átomos C28 e O3. Esse resultado é condizente com os dados disponíveis na literatura, os quais mostram que a ligação covalente ocorre entre o átomo C28 do fármaco e o O4 do aminoácido.

Ocorrendo a ligação, os resultados dos índices de reatividade apresentados na Figura 26 mostram que o átomo O3 do fármaco Boceprevir se torna extremamente reativo e suscetível a todos os tipos de ataques (nucleofílico, eletrofílico ou radicalar). Isso porque, como o C28 passa a ser ligado covalentemente ao O4 do aminoácido, a ligação dupla entre os

átomos C28 e O3 do fármaco passa a ser simples, restando uma valência livre para o átomo O3.

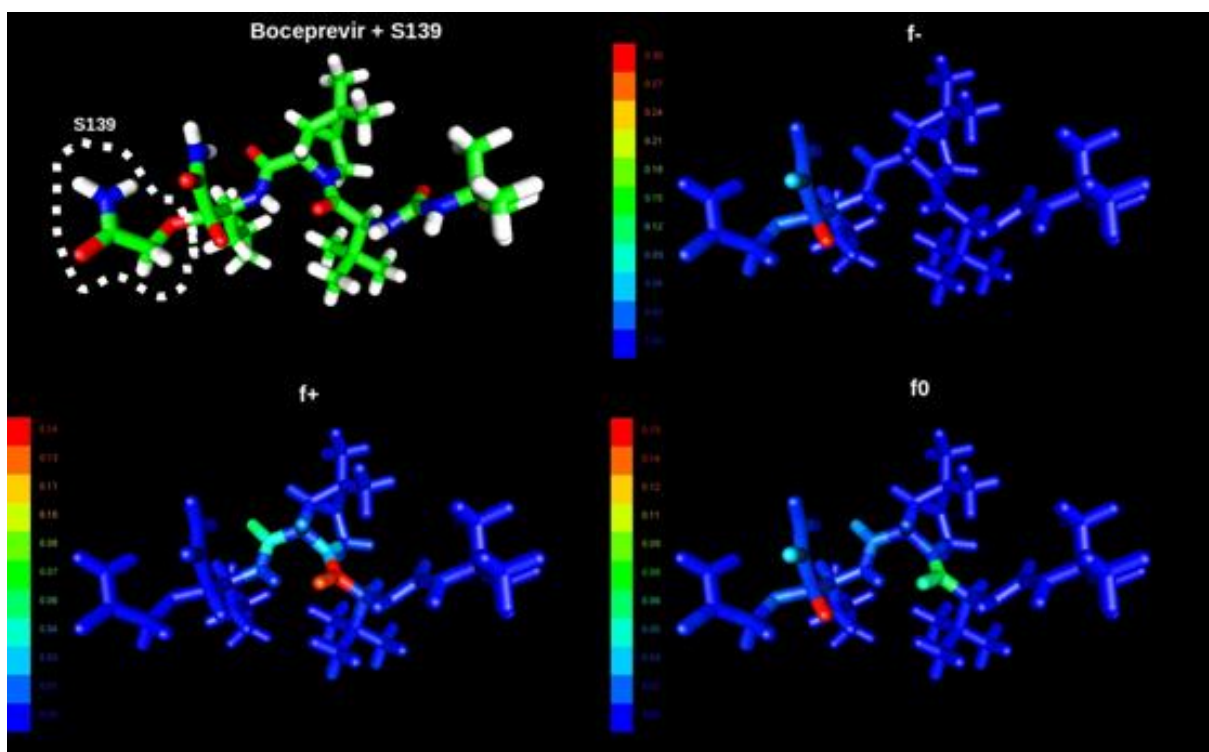


Figura 26. Resultados dos índices de Fukui para o composto formado pelo aminoácido S139 desprotonado e a molécula do fármaco Boceprevir.

