

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

LENIS MEDEIROS DE FREITAS

**AVALIAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO DA
ESTAVUDINA ATRAVÉS DO EMPREGO DA
BIOCONVERSÃO E DA MODELAGEM MOLECULAR
DO CITOCROMO P-450 CYP3A4**

Goiânia
2009

LENIS MEDEIROS DE FREITAS

**AVALIAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO DA
ESTAVUDINA ATRAVÉS DO EMPREGO DA
BIOCONVERSÃO E DA MODELAGEM MOLECULAR
DO CITOCROMO P-450 CYP3A4**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Valéria de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. José Ricardo Sabino

Goiânia

2009

4.1.3.1.1	Grupo 1.....	67
4.1.3.1.2	Grupo 2.....	77
4.1.3.2	Incubação em escala semi-preparativa.....	82
4.1.3.2.1	<i>Cunninghamella elegans</i>	82
4.1.3.2.1.1	1º Ensaio: influência da concentração do substrato.....	82
4.1.3.2.1.2	2º Ensaio: influência da temperatura.....	83
4.1.3.2.1.3	3º Ensaio: Influência da agitação.....	84
4.1.4	Purificação e identificação dos derivados.....	86
4.1.4.1	LaBioCon 136.....	93
4.2	Estudo do metabolismo animal.....	98
4.3	Modelagem Molecular.....	101
4.3.1	Preparo da proteína.....	101
4.3.2	Análise do <i>Root Mean Square Deviation</i> (RMSD) ou Desvio Médio Quadrático.....	102
4.3.3	Análise da entrada da estavudina por diferentes canais de acesso.....	104
4.3.4	Análise das interações entre estavudina e CYP3A4.....	108
5	CONCLUSÕES.....	125
6	PERSPECTIVAS.....	127
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Bioconversão e biotransformação de fármacos

Desde que Smith e Rosazza (Smith & Rosazza, 1975) introduziram o conceito de “Modelos Microbianos do Metabolismo Mamífero de Fármacos”, na década de 1970, diversos estudos têm demonstrado a relevância do emprego de organismos eucarióticos e bactérias pertencentes aos Actinomicetos na elucidação do metabolismo de diversos compostos, dentre eles os fármacos. Sistemas menos complexos que os utilizados nos estudos tradicionais de biotransformação, como os fungos filamentosos, têm sido utilizados como catalisadores de reações importantes encontradas em mamíferos (Griffiths et al., 1991; Holland, 1991; Moussa et al., 1997; Azerad, 1999).

Antes da aprovação de uma nova substância ativa para o uso em humanos, diversos estudos devem ser realizados a fim de comprovarem sua eficácia e segurança. Esta preocupação se iniciou a partir dos anos 1960, com o advento da talidomida, quando milhares de crianças foram acometidas por malformações provocadas por este sedativo e antiinflamatório, prescrito como antiemético a gestantes, aumentando a exigência durante o processo de desenvolvimento de fármacos. Um estudo posterior demonstrou que a talidomida era comercializada sob a forma de mistura racêmica, sendo o enantiômero de orientação absoluta (*R*) o eutômero, enquanto o enantiômero (*S*) estava envolvido com os efeitos teratogênicos (distômero) (Lima, Fraga & Barreiro, 2001).

Outro fator que tem sido observado antes da aprovação de um fármaco é o seu destino metabólico no organismo. Apesar de as reações de biotransformação geralmente conduzirem à sua detoxificação, algumas vezes podem ser formadas substâncias mais ativas que o composto original, ou mesmo tóxicas. As reações de biotransformação em mamíferos ocorrem principalmente em células do fígado e rins, e são responsáveis pela transformação dos fármacos em substâncias mais hidrofílicas, facilitando sua eliminação. Este processo envolve dois tipos de reação, sendo classificadas como reações de Fase I ou funcionalização, e reações de Fase II ou conjugação. As reações de Fase I são representadas por reações de oxidação, redução e hidrólise, enquanto as reações de Fase II são responsáveis pela conjugação dos fármacos com substâncias endógenas, como ácido glicurônico,

sulfato, glicina, acetato, grupos metila e ácidos inorgânicos, contribuindo para o aumento de sua hidrofilicidade e, conseqüentemente, eliminação (Azerad, 1999).

Durante as reações de Fase I, o aumento da hidrofilicidade dos fármacos ocorre devido à introdução de grupamentos polares, ou através da modificação de grupamentos já existentes na molécula, como ocorre durante as reações de hidrólise. A oxidação é a reação de Fase I mais importante, e é catalisada por oxidases de função mista ou por monoxigenases, as quais são encontradas principalmente no retículo endoplasmático liso do fígado (microsoma hepático). Exemplos de enzimas que catalisam reações de oxidação envolvem a família do citocromo P-450 (CYP450), as flavina monoxigenases (FMO), a monoamino oxidase (MAO), a álcool desidrogenase e a xantina oxidase. As reações de redução ocorrem com aldeídos, cetonas, alcenos, grupamentos nitro, grupamentos azo e sulfóxidos. As enzimas que catalisam reações de redução geralmente são específicas, como as nitro redutases solúveis, responsáveis pela redução de grupamentos nitro, e as aldo-ceto redutases, que catalisam as reações de redução de aldeídos e cetonas. As reações de hidrólise, que consistem na clivagem de uma ligação com a participação de água, ocorrem com ésteres, através das enzimas esterases não-específicas e das pseudocolinesterases do plasma, e com amidas, também pela atividade das esterases não-específicas, assim como pelas amidases não-específicas, carboxipeptidases, aminopeptidases e deciclases (Thomas, 2002).

As reações de Fase II, por sua vez, realizam a conjugação do próprio fármaco ou de seus metabólitos produzidos por reações de Fase I com substâncias endógenas, levando à formação de compostos muito polares, geralmente inativos, e que são rapidamente excretados na urina ou nas fezes. No entanto, alguns metabólitos ativos formados através de reações de conjugação são conhecidos, como a morfina-6-glicuronídeo, que possui atividade analgésica superior à da morfina (Ritter, 2000), e o minoxidil-sulfato, um metabólito ativo do anti-hipertensivo minoxidil (Anderson, Kudlacek & Clemens, 1998). As reações de Fase II são catalisadas por enzimas transferases. No caso da glicuronidação, as enzimas uridina dinucleotídeo fosfato (UDP) glicuronosiltransferases (UGT) são responsáveis pela transferência do grupo glicuronosil do ácido UDP-glicurônico para alcoóis aromáticos e alifáticos, e ácidos carboxílicos, além de aminas e grupos sulfidril livres, para formar, respectivamente, *O*-, *N*- e *S*- glicuronídeos. A reação de sulfatação, por sua vez, é responsável pela transferência de sulfato a partir de 3'-fosfadenosina-5'-

fosfossulfato para grupamentos hidroxila de fenóis e alcoóis alifáticos. A conjugação com o aminoácido glicina ocorre com ácidos carboxílicos aromáticos, arilalifáticos e heterocíclicos, e tem a acil CoA *N*-aciltransferase como enzima catalisadora. Já as enzimas *N*-acetiltransferases são responsáveis pela conjugação de aminas, hidrazinas e sulfonamidas com o acetato. A metilação ocorre sobre grupamento hidroxila e aminas mediante atividade das metiltransferases, enquanto a glicosilação ocorre sobre grupamento hidroxila, ácido carboxílico e grupos sulfidrida livres, e é catalisada pela UDP-glicosiltransferase. Por fim, as enzimas glutathione-*S*-transferases são responsáveis pela conjugação de fármacos com glutathione, através do ataque nucleofílico a carbonos eletrofílicos contendo grupos de saída, como halogênio, sulfato e grupos nitro, e abertura de pequenos éteres cíclicos (e.g. epóxidos, β -lactonas) (Williams, 2001).

A maioria das reações metabólicas que ocorrem em mamíferos é catalisada pelo sistema enzimático citocromo P-450, juntamente com as enzimas UGT, presentes principalmente no fígado (Figura 1). Cerca de 90% das catálises mediadas pelo CYP450 são realizadas por cinco isoformas humanas: CYPs 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 e 3A4 (Guengerich, 2006). Elas estão envolvidas em reações de oxidação, como hidroxilação aromática, hidroxilação alifática, *N*-oxidação, deaminação, dealquilação oxidativa, sulfoxidação e formação de epóxido (Omura, 1999). Assim como as enzimas CYP450, a UGT também é apresentada sob diversas isoformas, as quais são responsáveis pela transferência do grupo glicuronosil do ácido UDP-glicurônico para diversos xenobióticos (substâncias estranhas ao organismo), inclusive fármacos (Trapnell et al., 1998). As enzimas UGT são divididas em duas famílias: UGT1 e UGT2. Acredita-se que as enzimas UGT1A estejam envolvidas principalmente com o metabolismo da bilirrubina e de diversos fármacos, além de hormônios esteróides. A família UGT2 é dividida em duas subfamílias: UGT2A e UGT2B, e esta última está presente em vários tecidos, como rins, fígado, pele, cérebro e próstata, apresentando diversas isoformas (Barbier et al., 2000; Turgeon et al., 2003).

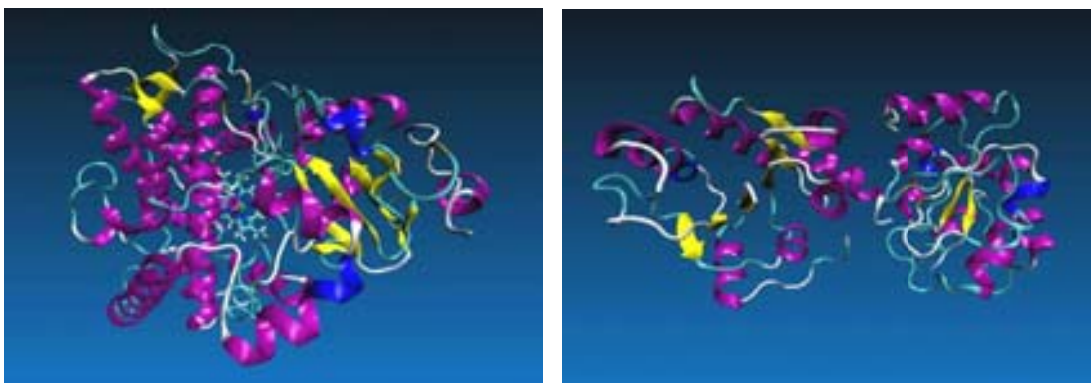


Figura 1: Estruturas cristalográficas do citocromo P-450 CYP3A4 (adaptado de Yano et al., 2004) (à esquerda) e da UDP-glicuronosiltransferase UGT2B7 (adaptado de Miley et al., 2007) (à direita), retiradas do *Protein Data Bank* (pdb).

Vários exemplos de metabólitos ativos, obtidos, principalmente, por reações de Fase I catalisadas por enzimas CYP450, implicaram na necessidade de estudos de metabolismo e farmacocinética, *in vivo* e *in vitro*, os quais são requeridos como parte do processo de desenvolvimento de fármacos, uma vez que estes metabólitos contribuem não somente para os efeitos terapêuticos, mas também para os efeitos adversos, podendo provocar toxicidade. Apesar de as enzimas de Fase I serem as principais responsáveis pela formação de metabólitos ativos, as enzimas de Fase II também contribuem para a ativação de fármacos. Algumas reações de biotransformação, tanto de Fase I como de Fase II, envolvidas neste processo de ativação, incluem hidroxilação de carbono alifático e aromático, *N*-, *O*- ou *S*-dealquilação, epoxidação, oxidação de heteroátomo, redução, glicuronidação, sulfatação e acetilação. Como exemplos de reações de Fase I, podem ser citadas aquelas responsáveis pela ativação da atorvastatina e da bupropiona (Fura, 2006). A atorvastatina (Figura 2a), uma estatina indicada para a redução do colesterol e que, em 2002, foi o fármaco mais vendido, movimentando US\$ 8 bilhões com a venda do Lipitor® (Campo, 2007), produz dois metabólitos ativos, a 2-hidroxi-atorvastatina e a 4-hidroxi-atorvastatina, através de hidroxilação aromática. A bupropiona (Figura 2b), um antidepressivo, também produz um metabólito ativo por hidroxilação, e dois por redução da carbonila. A glicuronidação e a sulfatação da morfina e da codeína (Figura 3), por sua vez, são exemplos de reações de Fase II responsáveis pela formação de metabólitos ativos. Outros exemplos incluem as biotransformações da

amitriptilina, do clordiazepóxido, da venlafaxina, da clomipramina, do propranolol, e da sinvastatina (Fura, 2006).

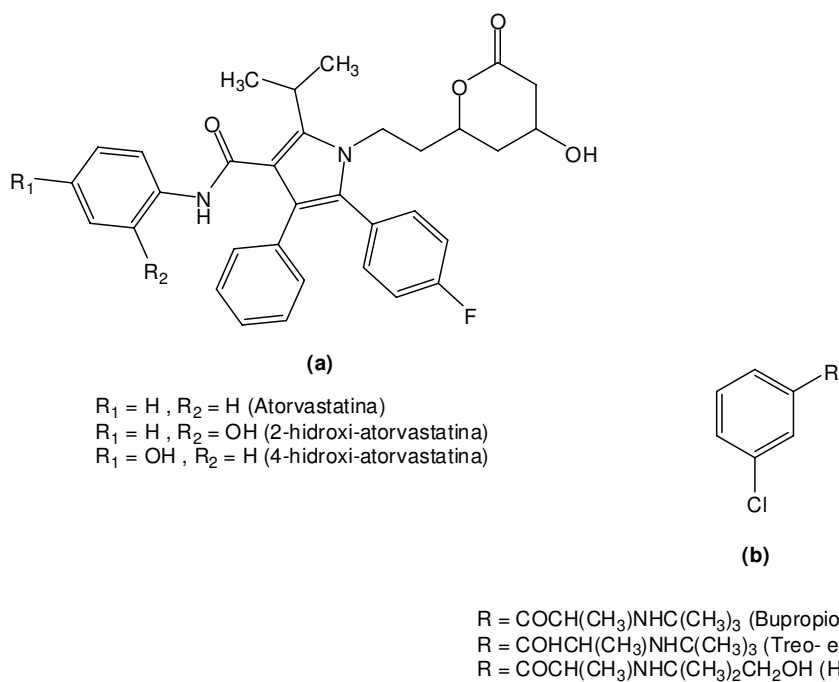
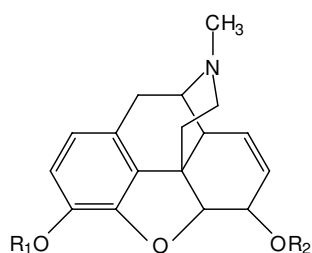


Figura 2: Metabólitos ativos do hipocolesterolêmico atorvastatina (a) e do antidepressivo bupropiona (b), obtidos através de reações de Fase I (adaptado de Fura, 2006).



$R_1 = H, R_2 = H$ (Morfina)
 $R_1 = H, R_2 = C_6H_8O_6$ (Morfina-6-glicuronídeo)
 $R_1 = H, R_2 = SO_3$ (Morfina-6-sulfato)
 $R_1 = CH_3, R_2 = H$ (Codeína)
 $R_1 = CH_3, R_2 = C_6H_8O_6$ (Codeína-6-glicuronídeo)
 $R_1 = CH_3, R_2 = SO_3$ (Codeína-6-sulfato)

Figura 3: Metabólitos ativos da morfina e da codeína, obtidos através de reações de Fase II (adaptado de Fura, 2006).

Os estudos de biotransformação são realizados tradicionalmente *in vivo*, utilizando sistemas animais. O uso de animais de laboratório (e.g. rato, camundongo, coelho, cachorro) envolve a administração do fármaco, seguida da análise dos fluidos corporais (plasma, urina) para a identificação dos metabólitos humanos esperados. No entanto, as diferenças fisiológicas entre as espécies devem ser consideradas, tendo-se em mente que não existe um modelo animal ideal para a extrapolação ao modelo humano. Para isso, os estudos *in vitro* e *ex vivo*, empregando perfusão de órgãos, cultura de células e tecidos, e preparações microsossomais, são geralmente utilizados como complemento ao uso de animais, e auxiliam na elucidação de processos que não podem ser bem estudados *in vivo* (Collins, 2001).

A perfusão de fígado de rato, por exemplo, é interessante devido à maior facilidade de controle dos fluxos sanguíneo e biliar, e da manipulação do meio de composição da perfusão, além do grande número de amostras que podem ser coletadas e do menor número de interações com substâncias endógenas (Meijer & Swart, 1997). As preparações microsossomais, por sua vez, são derivadas do retículo endoplasmático após sua homogeneização e centrifugação, e contêm CYPs e UGTs. Elas têm sido desenvolvidas para auxiliar na previsão de possíveis variações no *clearance* metabólico *in vivo* e de interações entre fármacos, para uma variedade de compostos, e são as técnicas mais utilizadas nos estudos *in vitro* do metabolismo de fármacos (Wynalda et al., 2003).

Exemplo destas duas técnicas está presente no estudo da biotransformação do flavonóide apigenina (Figura 4), utilizando tanto preparações microsossomais como perfusão de fígado de rato, que fornecem novos dados sobre o seu metabolismo e complementando os experimentos *in vivo*. Durante o emprego das preparações microsossomais, foram identificados três metabólitos monohidroxilados produzidos por reações de Fase I, mediadas por enzimas do CYP450, além de metabólitos produzidos por reações de Fase II, dos quais foram isolados três conjugados monoglicuronídeos e um monossulfatado. Com a perfusão de fígado isolado, foram identificados, além dos conjugados monoglicuronídeos e do conjugado monossulfatado, dois novos derivados: um conjugado diglicuronídeo e um glicuronossulfatado (Gradolatto et al., 2004).

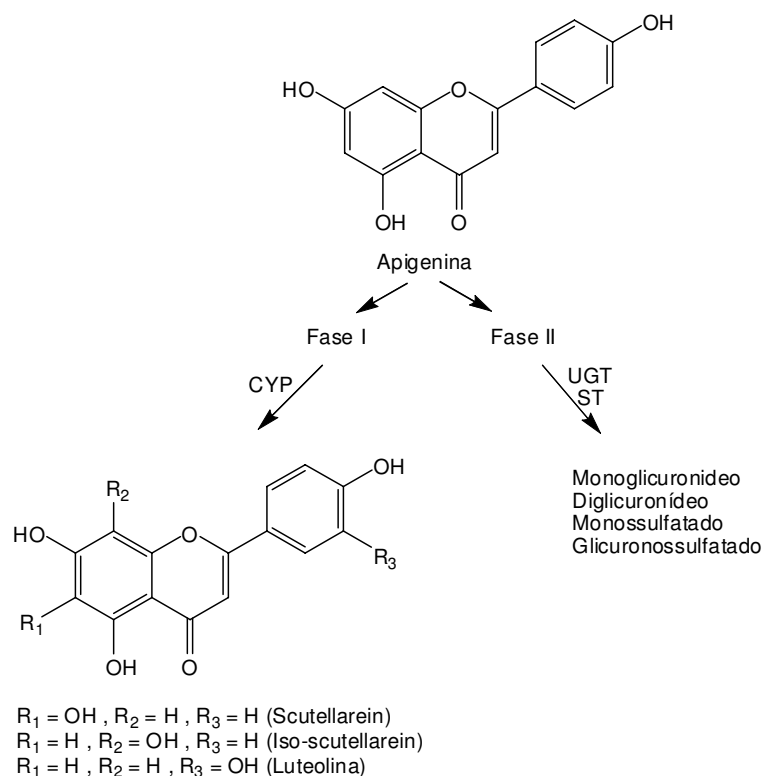


Figura 4: Metabólitos do flavonóide apigenina obtidos através de reações de Fase I e Fase II, em estudo utilizando preparações microssomais e perfusão de fígado de rato (adaptado de Gradolatto et al., 2004).

Outra técnica *in vitro* bastante empregada é a linhagem de hepatócitos humanos, em suspensão ou cultura em monocamada, que tem como vantagens o fato de estas células apresentarem todas as enzimas de Fase I e Fase II, de permanecerem viáveis por um longo período de tempo, de serem um ótimo modelo para o estudo de biotransformações mediadas pelos CYPs, e permitirem uma boa correlação com os estudos *in vivo*. Por outro lado, a baixa disponibilidade de tecidos hepáticos pode limitar o uso de hepatócitos primários. Em um estudo utilizando cultura de hepatócitos suínos, Hosagrahara e colaboradores (Hosagrahara, Hansen & Remmel, 1999) identificaram metabólitos hidroxilados do benzodiazepínico midazolam (Figura 5), através da indução do citocromo P-450 (CYP3A). A indução enzimática do CYP450 é interessante, pois, além de aumentar a capacidade metabolizadora, fornece dados sobre a diferença metabólica entre as espécies. Outra técnica *in vitro* utilizada no estudo do metabolismo de fármacos é a cultura de

células utilizando linhagens como a HepG2 e a BC2 (fígado), além da A549 (pulmão), que apresentam a desvantagem de expressarem poucas enzimas, restringindo sua capacidade metabólica. No entanto, uma nova linhagem de células, denominada HepaRG, demonstrou possuir função e morfologia semelhantes às dos hepatócitos (Pelkonen et al., 2005). Quando comparados com as células HepG2, os hepatócitos são preferidos como modelo para a biotransformação hepática humana, uma vez que o nível de expressão dos genes codificadores das enzimas do citocromo P-450 nos hepatócitos humanos é similar ao de amostras de fígado humano, ao contrário do que acontece com as células HepG2, que são mais úteis no estudo da regulação das enzimas envolvidas no metabolismo de fármacos (Wilkening et al., 2003).