Esse resultado mostra que o composto formado pelo fármaco e o aminoácido é bastante instável, podendo desencadear dois processos químicos diferentes, a saber.

Caso o O3 do fármaco absorva um ânion do meio, o composto e a ligação covalente formada entre receptor ligante é estabilizada. Contudo, caso isso não ocorra, o O4 da S139 pode absorver um cátion do meio solvente e a ligação covalente entre o fármaco e a proteína é desfeita. Essa afirmação se justifica também pelo resultado apresentado na Figura 27, a qual apresenta o HOMO do composto protonado. Pela figura é possível observar que o HOMO é compartilhado pelos átomos O3 do fármaco e O4 da S139.

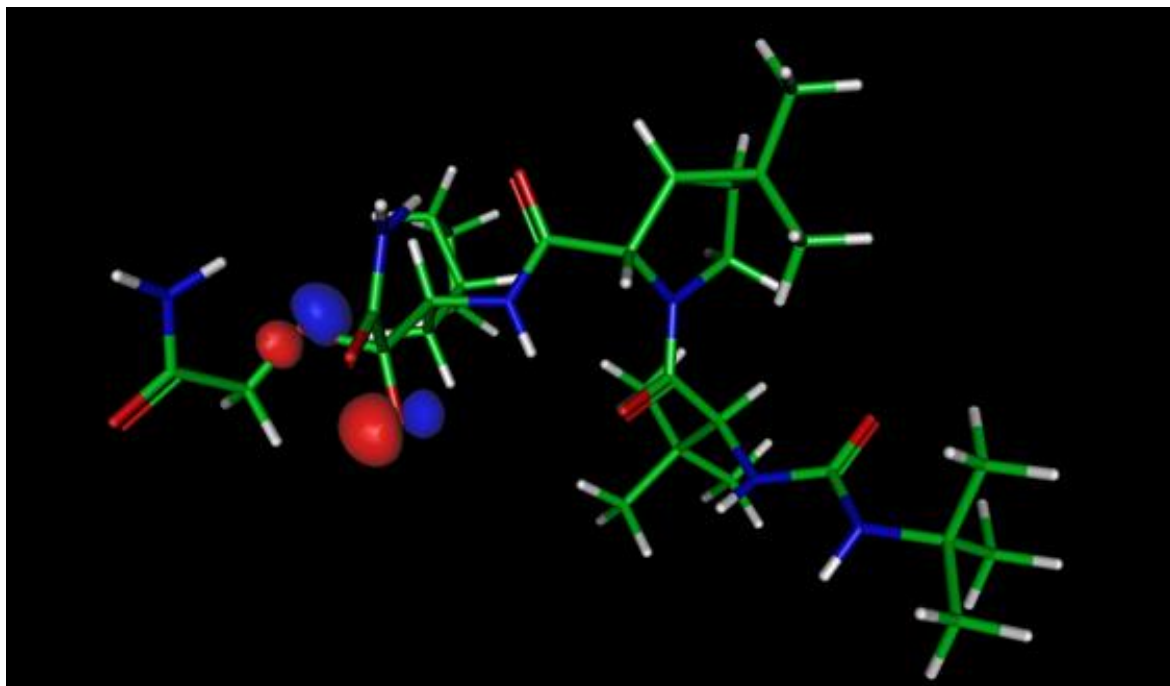


Figura 27. Representação do HOMO do composto formado pelo aminoácido S139 e o fármaco Boceprevir.

A Figura 28 apresenta a distribuição do HOMO para o composto protonado sobre o átomo O3 do fármaco Boceprevir. Pelo resultado é possível notar agora uma distribuição do orbital por diversos átomos da molécula, especialmente sobre os átomos de nitrogênio, conforme esperado.