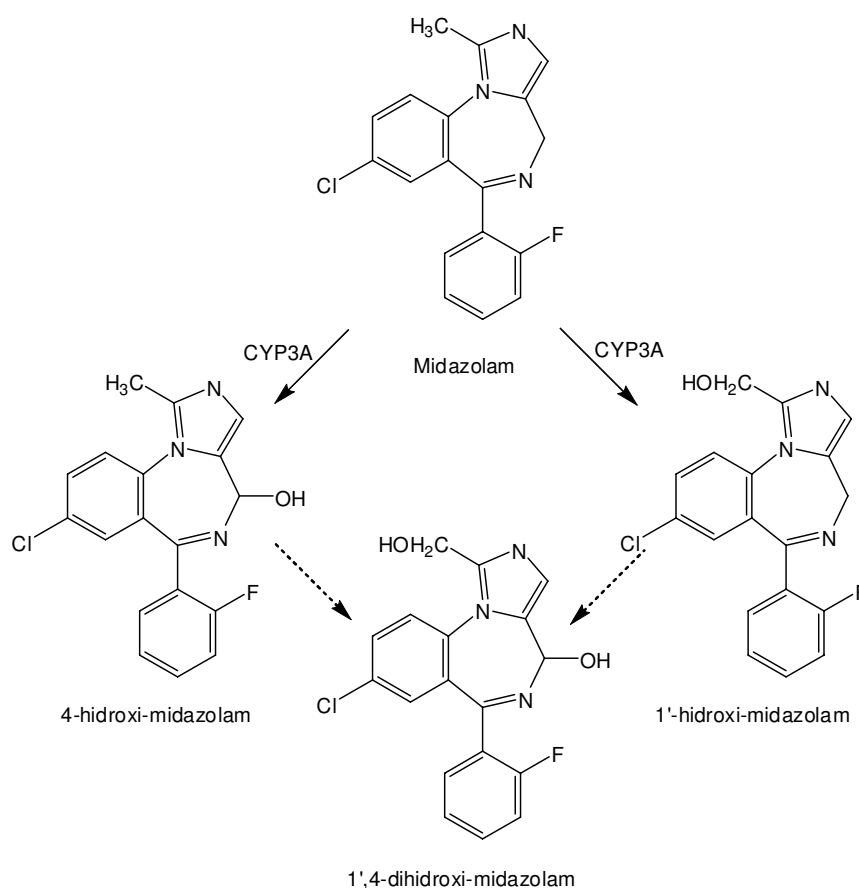


Figura 5: Metabólitos hidroxilados do benzodiazepínico midazolam, obtidos através de estudos utilizando cultura de hepatócitos suínos, com indução do citocromo P-450 (CYP3A) (adaptado de Hosagahara, Hansen & Remmel, 1999).

Além dos estudos *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo*, os métodos computacionais têm sido desenvolvidos como estratégia para a previsão do metabolismo humano nos primeiros estágios do desenvolvimento de fármacos. Para tal finalidade, modelos do metabolismo *in silico* (em um computador) são utilizados para avaliar uma série de compostos, com vantagens como: maior rapidez, menor custo e maior facilidade de operação, quando comparados com os modelos tradicionais (Moda et al., 2008), além de reduzir a demanda de animais (Azerad, 1999). Programas como MetabolExpert, META, Meteor, MetaDrug (Testa et al., 2004), e PK/DB (Moda et al., 2008), utilizam bancos de dados a fim de determinar a natureza de metabólitos, bem como sua importância e reatividade, predizendo as possibilidades metabólicas de diversos compostos através de suas estruturas químicas (Testa et al., 2004). A modelagem molecular é uma ferramenta que tem sido bastante utilizada neste sentido, e contribui para os estudos do metabolismo através de experimentos *in silico* com estruturas tridimensionais de citocromo P-450 e de seu ligante, determinadas por difração de raios-X (Julsing et al., 2008).

A bioconversão também constitui uma alternativa ou complemento ao uso de sistemas animais. Esta técnica *in vitro* utiliza organismos eucarióticos para a produção de metabólitos similares aos de mamíferos, pois baseia-se na semelhança de seus sistemas enzimáticos, principalmente aqueles que catalisam reações de Fase I, como o CYP450. Como vantagens, apresenta a facilidade e o menor custo de manuseio, a produção de metabólitos em grande quantidade, permitindo fácil identificação estrutural, e catálise de reações de formas regio-, quimio- e estereoespecíficas, o que tem provocado um crescente aumento na exploração de modelos microbianos para estudos do metabolismo de mamíferos. Além disso, os novos metabólitos podem apresentar maior atividade ou menor toxicidade que os compostos de origem, ou ainda novas atividades biológicas (Abourashed et al., 1999).

1.1.1 Modelos microbianos para o metabolismo de fármacos

A possibilidade de obtenção de compostos de forma regio-, quimio- e estereoespecíficas através de reações catalisadas por enzimas, utilizando condições brandas como pH próximo à neutralidade e temperatura ambiente, representou uma

alternativa à síntese orgânica clássica nos casos em que esta não era viável. No entanto, algumas limitações como a necessidade de cofatores, a dificuldade de purificação destas enzimas e sua alta especificidade aos substratos, conduziram ao uso de organismos eucarióticos como fonte de novos compostos, técnica que pode ser denominada bioconversão. Fungos filamentosos foram inicialmente reconhecidos por serem capazes de realizar hidroxilações em grupos esteróides, e esta capacidade deu início à síntese e comercialização dos corticosteróides farmacologicamente ativos, na década de 1950, e ao interesse da indústria farmacêutica pelo uso de microrganismos para a síntese de novos compostos ativos (Figura 6). Desde então, diversas reações como hidrólise, oxidação, condensação e redução têm sido relatadas utilizando esta técnica, incluindo aquelas que não são obtidas através de enzimas isoladas, como ocorre com os esteróides (Peterson & Murray, 1952; Holland, 1991).

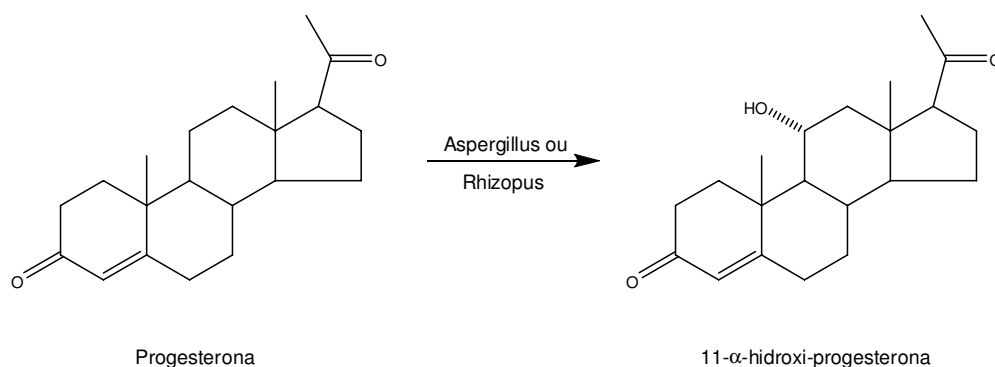


Figura 6: Bioconversão da progesterona em 11-α-hidroxiprogesterona por espécies fúngicas de *Aspergillus* e *Rhizopus* (adaptado de Peterson & Murray, 1952).

Em tais estudos, pode-se notar a grande similaridade entre as reações encontradas em mamíferos e em microrganismos, principalmente as que envolvem reações de Fase I, justificando o interesse pelo uso da bioconversão para o estudo da biotransformação de fármacos. Alguns exemplos desta similaridade incluem a *N*-demetilação e a hidroxilação na posição C-3 do benzodiazepínico diazepam (Figura 7a), catalisadas por *Aspergillus terreus* e *Beauveria bassiana*; a *N*-dealquilação do diurético furosemida (Figura 7b), utilizando *Cunninghamella elegans*; e a

deaminação oxidativa do antimalárico primaquina (Figura 7c) por *Aspergillus flavus*. Além dos fungos filamentosos, bactérias pertencentes aos Actinomicetos, como as dos gêneros *Streptomyces* e *Nocardia*, também são utilizadas nos processos de bioconversão, por apresentarem sistemas enzimáticos semelhantes aos fúngicos. Atualmente, empregam-se, ainda, algas unicelulares e cultura de células de plantas, demonstrando a infinidade de reações que podem ser realizadas durante as bioconversões. Para a comprovação da produção de metabólitos semelhantes aos de mamíferos em tais experimentos, estudos de biotransformação de fármacos utilizando animais podem ser realizados em paralelo ao estudo microbiano, para a comparação dos metabólitos produzidos (Azerad, 1999).

A habilidade dos fungos filamentosos em adaptar seu metabolismo a diferentes fontes de nutrientes está relacionada com sua capacidade em produzir uma grande quantidade de enzimas intra- e extracelulares. Diversos estudos identificaram que a maioria das reações de bioconversão ocorre mediante a atividade das monoxigenases do citocromo P-450. Tais estudos foram inicialmente realizados de forma indireta utilizando inibidores específicos do CYP450, devido às dificuldades de purificação enzimática e, posteriormente, através da clonagem dos genes que expressam o citocromo P-450. Exemplos da participação comprovada deste sistema enzimático em reações de biotransformação catalisadas por fungos são as hidroxilações de esteróides, como a progesterona (Figura 6), e de hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs), conhecidos poluentes ambientais, alguns com potente atividade carcinogênica. Além do CYP450, outras enzimas também são responsáveis por reações de oxidação, como as lacases, as ligninases e as peroxidases (van den Brink et al., 1998).

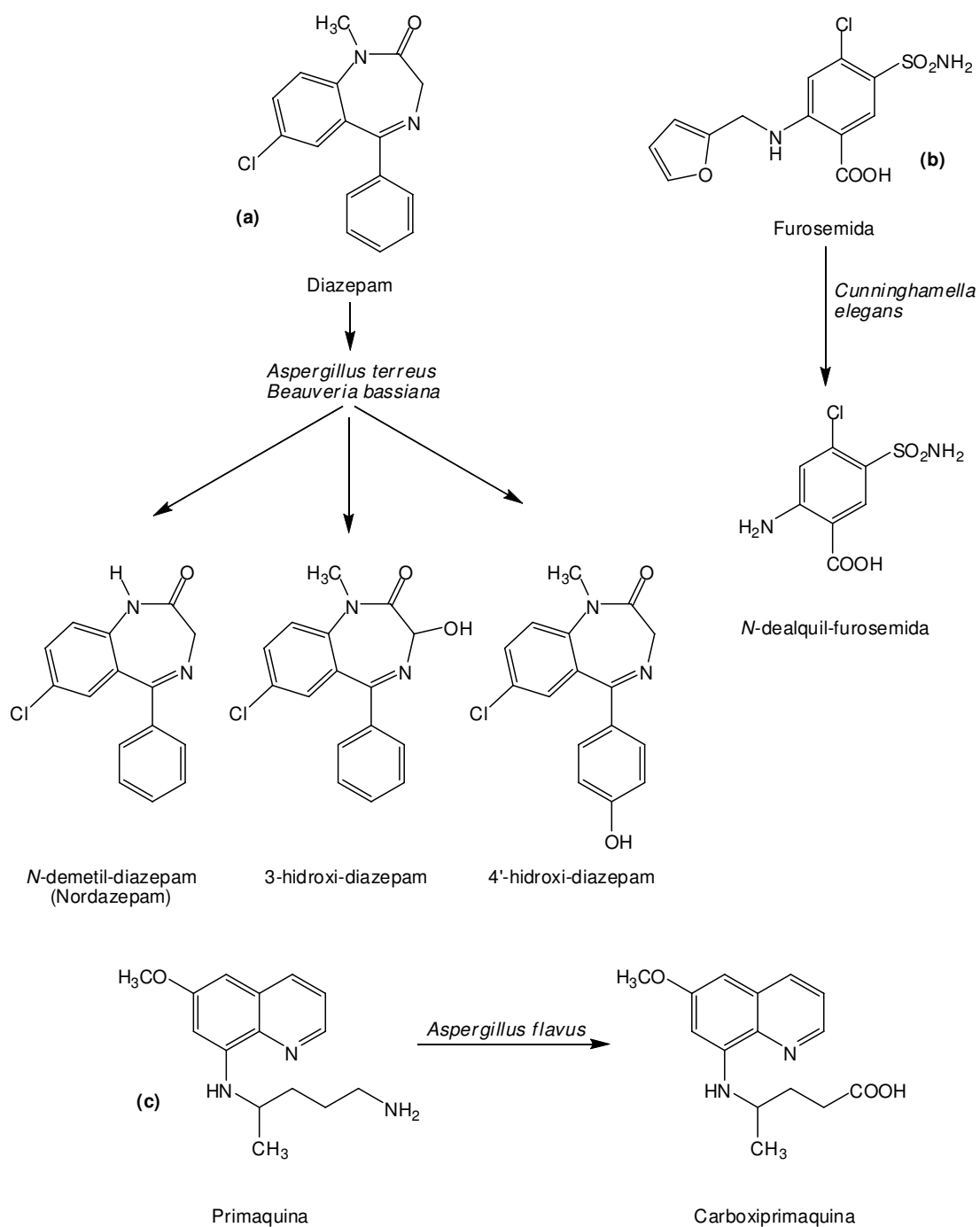


Figura 7: Exemplos de reações catalisadas por fungos filamentosos, similares às que ocorrem em mamíferos, utilizando diazepam (a), furosemida (b) e primaquina (c) como substratos (adaptado de Azerad, 1999).

A seletividade das reações catalisadas pelas enzimas microbianas é, sem dúvida, uma das maiores vantagens da bioconversão, quando comparada com a síntese química. Microrganismos são capazes de biotransformar diversos compostos de forma regioseletiva, quimiosseletiva e estereosseletiva (Abourashed et al., 1999). A regioseletividade é definida como a discriminação entre grupos funcionais idênticos localizados em posições diferentes, a exemplo do que ocorre durante a síntese do anti-histamínico fexofenadina através da oxidação regioseletiva da terfenadina, utilizando o fungo *Cunninghamella blakesleeana* como alternativa à síntese química de baixo rendimento (Schmitz et al., 2000). Já a quimiosseletividade consiste na seleção de grupamentos químicos específicos, e pode ser observada durante a acetilação do álcool 2-hidroxi-benzil no grupamento hidroxila alifático, por lipase de *Fusarium globulosum*, não ocorrendo acetilação da hidroxila aromática (Gulati et al., 2001). A estereosseletividade está relacionada com a discriminação entre estereoisômeros, e ocorre durante a síntese da naftoquinona (S)-4-hidroxi- α -lapachona a partir do 1-metoxi-2-naftol, utilizando *Mortierella isabellina* como catalisador (Holland, Qi & Manoharan, 1995).

Antes que um microrganismo apropriado seja escolhido para catalisar determinado tipo de reação desejada, um *screening* deve ser realizado com cepas de diferentes gêneros, com o objetivo de determinar qual a cepa mais adequada para a biotransformação do substrato utilizado. Diversos compêndios e relatos na literatura contêm informações sobre os tipos de reações mais comuns realizadas por determinada espécie fúngica, e auxiliam na escolha dos gêneros mais prováveis para a bioconversão pretendida. Apesar de um tipo de reação química ser mais comum para determinada cepa, reações paralelas podem ocorrer em menor proporção (Holland, 1991).

Exemplo de *screening* pode ser observado em um estudo utilizando cinquenta fungos e duas espécies de bactérias pertencentes ao gênero *Streptomyces*, a fim de avaliar a capacidade destes em metabolizar cinco prováveis substratos (aminopirina, diazepam, testosterona, teofilina e warfarina), de estruturas e propriedades farmacológicas diferentes. Griffiths e colaboradores (Griffiths et al., 1991) relataram a capacidade de diversas cepas em biotransformar tais compostos, com produção de metabólitos semelhantes aos de mamíferos (Figura 8) através de reações de oxidação, tais como hidroxilações aromática e alifática, e N-demetilação, características de CYP450. Ao final deste estudo, *Beauveria bassiana*, responsável

por metabolizar a maioria dos substratos, foi a cepa escolhida para novos estudos de caracterização de seu sistema enzimático, a fim de definí-la como modelo microbiano para o metabolismo de fármacos.

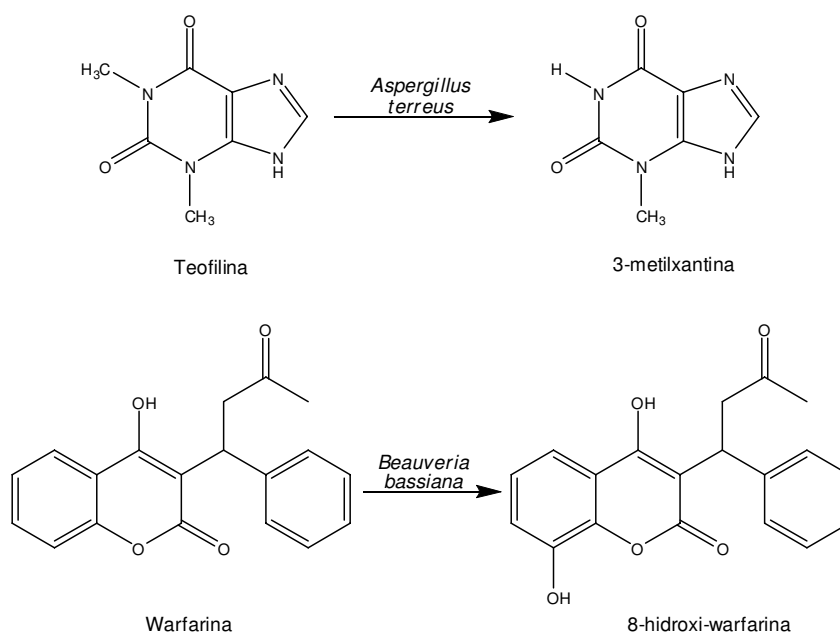


Figura 8: Exemplos de reações de bioconversão semelhantes às de mamíferos, realizadas durante um *screening* com diversos microrganismos e diferentes substratos (adaptado de Griffiths et al., 1991).

1.1.1.1 *Cunninghamella elegans*

Dentre as cepas de fungos filamentosos, as que pertencem ao gênero *Cunninghamella* são as mais estudadas, e as que apresentam maior similaridade de reações com os mamíferos. Este gênero, pertencente ao filo Zygomycota e à ordem Mucorales, consiste em 14 espécies, encontradas no solo e em plantas de regiões subtropicais e do Mediterrâneo, sendo *C. bertholletiae*, *C. elegans* e *C. echinulata* as mais comuns. Destas, *C. elegans* e *C. echinulata* são extensivamente utilizadas em estudos de bioconversão, e apresentam diversos relatos na literatura de reações com uma variedade de compostos (Asha & Vidyavathi, 2008). Exemplos de reações de biotransformação catalisadas pela *Cunninghamella elegans*, com suas

respectivas condições de incubação (temperatura, agitação e concentração do substrato), estão presentes na Tabela 1.

Tabela 1: Exemplos de reações de biotransformação catalisadas por *Cunninghamella elegans*, utilizando diferentes substratos.

Substrato	Condições reacionais	Biotransformação	Referências
Acenafteno	Dado não apresentado	hidroxilação; redução	Pothuluri et al. (1992)
Adrenosterona	26 °C; 128 rpm; 450 mg/115 mL	hidroxilação; redução	Choudhary et al. (2007)
Amitriptilina	25 °C; 150 rpm; 5, 10, 15, 20, 40 e 80 mg/35 mL	hidroxilação; <i>N</i> -demetilação; <i>N</i> -oxidação	Zhang et al. (1995)
Amoxapina	25 °C; 150 rpm; 10 mg/35 mL	hidroxilação; <i>N</i> -formilação	Moody et al. (2000)
Cinobufagin	29 °C; 220 rpm; 250 mg/250 mL	hidroxilação	Qiao et al. (2008)
Doxepina	26 °C; 125 rpm; 10 mg/30 mL	hidroxilação; <i>N</i> -demetilação; <i>N</i> -acetilação; <i>N</i> -oxidação; <i>N</i> -formilação	Moody et al. (1999)
Flumequina	28 °C; 125 rpm	hidroxilação; redução	Williams et al. (2007)
Jervina	Dado não apresentado	hidroxilação; redução	Sayed et al. (2000)
Metilprotodioscina	28 °C; 180 rpm; 5 mg/60 mL	hidroxilação; oxidação	He et al. (2005)
Omeprazol	25 °C; 150 rpm; 10 mg/35 mL	hidroxilação; demetilação	Pearce & Lushnikova (2006)
Verde Malaquita	25 °C; 150 rpm; 10 mg/35 mL	redução; <i>N</i> -demetilação; <i>N</i> -oxidação	Cha et al. (2001)

Zhang e colaboradores (Zhang et al., 1996d) demonstraram que a versatilidade apresentada por *C. elegans* em metabolizar xenobióticos deve-se à presença de enzimas tanto de Fase I como de Fase II. Através da análise de frações citosólicas e microssomais, foram detectadas atividades de monoxigenases do citocromo P-450 para hidroxilação e *N*-dealquilação (Fase I), além de atividades de enzimas de Fase II, como UDP-glicuronosiltransferase (UGT), UDP-glicosiltransferase, aril-sulfotransferase e glutathione *S*-transferase (GST), as quais catalisam, respectivamente, reações de glicuronidação, glicosilação, sulfatação e conjugação com glutathione. As reações enzimáticas envolvidas neste estudo estão representadas na Figura 9. Em um *screening* com 20 espécies fúngicas, *C. elegans* foi a que apresentou metabolismo de Fase I mais eficiente.

O citocromo P-450 da *C. elegans* foi recentemente caracterizado através da clonagem e expressão dos genes de CYP450 em *Escherichia coli*, e apresentou semelhanças com a família CYP51 e com alguns citocromos de mamíferos, sendo denominado CYP509A1. Este resultado contribui para a elucidação dos processos de biotransformação catalisados por *C. elegans*, e justifica seu uso como modelo microbiano para estudos do metabolismo (Wang et al., 2000). Em um estudo semelhante, enzimas GST de *C. elegans* foram caracterizadas e designadas de GSTG-1 e GSTG-2, pertencentes a uma nova classe de GSTs Gama, e forneceram dados que auxiliam na compreensão da evolução destas enzimas, principalmente frente ao contato com substâncias químicas tóxicas presentes no meio ambiente (Cha et al., 2002).

Dentre as classes de compostos utilizados em estudos de bioconversão com *C. elegans*, os antidepressivos tricíclicos, os anti-histamínicos e os hidrocarbonetos aromáticos são os mais relatados na literatura, com formação, inclusive, de metabólitos semelhantes aos de mamíferos, alguns com atividade biológica. A amitriptilina (Figura 10), por exemplo, é um antidepressivo tricíclico que, quando incubada com *C. elegans*, é metabolizada em nortriptilina por *N*-demetilação, principal metabólito formado em humanos e que também possui atividade antidepressiva, além de derivados hidroxilados e obtidos por *N*-oxidação, tendo sido comprovada a participação de monoxigenases do CYP450 nestas reações (Zhang et al., 1995). Outros exemplos pertencentes a esta classe incluem a amoxapina (Moody et al., 2000b), a ciclobenzaprina (Zhang et al., 1996a), e a doxepina (Moody et al., 1999).