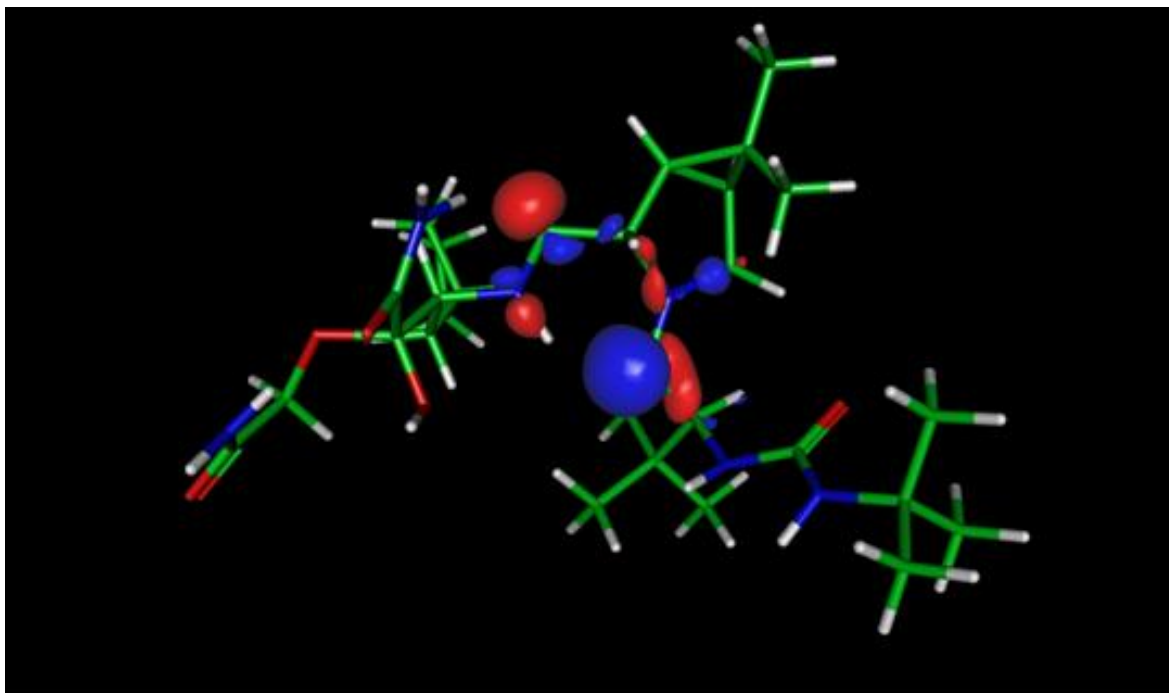


Figura 28. Representação do HOMO do composto formado pelo aminoácido S139 e o fármaco Boceprevir com protonação sobre o átomo O3.

Analisando os resultados de maneira geral, observa-se que a reação covalente pode ocorrer apenas se a desprotonação do aminoácido S139 ocorrer. Analisando o aminoácido isoladamente, nota-se que a probabilidade da desprotonação ocorrer não é elevada e, por consequência, a probabilidade da reação covalente entre receptor e ligante ocorrer também não é. Esse resultado pode ser associado com os mecanismos de resistência ao fármaco porque mutações na proteína NS3 podem alterar significativamente o pKa do aminoácido S139 e, por consequência, alterar a viabilidade de sua desprotonação e da reação covalente ocorrer.

Esse resultado também explica o fato de muitos artigos citarem que a ligação covalente formada entre o fármaco Boceprevir e a proteína NS3 é reversível. Essa reversibilidade se dá devido à probabilidade de desprotonação da S139 e, principalmente, pela necessidade de estabilização do composto ligante/receptor advinda da absorção de um cátion pelo átomo O3 do fármaco Boceprevir.

5. CONCLUSÃO

A partir do exposto neste trabalho pode-se concluir que foram encontradas mutações na proteína NS3 do HCV em pacientes analisados que coincidem com mutações já descritas na literatura, a saber: V36M, T54S, R155K e a A156S. Tais mutações podem conferir uma resistência da proteína ao tratamento com fármaco Boceprevir de maneira direta ou indireta, sendo que os aminoácidos multados podem ou não estar diretamente ligado ao Fármaco.

Foi observado no teste de pressão de seleção uma pressão ao redor do aminoácido A40. Isto indica que as mutações S42T, V36M e V35I, próximas ao referido aminoácido, podem estar associadas à resistência ao vírus. A análise de fenótipos extremos identificou os aminoácidos T54, S181 como extremos da população analisadas. Dessa forma, qualquer mutação em uma dessas posições deve ser essencial para a resistência do fármaco. Esse resultado é congruente com a mutação T54A/S reportada pela literatura por estar associada à resistência ao fármaco.

A literatura mostra que nove ligações químicas de hidrogênio entre o fármaco Boceprevir e a região NS3 do vírus que são consideradas essenciais para o mecanismo de inibição. Contudo, os resultados obtidos das simulações de dinâmica molecular mostram que, após a evolução de 100ns, não há diferença estatística entre a distância de tais ligações quando comparadas entre a forma selvagem do vírus e as proteínas mutadas de forma singular. Sendo assim, o resultado indica que há resistência ao medicamento pode ser causada por uma associação dessas mutações, exceto pela mutação singular do aminoácido A40 conforme a tabela 2 apresentada para pacientes com RVNS.

Alem disso é importante destacar que as simulações de dinâmica molecular foram realizadas com o fármaco já ligado a estrutura da proteína. Contudo, o mecanismo de resistência do vírus pode ser associado a outros fatores não analisados no presente trabalho, como a dinâmica de ligação entre receptor e ligante (*docking*) e também aos modos de

vibração da proteína (modos normais) que podem inviabilizar o acesso do fármaco ao sítio catalítico da proteína.

Os resultados dos índices de reatividade mostraram que desprotonação da S139 pelo meio solvente é necessária para sua ligação covalente com o Boceprevir. Isso porque os CAFIs apresentaram uma maior reatividade no átomo da ligação S139 quando esta se apresenta desprotonada, podendo confirmar a teoria de uma ligação covalente. Porém tal reação se apresenta de forma reversível, pois a perda do íon H^+ para o meio, torna a S139 desprotonada ocorrendo à quebra ligação da dupla entre este oxigênio e o carbono do fármaco e assim a ligação entre o O4 da S139 e o C28 do Boceprevir, contudo uma mudança de pH do meio facilitaria essa reação ou a tornaria reversível como relatado.

Os resultados obtidos de forma geral mostram que não existe um mecanismo único de ligação entre o fármaco e a proteína NS3, mas sim que a resistência pode ser causada pela composição de vários fatores, que quando associados inibem a resposta virológica sustentadas.

Pesquisas mais aprofundada podem surgir a partir desse trabalho como forma de tentar complementar tais resultado obtidos, incluindo um número amostral maior para elucidação das dúvidas remanescentes e também pacientes em tratamento com o fármaco Telaprevir, ao qual apresenta características inibitórias similares ao Boceprevir.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASCAL, F.; ZARDOYA, R.; POSADA, D. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. **Bioinformatics**, v. 21, n. 9, p. 2104–2105, 1 maio 2005.

ALENCASTRO, R.B, A., M. . Modelagem Molecular : Uma ferramenta para o planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal. p. 11, 1997.

BATAGIN, A, L., F. C. **Estrutura eletrônica do polímero orgânico conjugado MEH-PPV em solução sob radiação ionizante**. Bauru: Universidade Estadual Paulista UNESP, 2009.

BAZINET, A. L.; ZWICKL, D. J.; CUMMINGS, M. P. A Gateway for Phylogenetic Analysis Powered by Grid Computing Featuring GARLI 2.0. **Systematic Biology**, v. 63, n. 5, p. 812–818, 1 set. 2014.