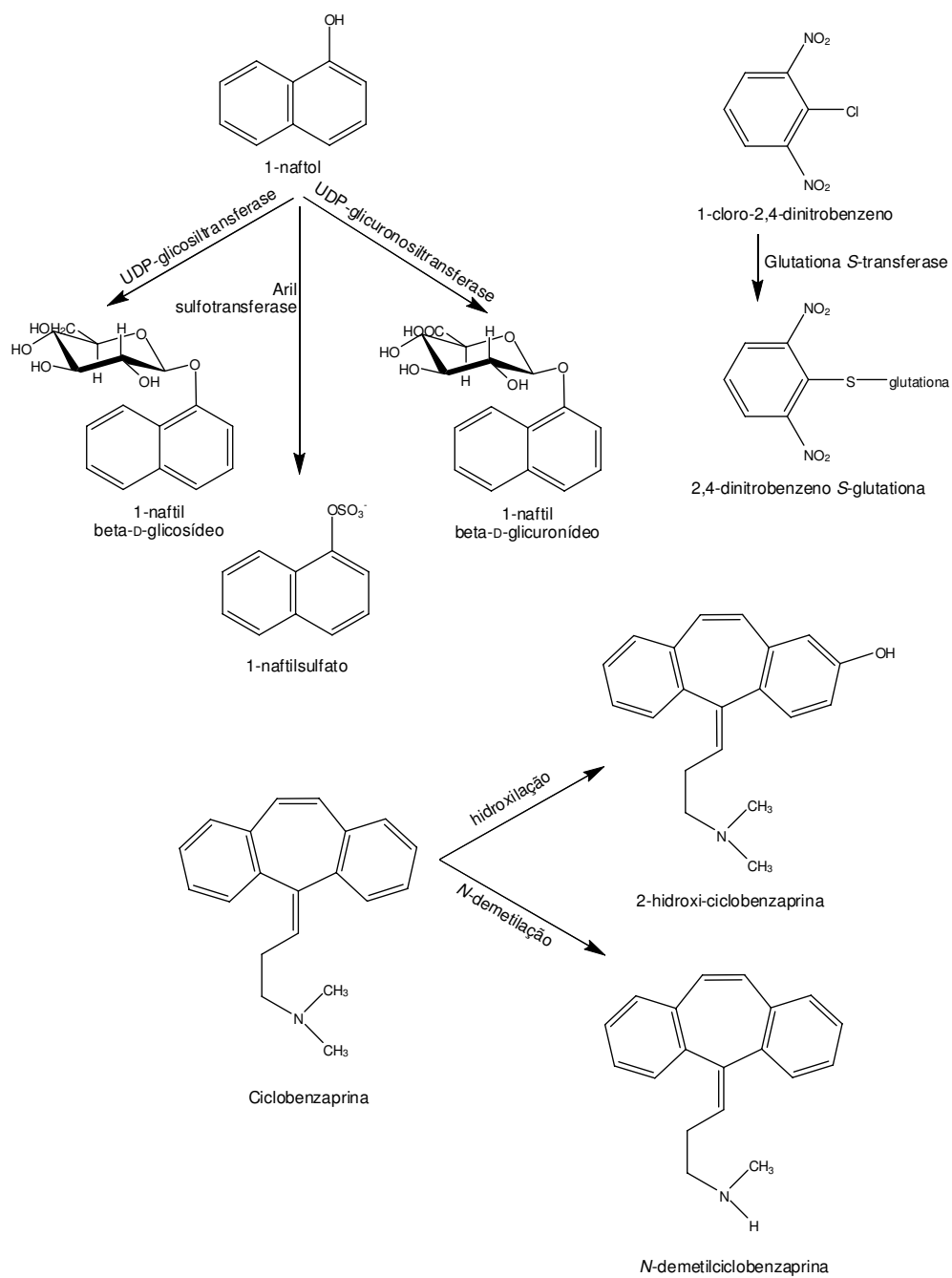


Figura 9: Reações enzimáticas catalisadas por *C. elegans* (adaptado de Zhang et al., 1996d).

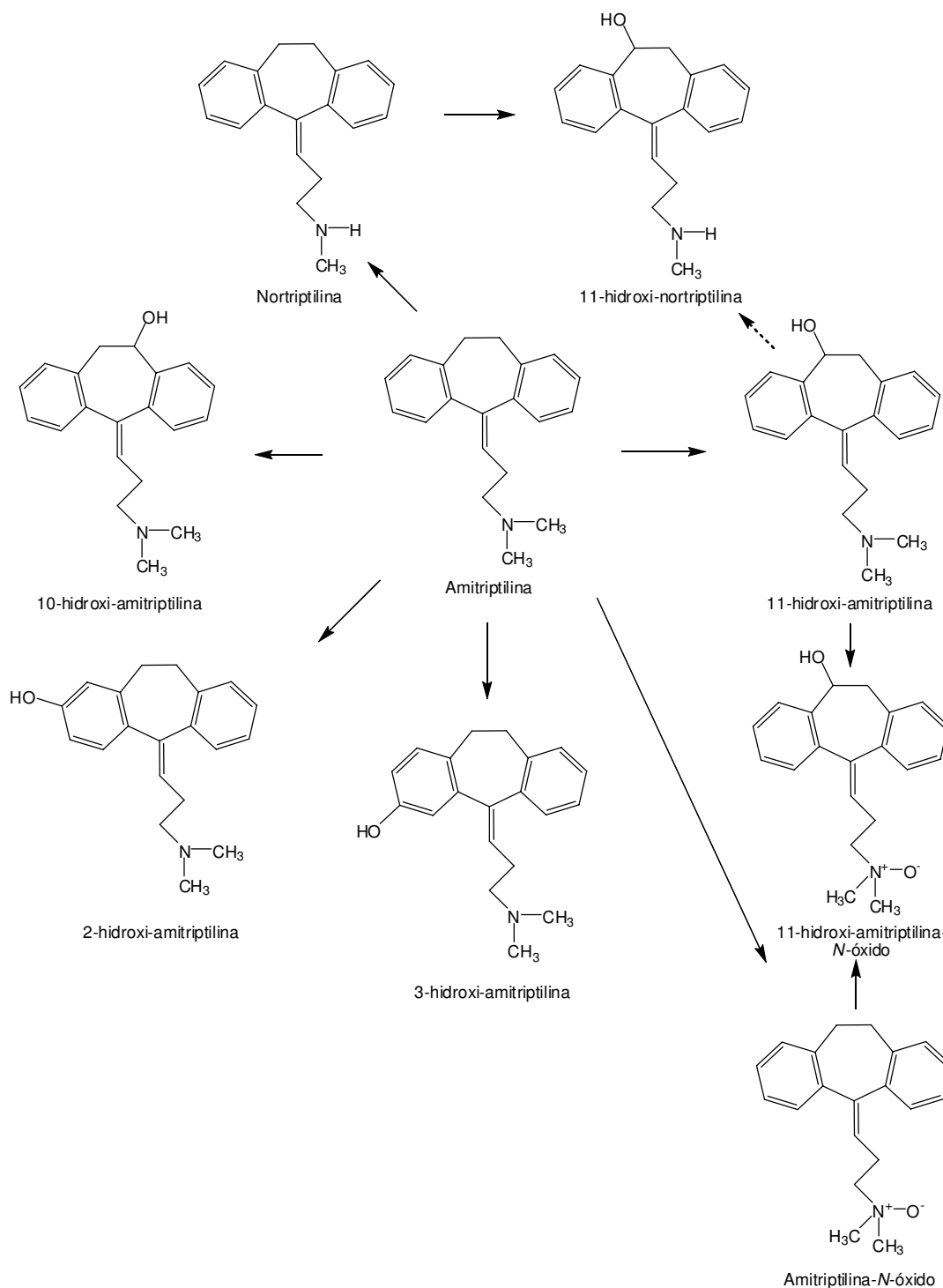


Figura 10: Reações de biotransformação do antidepressivo tricíclico amitriptilina utilizando *Cunninghamella elegans* (adaptado de Zhang et al., 1995).

C. elegans também é capaz de biotransformar anti-histamínicos, com produção de metabólitos semelhantes aos de mamíferos, sendo útil no isolamento de tais derivados para posteriores ensaios de toxicidade. A azatadina (Figura 11), por exemplo, é biotransformada através de reações de hidroxilação e *N*-demetilação, enquanto a difenidramina produz derivados por *N*-demetilação, oxidação e *N*-acetilação (Zhang et al., 1996c; Moody et al., 2000a).

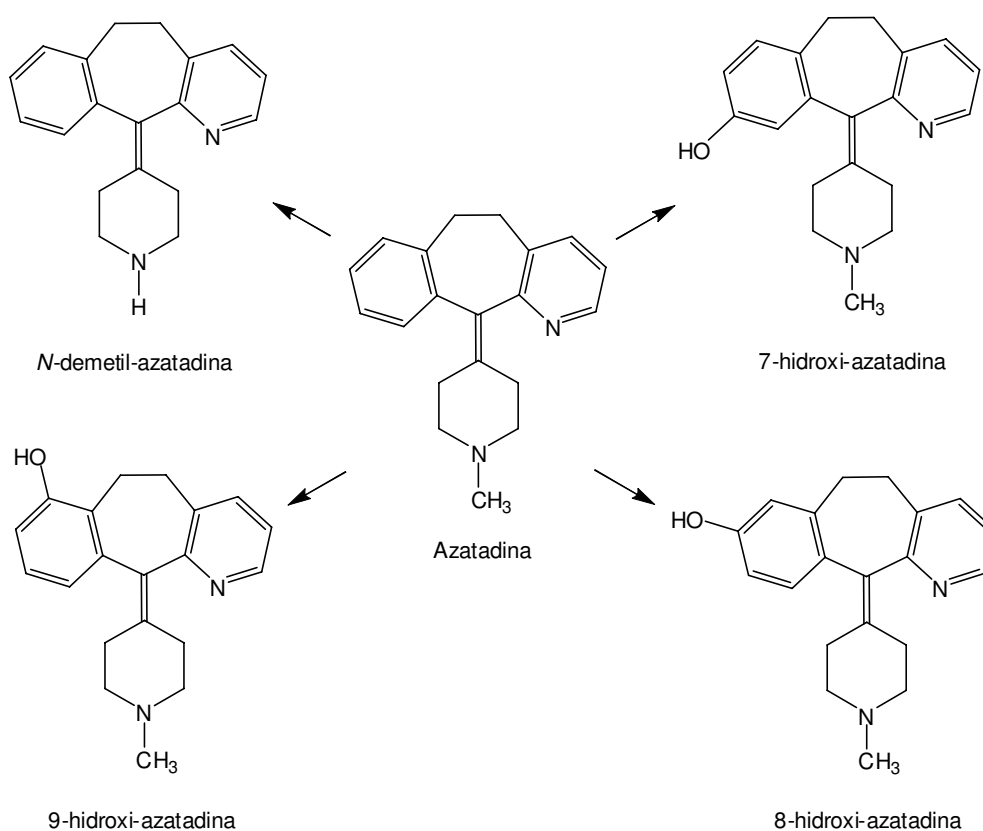


Figura 11: Reações de bioconversão catalisadas pela *C. elegans*, utilizando o anti-histamínico azatadina (adaptado de Zhang et al., 1996c).

Os hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs) são compostos formados a partir da fusão de dois ou mais anéis aromáticos, e são conhecidos poluentes ambientais resistentes à degradação microbiana, cujo metabolismo em mamíferos é responsável pela formação de intermediários mutagênicos. No entanto, a

capacidade de fungos filamentosos, como *C. elegans*, em biotransformá-los sem produzir tais intermediários, tem sido observada em diversos trabalhos. Cerniglia e Yang (Cerniglia & Yang, 1984) documentaram o metabolismo estereosseletivo do antraceno e do fenantreno, com obtenção de *trans*-1,2-dihidroxi-1,2-dihidroantraceno, *trans*-1,2-dihidroxi-1,2-dihidrofenantreno e *trans*-3,4-dihidroxi-3,4-dihidrofenantreno, demonstrando a importância desta cepa na detoxificação e eliminação de polihidrocarbonetos aromáticos do meio ambiente. O fluoreno, outro composto pertencente aos PAHs, é biotransformado em 9-fluorenona, 9-fluorenol e 2-hidroxi-9-fluorenona quando incubado com *C. elegans* (Pothuluri et al., 1993). Em outro estudo, a participação do CYP450 de *C. elegans* foi sugerida durante a biotransformação do fenantreno (Lisowska & Dlugonski, 2003).