Boceprevir | **C27H45N5O5** | **ChemSpider**. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.8499830.html>>. Acesso em: 13 fev. 2017.

BROOKS, B. R. et al. CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. **Journal of computational chemistry**, v. 30, n. 10, p. 1545–1614, 30 jul. 2009.

CAMPIOTTO, S. et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 1, p. 41–49, jan. 2005.

CESARINO, I. et al. Electrochemical oxidation of sulfamethazine on a glassy carbon electrode modified with graphene and gold nanoparticles. **Electrochimica Acta**, v. 192, p. 8–14, 20 fev. 2016.

DRUMMOND, A. J. et al. Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, n. 8, p. 1969–1973, 1 ago. 2012.

EDGAR R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.

FOLOPPE, N. et al. Structure, dynamics and electrostatics of the active site of glutaredoxin 3 from Escherichia coli: comparison with functionally related proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 310, n. 2, p. 449–470, 6 jul. 2001.

GUINDON S, GASCUEL O. **A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood**. Disponível em: <http://www.atgc-montpellier.fr/download/papers/phyml_2003.pdf>. Acesso em: 8 fev. 2017.

HALFON, P.; LOCARNINI, S. Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors. **Journal of Hepatology**, v. 55, n. 1, p. 192–206, jul. 2011.

HOWE, A. Y. M.; VENKATRAMAN, S. The Discovery and Development of Boceprevir: A Novel, First-generation Inhibitor of the Hepatitis C Virus NS3/4A Serine Protease. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v. 1, n. 1, p. 22–32, set. 2013.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–38, fev. 1996.

KWO, P. Y. et al. Efficacy of boceprevir, an NS3 protease inhibitor, in combination with peginterferon alfa-2b and ribavirin in treatment-naïve patients with genotype 1 hepatitis C infection (SPRINT-1): an open-label, randomised, multicentre phase 2 trial. **The Lancet**, v. 376, n. 9742, p. 705–716, 3 set. 2010.

LEMEY, P. **The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing**. [s.l.] Cambridge University Press, 2009.

LOVE, R. A. et al. The Crystal Structure of Hepatitis C Virus NS3 Proteinase Reveals a Trypsin-like Fold and a Structural Zinc Binding Site. **Cell**, v. 87, n. 2, p. 331–342, 18 out. 1996.

LYRA, A. C.; FAN, X.; DI BISCEGLIE, A. M. Molecular biology and clinical implication of hepatitis C virus. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 5, p. 691–695, maio 2004.

MELLO, I.M.V.G.C. **Estudo de mutações primárias para inibidores de protease e polimerase para o vírus da Hepatite C em portadores crônicos da cidade de São Paulo. Dados não publicados.**, [s.d.].

PEDERNEIRAS, L.C. **CONCEITOS BÁSICOS DE FILOGENIA**, 2011. Disponível em: <http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Conceitos_Basicos_%20de_%20Filogenia_Leandro_Cardoso_Pederneiras.pdf>. Acesso em: 3 jan. 2017

PENIN, F. et al. Structural biology of hepatitis C virus. **Hepatology**, v. 39, n. 1, p. 5–19, 1 jan. 2004a.

PENIN, F. et al. Structural biology of hepatitis C virus. **Hepatology**, v. 39, n. 1, p. 5–19, 1 jan. 2004b.

PRONGAY, A. J. et al. Discovery of the HCV NS3/4A protease inhibitor (1R,5S)-N-[3-amino-1-(cyclobutylmethyl)-2,3-dioxopropyl]-3-[2(S)-[[[(1,1-dimethylethyl)amino]carbonyl]amino]-3,3-dimethyl-1-oxobutyl]-6,6-dimethyl-3-azabicyclo[3.1.0]hexan-2(S)-carboxamide (Sch 503034) II. Key steps in structure-based optimization. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 10, p. 2310–2318, 17 maio 2007.

QUEIRÓZ, A. T. L. DE. **Seleção natural no vírus da hepatite C: influência do sistema imune na resposta ao tratamento**. text—[s.l.] Universidade de São Paulo, 3 nov. 2010.

SCHMIDT, M. W. et al. General atomic and molecular electronic structure system. **Journal of Computational Chemistry**, v. 14, n. 11, p. 1347–1363, 1 nov. 1993.

SHIRYAEV, S. A.; CHELTISOV, A. V.; STRONGIN, A. Y. Probing of Exosites Leads to Novel Inhibitor Scaffolds of HCV NS3/4A Proteinase. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2 jul. 2012.

SIMMONDS, P. et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 42, n. 4, p. 962–973, out. 2005.

VANOMMESLAEGHE, K. et al. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 4, p. 671–690, mar. 2010.

VENKATRAMAN, S. Discovery of boceprevir, a direct-acting NS3/4A protease inhibitor for treatment of chronic hepatitis C infections. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 33, n. 5, p. 289–294, maio 2012.

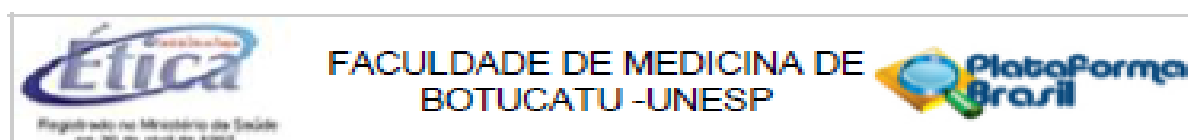
XIA, X. DAMBE5: A Comprehensive Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 7, p. 1720–1728, 1 jul. 2013.

ZEIN, N. N. Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 2, p. 223–235, abr. 2000.

ZERMINIAN, L. B. **Variabilidade da protease NS3 do Vírus da Hepatite C e avaliação das mutações de resistência em pacientes não tratados com inibidores de protease.** [s.l: s.n.].

7. ANEXOS

7.1 Comitê de Ética



COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação das mutações, conformações e sítios ativos da protease do vírus da hepatite C em pacientes em tratamento com Boceprevir e Telaprevir

Pesquisador: Heloisa de Carvalho

Versão: 1

CAAE: 52932016.8.0000.5411

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 006370/2016

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Endereço: Chácara Bulgnoli, s/n
 Bairro: Rubião Junior CEP: 18.618-670
 UF: SP Município: BOTUCATU
 Telefone: (14)3880-1608 E-mail: ospellup@fmb.unesp.br

7.2 Mudança de Título



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



MUDANÇA DE TÍTULO EM PROJETO DE PESQUISA*

Objetivo Acadêmico: Dissertação de Mestrado

Título constante no parecer inicial de aprovação:

Avaliação das mutações, conformações e sítios ativos da protease do vírus da hepatite C em pacientes em tratamento com Boceprevir e Telaprevir.

Título final:

Avaliação da resistência da protease do vírus da hepatite C em pacientes em tratamento com o fármaco Boceprevir.

Data da reunião do CEP que aprovou o parecer inicial: 03/02/2016

Declaramos que o trabalho não sofreu alterações nos objetivos e/ou conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEP.

Prof. Dr. Rafael Piana Simões
Deplo. de Bioprocessos e Biotecnologia
FCA - UNESP/Botucatu

Heloisa de Carvalho Sampaio

* Projetos submetidos via Plataforma Brasil: preencher o formulário, digitalizar e postar no sistema plataforma brasil (vide instruções contidas no Of. 06/2014-CEP); a seguir, imprimir "print screen" da tela comprovando o aceite pelo CEP da solicitação de alteração;

* Projetos submetidos anteriormente a Plataforma Brasil: preencher o formulário em duas vias e protocolar no CEP que emitiu o Parecer inicial de aprovação

15:51 12/26/01/2017 000000 COMITE DE ETICA EM PESQUISA FMB - UNESP