1.1.1.2 *Beauveria bassiana*

As cepas de fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Beauveria*, como a *B. bassiana*, são amplamente distribuídas em diversas regiões do mundo, podendo ser isolados de insetos, solo e plantas, além de apresentarem uma grande variação genética (Alves et al., 2002). Vários estudos relatam a capacidade de *Beauveria bassiana* em catalisar diversos tipos de reação, entre oxidação, redução e hidrólise, de uma variedade de substratos, contribuindo para os estudos de biotransformação de fármacos (Grogan & Holland, 2000).

Ainda segundo Grogan e Holland (Grogan & Holland, 2000), as reações mais comuns catalisadas por *B. bassiana* incluem hidroxilações, tendo sido bastante exploradas aquelas que envolvem produtos naturais, compostos aromáticos e hidrocarbonetos. Alguns exemplos de reações estudadas na presença de *B. bassiana* incluem as hidroxilações da quercetina, do diazepam, da fenciclidina, do praziquantel e da warfarina (Azerad, 1999).

1.1.1.3 Otimização dos processos de bioconversão

Apesar dos vários tipos de reações que determinados microrganismos podem catalisar, muitas vezes o rendimento é baixo, necessitando de estudos de otimização

para a melhor aplicação do processo de bioconversão, pois maiores quantidades de metabólitos desejados são necessárias, por exemplo, para posteriores estudos farmacológicos e toxicológicos. Diversos autores relacionam a eficiência das bioconversões com a morfologia dos microrganismos em meio de cultura e com as condições (parâmetros) de incubação. Gibbs e colaboradores (Gibbs et al., 2000) defendem a influência da morfologia fúngica sobre a capacidade metabolizadora destes microrganismos através da alteração da viscosidade do meio. A morfologia em massa amorfa (micélios dispersos) geralmente é mais viscosa devido às interações entre os seus filamentos, enquanto a morfologia em *pellets* (massas miceliais esféricas densamente entrelaçadas) apresenta menor viscosidade e, conseqüentemente, menor influência sobre as propriedades de fluxo. Uma maior viscosidade do meio implica em uma menor distribuição de nutrientes, dependendo da agitação, sendo a distribuição de oxigênio particularmente importante para os fungos aeróbicos. O oxigênio deve ser transferido a partir do gás disperso no ambiente de incubação para o meio de cultura líquido e, finalmente, para os sítios no interior das células que necessitam da demanda metabólica de oxigênio, e sua limitação pode resultar na supressão total da produção metabólica por estes microrganismos. Além dos nutrientes, uma maior viscosidade do meio também pode impedir a transferência de calor, dificultando o controle da temperatura.

Ainda segundo Gibbs e colaboradores (Gibbs et al., 2000), cada morfologia apresenta suas vantagens e desvantagens e, sendo assim, uma morfologia particular pode ser requerida para cada tipo de reação catalisada por determinado microrganismo. Apesar de a morfologia em *pellets* apresentar menor viscosidade, a difusão de oxigênio para seu interior pode ser menos eficiente quanto maior for o seu diâmetro. A região central de *pellets* largos sofre autólise devido à limitação de nutrientes, diminuindo sua atividade metabólica e a síntese de produtos. Conseqüentemente, *pellets* pequenos são desejáveis durante o desenvolvimento fúngico destinado à biotransformação.

Alguns parâmetros de bioconversão, como composição e pH do meio de cultura, temperatura, agitação e concentração do substrato, exercem influência sobre a morfologia fúngica e sobre a produtividade, e devem ser monitorados e alterados a fim de que as condições responsáveis por melhores rendimentos e pela produção de metabólitos desejados sejam determinadas. Além do oxigênio, fontes de carbono, hidrogênio, nitrogênio, fósforo, potássio, enxofre e magnésio são

necessárias em grande quantidade para promover o crescimento fúngico e a formação de produtos, além de influenciarem na morfologia. O pH do meio tem influência sobre o transporte e a solubilidade dos nutrientes e sobre as reações enzimáticas, e sua influência sobre a morfologia fúngica é controversa. Para as reações de bioconversão, alguns microrganismos toleram valores de pH entre 4 e 9, mas o ideal é que o pH esteja na faixa da neutralidade, condição em que o crescimento e a atividade metabólica dos fungos são melhores (Papagianni, 2004).

1.2 Modelagem molecular e o planejamento racional de fármacos

Dentro do conceito de Química Farmacêutica Medicinal, que consiste no estudo da relação entre a estrutura química de determinada substância e sua atividade farmacológica, bem como no planejamento racional de novos fármacos, a modelagem molecular utilizando métodos computacionais representa uma alternativa interessante na avaliação estrutural de substâncias de interesse. O planejamento de novos fármacos auxiliado por computador (CADD, do inglês *Computer-Assisted Drug Design*), deve-se, em grande parte, aos avanços nos recursos computacionais em termos de *hardware* (velocidade de cálculo) e *software* (programas de modelagem molecular), e permite uma análise da atividade biológica *versus* propriedades físico-químicas com maior velocidade e precisão (Rodrigues, 2001). A difração de raios-X é uma técnica eficiente na elucidação estrutural através da análise de substâncias em fase cristalina e, com isso, tem disponibilizado a estrutura tridimensional de um número cada vez maior de moléculas em bancos de dados, como o *Protein Data Bank*, um repositório de estruturas de macromoléculas que auxilia nos métodos utilizados em modelagem molecular (Barreiro & Rodrigues, 1997).

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*), modelagem molecular é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica, e que visa fornecer uma representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias (Sant'Anna, 2002).

As indústrias farmacêuticas têm voltado seu interesse nos estudos de modelagem molecular para o planejamento racional de fármacos. Esta metodologia está relacionada com o desenvolvimento de fármacos baseando-se numa abordagem fisiopatológica, envolvendo um composto-protótipo e seu alvo terapêutico. Desta forma, a modelagem auxilia no processo de descoberta de novos fármacos através do fornecimento das propriedades da molécula em estudo, tais como potencial eletrostático, densidade eletrônica, calor de formação, energia de ionização, energia dos orbitais de fronteira HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) e LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), as quais podem estar envolvidas em sua interação com o receptor, além de proporcionar uma visualização tridimensional do sistema fármaco-receptor. A otimização de um protótipo existente também pode ser realizada, e a comparação estrutural entre moléculas diferentes fornece a similaridade relacionada com determinada atividade biológica (Rodrigues, 2001; Carvalho et al., 2003).

Ainda neste sentido, com a modelagem molecular é possível calcular as propriedades e as energias de moléculas associadas, como as envolvidas em uma solvatação ou em uma interação fármaco-receptor. A descoberta do farmacóforo, grupo de átomos que é essencial à resposta biológica do fármaco, também é um dos principais objetivos da modelagem molecular. Ela ainda é usada para estudar as mudanças conformacionais sofridas pela molécula do fármaco frente ao sítio receptor, definindo as conformações potencialmente bioativas (Silva, 2002).

As técnicas de modelagem molecular são baseadas tanto em métodos mecânico-quânticos e de mecânica molecular, como em dados experimentais, servindo de ligação entre teoria e experimento quando se quer, por exemplo, comparar resultados experimentais de um sistema, comparar previsões teóricas para determinado modelo ou fornecer informações não disponíveis a partir de experimentos reais (Tsai, 2002). Tais métodos são tradicionalmente fundamentados na equação de Schrödinger, baseada em funções de onda. A resolução desta equação fornece informações sobre como uma molécula irá reagir ao estresse, tanto *in vitro* como *in vivo*. No entanto, o tempo computacional aumenta quanto maior for o número de átomos. Uma teoria mais recente, denominada “teoria da densidade funcional”, é baseada não em funções de onda, mas na densidade eletrônica, e considera a energia de um sistema como sendo uma função única de densidade eletrônica (Darden & Pedersen, 1993).

O estudo de modelagem molecular pode ser realizado de forma indireta ou direta. No primeiro caso, quando a estrutura do receptor é desconhecida, desenvolve-se um modelo hipotético do sítio receptor (modelo farmacofórico) utilizando o conceito de complementaridade, comparando-se estruturas de moléculas ativas. Após a identificação de um protótipo, a modelagem molecular pode ser útil no desenho estrutural de novas moléculas ativas. Quando necessário à otimização da atividade destas, técnicas de modificação molecular, como bioisosterismo, latenciação, hibridação molecular e simplificação molecular, podem ser aplicadas em seguida. Outra técnica utilizada na modelagem molecular indireta é a modelagem por homologia, que consiste na obtenção de um modelo teórico de receptor baseando-se na sequência primária de enzimas da mesma família. Já no estudo de modelagem molecular de forma direta, quando a estrutura do receptor é conhecida seja através de dados de difração de raios-X ou de ressonância magnética nuclear (RMN), a molécula é ligada ao receptor utilizando-se *docking*, e as interações do complexo ligante-receptor são observadas. O equilíbrio do sistema macromolecular também é estudado, por meio da dinâmica molecular (DM), que permite a observação do movimento de cada átomo e a forma como estes interagem entre si (Barreiro & Rodrigues, 1997; Barreiro & Fraga, 2001).

1.2.1 Métodos de cálculo

Diversos métodos de cálculo podem ser utilizados durante os estudos de modelagem molecular, diferindo-se quanto ao tipo de campo de força (conjunto de funções de energia e parâmetros numéricos associados) e quanto à relação entre velocidade de cálculo e precisão. Eles podem ser clássicos, como a mecânica molecular, ou quânticos, como os métodos *ab initio* e semi-empírico. Os campos da mecânica molecular são totalmente empíricos, enquanto o método *ab initio* é essencialmente teórico e o semi-empírico apresenta parte de seus parâmetros ajustados a dados experimentais (Barreiro & Rodrigues, 1997).

1.2.1.1 Mecânica molecular

Os métodos da mecânica molecular, também denominados “métodos de campo de força”, descrevem as interações entre átomos através da mecânica Newtoniana (ou mecânica clássica), e considera que as moléculas consistem em um conjunto de partículas (átomos) que se mantêm unidas através de forças harmônicas ou elásticas, ou seja, um conjunto de esferas (átomos) unidas por molas (ligações). A mecânica molecular determina a estrutura e a energia moleculares com base no movimento dos núcleos, e as propriedades eletrônicas não são consideradas neste estudo, pois, uma vez que a massa do núcleo é muito maior que a massa dos elétrons, estes se encontrariam em uma distribuição ótima (aproximação de Born-Oppenheimer). Desta forma, a distribuição das cargas se ajusta instantaneamente durante as mudanças de posição dos núcleos (Abraham, 2003).

O campo de força é utilizado na mecânica molecular para calcular a energia de uma geometria de uma molécula e contém diferentes tipos de átomos, parâmetros e equações, necessários ao cálculo de sua energia. As forças de interação entre os átomos são descritas por funções de energia potencial de características estruturais, como comprimentos e ângulos de ligação, ângulos diedros, ligações de hidrogênio, distâncias de van der Waals e interações eletrostáticas. A energia total de uma molécula é a soma de cada uma destas funções (equações) potenciais. Tais equações definem a “superfície de energia potencial” de uma molécula, que consiste na dependência da energia desta molécula com suas coordenadas atômicas, sendo importante para a visualização da relação entre energia potencial e geometria molecular, bem como na compreensão sobre como os programas de química computacional localizam estruturas de interesse. Em outras palavras, a superfície de energia potencial é um conjunto de pontos que representam as geometrias e as correspondentes energias de uma coleção de núcleos atômicos (Rodrigues, 2001). Diferentes funções de energia potencial são utilizadas pelos pacotes de mecânica molecular (AMBER, CHARMM, MM2/MMP2 e PCMODEL-MMX), mas geralmente todos eles apresentam pelo menos estes quatro componentes em seu campo de força: deformação no comprimento de ligação (estiramento), deformação angular, rotações intramoleculares (ângulos de torção), e interações de van der Waals e eletrostáticas. Uma característica do campo de força é a “transferabilidade”, que consiste em

utilizar o mesmo conjunto de parâmetros atômicos como modelo para diversas moléculas relacionadas, permitindo à modelagem realizar previsões (Leach, 2001).

A principal vantagem da mecânica molecular é a rapidez durante o estudo de sistemas complexos, com menor tempo de cálculo, quando comparada à mecânica quântica. No entanto, ela não pode ser aplicada quando a determinação de propriedades relacionadas com efeitos eletrônicos é requerida (Silva, 2002).

A geometria de uma molécula está relacionada com suas coordenadas atômicas e pode ser otimizada através da minimização de energia potencial. A otimização busca pelas geometrias do sistema que correspondem à energia mínima na superfície de energia potencial, situação em que o sistema se encontra em sua forma mais estável. A minimização geralmente leva ao mínimo local mais próximo da estrutura de partida e não ao mínimo global, devido à presença de barreiras de energia entre os dois estados, sendo necessário o desenvolvimento de algoritmos capazes de promover minimizações subseqüentes a partir da estrutura inicial. Também é do interesse da modelagem molecular estudar como um sistema muda de um mínimo de energia para outro (estados de transição), ou como as posições relativas dos átomos podem variar durante uma reação, por exemplo. A análise conformacional é responsável por estudar as conformações que uma molécula pode assumir após deformações de comprimentos e ângulos de ligação, e as influências destas sobre suas propriedades. A exploração do espaço conformacional com o objetivo de identificar as conformações “preferidas” de determinada molécula é denominada de “busca conformacional”, e requer conformações que estejam localizadas nos pontos de mínimo de energia presentes na superfície de energia, visando à determinação do mínimo global. Esta informação pode ser útil, por exemplo, para determinar qual a orientação dos grupamentos funcionais de determinada molécula e como esta pode interagir com seu receptor. Deve-se ressaltar, no entanto, que nem sempre a conformação mais estável é a conformação bioativa, uma vez que mudanças conformacionais podem ocorrer durante a interação da molécula com o receptor (Leach, 2001; Silva, 2002).

Os métodos mais comuns de análise conformacional incluem: busca sistemática, fragmentos moleculares, busca aleatória, critérios de distância (RMN), simulação (Monte Carlo e Dinâmica Molecular), algoritmos evolutivos, *simulated annealing*, e sobreposição (similaridade) molecular. A simulação gera não apenas estruturas localizadas no mínimo de energia, mas sim uma totalidade de estados

que também as inclui, sendo eficiente na transposição de barreiras de energia. A dinâmica molecular é amplamente utilizada e comumente trabalha com temperaturas altas, provocando um incremento de energia cinética que permite ao sistema explorar a superfície de energia, superando barreiras de energia (Leach, 2001).

1.2.1.1.1 Dinâmica molecular

As simulações de DM são importantes no fornecimento de detalhes sobre o movimento de partículas individuais em função do tempo, sendo bastante utilizadas para o estudo da estrutura e da função de biomacromoléculas de interesse. Desde que estes sistemas não se apresentem de forma rígida, mudanças conformacionais provocadas pelo movimento de suas partículas internas são mais facilmente estudadas por dinâmica molecular do que por ensaios experimentais, pois fornecem informações importantes sobre as propriedades do sistema, servindo como auxílio na compreensão de processos bioquímicos complexos. Para isto, durante as simulações de DM, as equações clássicas do movimento (equações de Newton) são resolvidas para cada átomo, determinando sua posição e velocidade, e usando um pequeno incremento de tempo, correspondendo ao tempo fisiológico. As simulações de dinâmica molecular também podem ser utilizadas para descrever um sistema em equilíbrio, incluindo suas propriedades estruturais e de movimento, além da determinação de parâmetros termodinâmicos (Karplus & McCammon, 2002).

A dinâmica molecular é capaz de prever o estado do sistema em qualquer tempo futuro ou passado, a partir de seu estado atual. A energia total do sistema é a soma da energia potencial e da energia cinética e as simulações operam sob condições constantes de número de átomos, volume e temperatura. Além disso, podem ser calculadas propriedades termodinâmicas e informações estruturais como a trajetória que descrevem com o tempo (Abraham, 2003).

O primeiro trabalho publicado utilizando DM para sistemas biológicos foi o estudo de um inibidor da tripsina pancreática bovina, utilizando uma escala de tempo de 9,2 ps (picosegundos), e um sistema contendo aproximadamente 500 átomos, na ausência de moléculas de solventes devido às limitações do poder computacional (Karplus & McCammon, 2002). Com os avanços nos recursos computacionais, sistemas contendo 10^4 até 10^6 átomos podem ser estudados hoje, incluindo

moléculas de solvente e ambiente membranar, utilizando escalas de tempo de mais de 10 ns (nanossegundos) (Sanbonmatsu & Tung, 2007). Diversos campos de força são relatados na literatura para dinâmica molecular, sendo que os mais comumente utilizados são CHARMM (MacKerell & Karplus, 1998), AMBER (Cornell, 1995), GROMOS (Ott & Meyer, 1996) e OPLS (Jorgensen et al., 1997).

1.2.2 Métodos *in silico* aplicados ao estudo do metabolismo humano

O conhecimento das propriedades farmacocinéticas e da toxicidade de determinado xenobiótico, envolvendo absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), é importante durante o estágio inicial do desenvolvimento de um novo candidato a protótipo de fármaco, permitindo que candidatos potencialmente tóxicos sejam eliminados antes dos estágios clínicos avançados (Korolev et al., 2003). Estudos com enfoque no destino metabólico de determinada substância são capazes de prever as subunidades da molécula que são suscetíveis ao metabolismo. Para isto, metodologias *in silico* têm sido desenvolvidas para o estudo do perfil farmacocinético e das propriedades toxicológicas de moléculas de interesse (Langowski & Long, 2002; Zhou et al., 2006).

As ferramentas utilizadas na previsão de tais propriedades envolvem os estudos da relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR), o uso de programas contendo banco de dados e a modelagem molecular. Os estudos de QSAR utilizam ferramentas estatísticas para pesquisar a correlação entre as propriedades da molécula em estudo e de diversas moléculas que tiveram suas propriedades obtidas através de dados experimentais. Outro método utilizado para prever prováveis sítios metabólicos é o uso de programas, como o MetabolExpert, o Meteor, o META e o MetaDrug, que utilizam bancos de dados contendo informações metabólicas a partir de uma variedade de espécies de mamíferos, prevendo as possibilidades metabólicas para determinado xenobiótico. Sendo assim, algumas questões devem ser levadas em consideração durante este estudo, como a variabilidade no destino metabólico entre indivíduos da mesma espécie, dependendo do nível de expressão de determinada enzima e dos polimorfismos durante a codificação enzimática, e da variação entre dados de estudos *in vivo* e *in vitro* (Korolev et al., 2003; Van de Waterbeemd & Gifford, 2003).

Já os estudos de modelagem molecular são baseados na estrutura cristalográfica de enzimas envolvidas no metabolismo, como as do citocromo P-450, durante os quais informações importantes como distância de ligação e aspectos estruturais envolvidos na interação entre os resíduos da enzima e o ligante, bem como a orientação do substrato dentro do sítio ativo da enzima, são fornecidos através do *docking* de tais moléculas (Julsing et al., 2008).

1.2.2.1 Sistema enzimático citocromo P-450 (CYP450)

O citocromo P-450 (CYP450) é uma hemoproteína que, quando em sua forma reduzida e complexada com monóxido de carbono, apresenta um único pico de absorvância em 450 nm (pico de Soret), daí sua denominação. Sua primeira evidência foi relatada em microsomas hepáticos de rato, em 1958, e sua função foi descoberta em 1963, durante o estudo da hidroxilação na posição C-21 da 17-hidroxi-progesterona, catalisada por microsomas do córtex adrenal. Este sistema enzimático representa uma das maiores famílias de proteínas enzimáticas, e está presente nas membranas de retículo endoplasmático (microsoma) e de mitocôndria de todos os organismos eucarióticos (animais, plantas e fungos), e em alguns organismos procarióticos (bactérias) na forma solúvel. O primeiro citocromo purificado e cristalizado foi o da bactéria *Pseudomonas putida*, complexado com cânfora e denominado P450cam, o qual foi responsável por auxiliar na compreensão do ciclo catalítico e da estrutura do complexo substrato-sítio ativo destas enzimas, aplicando-se este resultado a outros CYPs (Omura, 1999).

O grupo heme é a protoporfirina IX, contendo o átomo de ferro como centro ativo das catálises, o ânion tiolato (S⁻) de um resíduo de cisteína conservado (resíduo 442) como quinto ligante do ferro e uma molécula de solvente como sexto ligante axial. Quando ligado ao oxigênio e em sua forma ativa, o grupo heme é denominado *Compound I*. As catálises do CYP450 são responsáveis, basicamente, pela inserção de um átomo de oxigênio na molécula de seu substrato, tendo a hidroxilação como principal exemplo de reação. No entanto, podem ocorrer, ainda, reações de dealquilação, desidrogenação, dimerização, clivagem de ligação C-C, além de reações menos comuns, como redução e isomerização, apresentando uma grande variedade de substratos. Tais reações se iniciam com a ligação do substrato

ao sítio ativo, próximo ao grupo heme, com deslocamento do sexto ligante (solvente), seguida da redução do CYP450 da forma férrica (Fe^{3+}) para a forma ferrosa (Fe^{2+}), através do recebimento de um elétron vindo do NAD(P)H, transportado pelo NAD(P)H-citocromo P450-redutase. Em seguida, uma molécula de oxigênio se liga ao ferro-heme formando o complexo oxigênio-citocromo-substrato, e o recebimento de outro elétron provoca redução e ativação do oxigênio. A reação é finalizada pela transferência de um átomo de oxigênio ao substrato, e pelo recebimento de dois prótons pelo segundo átomo de oxigênio, resultando na liberação de água e substrato oxidado (produto) (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000; Guengerich & Isin, 2008).

Em mamíferos, o CYP450 apresenta as funções de esteroidogênese, estando presente nas gônadas e na glândula adrenal. Além disso, participa da cascata do ácido aracdônico, produzindo prostaglandinas, e é um dos principais responsáveis pela detoxificação de xenobióticos, a qual ocorre primariamente no fígado. Desta forma, cada CYP450 apresenta substratos preferidos, como esteróides, hidrocarbonetos poliaromáticos e ácidos graxos, podendo-se concluir que existe um método único de reconhecimento de substrato para cada isoforma, apesar de suas estruturas semelhantes. As enzimas que metabolizam fármacos também são capazes de oxidar compostos quimicamente diversos, apresentando, ainda, régio- e estereosseletividade (Peterson & Graham, 1998; Stout, 2004).

As enzimas do citocromo P-450 são nomeadas e classificadas com base na sequência de aminoácidos. Seus genes são identificados pela abreviação *CYP*, seguida de um número para as famílias (grupo de proteínas com mais de 40% de identidade na sequência de aminoácidos), uma letra para as subfamílias (mais de 55% de identidade), e um número para o gene, como, por exemplo, CYP106A2 (Hannemann et al., 2007). Apesar de suas sequências de aminoácidos serem extremamente diversas, com níveis de identidade de apenas 16%, em alguns casos, e de suas estruturas secundária e terciária também serem variáveis, existe um padrão estrutural compartilhado entre todos os P450s, contendo regiões conservadas e não-conservadas. As enzimas geralmente apresentam quatro folhas β e treze hélices α , podendo ou não haver a presença da hélice J' e da folha $\beta 5$ em algumas isoformas. A região conservada consiste nas hélices D, E, I, J, K e L, duas folhas β , e uma espiral denominada "meandro". A região central da hélice I, que contém um resíduo de treonina altamente conservado, corresponde ao caminho de

transferência de próton na porção distal do grupo heme. A hélice K também contém uma sequência totalmente conservada, a qual está localizada na subunidade proximal do grupo heme, e está provavelmente envolvida na estabilização da estrutura do núcleo enzimático. As folhas $\beta 1$ (com cinco fitas) e $\beta 2$ (com duas fitas) também são conservadas, e ajudam a formar um canal hidrofóbico de acesso do substrato. Existe, ainda, uma sequência conservada na região proximal do grupo heme, contendo o resíduo de cisteína altamente conservado, o qual representa o quinto ligante (axial) do ferro-heme (Stout, 2004).

As regiões não-conservadas ou variáveis geralmente estão associadas com a ligação e reconhecimento dos substratos e dos grupos doadores de elétrons. As primeiras estão localizadas próximo ao canal de acesso do substrato e do sítio catalítico, e foram identificadas por Gotoh (Gotoh, 1992) através de comparações de sequências entre membros da família CYP2 e o P450cam de *Pseudomonas putida*, sendo denominadas de *SRS* (*Substrate Recognition Site*). Estas regiões são flexíveis e se movem a favor da ligação do substrato e da reação catalítica. Elas consistem nos loops B-B' e B'-C (SRS-1), que estão alinhados com o sítio ativo; as hélices F e G, e a alça F-G (SRS-2 e SRS-3), formando parte de um canal de acesso; a região entre a hélice K e a folha $\beta 1$ (SRS-5); o final da folha $\beta 4$ (SRS-6), localizado dentro do sítio ativo; e a região N-terminal da fita 4 da folha $\beta 1$. A porção central da hélice I (SRS-4) também está relacionada com a ligação do substrato e é importante para o mecanismo de ação, sendo, no entanto, uma região conservada (Stout, 2004; Fishelovitch et al., 2007).

1.2.2.1.1 CYP3A4

A isoforma CYP3A4 (Figura 12) consiste na principal isoforma humana pertencente às enzimas do CYP450 e a mais abundante nos microsomas hepáticos humanos, sendo responsável por metabolizar mais de 50% dos fármacos em uso. Sua estrutura cristalográfica foi publicada pela primeira vez em 2004, por dois grupos independentes (Williams et al., 2004; Yano et al., 2004), observando-se grande semelhança entre elas. A principal característica do CYP3A4 são as hélices curtas F e G, com sequências longas entre elas e que parecem interagir com a membrana, e um centro hidrofóbico formado por resíduos de fenilalanina,

compreendendo a parte superior do sítio ativo. Diferenças significativas entre esta isoforma e outros CYP's estão relacionadas com as regiões das hélices D a H, e B a C. Além disso, CYP3A4 apresenta um sítio ativo relativamente grande quando comparado com outras isoformas, como CYP2C8, apesar de ele ser menor que o esperado na ausência de substrato ligado, sugerindo que ocorra uma mudança conformacional na presença de ligantes. Tal fato é reflexo de diferenças significantes nas conformações das regiões SRS-1, SRS-2 e SRS-5, sendo consistente com a oxidação de alguns dos maiores substratos reconhecidos pelo CYP450, como a ciclosporina, a bromocriptina e os macrolídeos, ou com a presença simultânea de dois ou mais ligantes pequenos no sítio ativo (Ekroos & Sjögren, 2006).

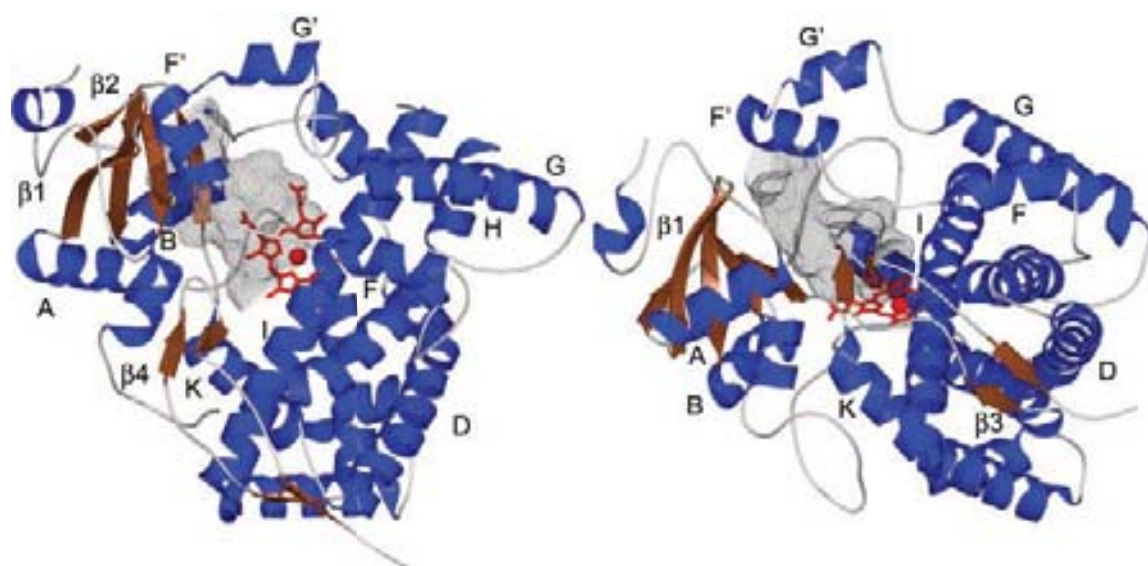


Figura 12: Duas representações das estruturas secundária e terciária do CYP3A4 (adaptado de Yano et al., 2004).

Um sítio ativo largo também é consistente com as cooperatividades homotrópica e heterotrópica observadas durante o mecanismo de ação da isoforma CYP3A4. Sabe-se que a enzima apresenta atividade cinética atípica para diversos substratos, incluindo testosterona, estradiol, progesterona, carbamazepina, diazepam, e midazolam. Isto significa que, neste caso, dois substratos são requeridos para a formação de um complexo com a enzima, para que a reação

oxidativa aconteça. Desta forma, duas moléculas do mesmo substrato (cooperatividade homotrópica) ou de dois substratos diferentes (cooperatividade heterotrópica) podem se ligar simultaneamente à enzima, permitindo a oxidação de um deles (Park et al., 2005; Fishelovitch et al., 2007).

1.2.3 O programa NAMD

NAMD é um programa desenvolvido para a realização de simulações de DM com sistemas biomacromoleculares, e, juntamente com o programa de visualização gráfica, VMD, permite a obtenção de informações sobre estruturas contidas em ambientes realísticos de 100000 átomos ou mais. Através das estruturas cristalográficas do sistema em estudo, as simulações, com controle de temperatura e pressão, geram trajetórias, e dados das propriedades envolvidas com a movimentação dos átomos são obtidos. O programa NAMD também permite a transposição de barreiras de energia entre diferentes estados de equilíbrio, como a que ocorre durante a ligação e a dissociação de um substrato, através da aplicação de uma força constante externa ao sistema para a indução de seu movimento, utilizando a ferramenta *Steered Molecular Dynamics* (SMD), sem a qual seria difícil reproduzir tais eventos nas escalas de tempo da dinâmica molecular atual (Phillips et al., 2005).

1.3 Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

A AIDS (do inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome*) é uma doença pandêmica que foi reconhecida pela primeira vez em 1981 através da identificação de casos de infecções oportunistas severas raras em homens homossexuais, como a pneumonia por *Pneumocystis carinii*, que acomete principalmente pacientes imunodeprimidos (Gottlieb et al., 1981). A causa da infecção foi atribuída, inicialmente, ao citomegalovírus (CMV), devido às altas taxas deste vírus presentes em todos os casos e, apenas dois anos depois, seu verdadeiro agente etiológico foi isolado de um paciente infectado (Barre-Sinoussi et al., 1983). Em 1984, o vírus foi reconhecido por um grupo francês e pesquisadores do *US National Institute of*

Health, liderados por Robert C. Gallo, como sendo o agente causador da AIDS (Fauci, 2003). Ele foi originalmente denominado de HTLV-III (*Human T-Lymphotropic Virus*) e LAV (*Lymphadenopathy Associated Virus*), sendo hoje oficialmente denominado de HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) (Horwitz, 1993).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o número estimado de pessoas portadoras do HIV em todo o mundo foi de 33,2 milhões em 2007, das quais 67% viviam na África subsaariana (UNAIDS, 2007). Menos de 5% dos que poderiam se beneficiar com a terapia por combinação de anti-retrovirais está recebendo a mesma. Estes fármacos têm a capacidade de melhorar substancialmente a qualidade da saúde humana e produzir expectativas de vida próximas do normal para alguns pacientes (Lee et al., 2001). No Brasil, foram notificados 474.273 casos de 1981 a junho de 2007, com um total de 192.709 óbitos até 2006 (Boletim epidemiológico, 2007). As estimativas apontam para um aumento no número de portadores do HIV em todo o mundo. No entanto, deve-se ressaltar que parte deste aumento está relacionada com os avanços no diagnóstico e, no futuro, com um maior número de pessoas tendo acesso à terapia anti-retroviral e vivendo por mais tempo portadoras do vírus (World Health Organization, 2008).

O HIV é um retrovírus (composto de ácido ribonucléico, RNA) (Gallo, 1988), pertencente à subfamília *Lentivirinae*, e que se desenvolve em mamíferos causando infecção crônica persistente com início gradual dos sintomas clínicos. Existem duas famílias principais do vírus: HIV-1 e HIV-2. A maioria das epidemias envolve o HIV-1, enquanto o HIV-2 está concentrado na África ocidental. Ambos têm similar sensibilidade *in vitro* para a maioria dos fármacos antivirais, embora os inibidores da transcriptase reversa não-nucleosídicos (NNRTIs) sejam específicos para HIV-1 e não possuam atividade contra HIV-2 (Flexner, 2006). O HIV-1 é geneticamente diverso, sendo dividido em três grupos (M, O e N). Dentro do grupo M, são conhecidos pelo menos nove subtipos geneticamente distintos (A, B, C, D, F, G, H, J e K), sendo que a maioria das infecções por HIV-1 envolve os subtipos B e C (Barret, 2007).

O HIV apresenta um pequeno genoma RNA, sendo que duas cópias estão contidas em um nucleocapsídeo circundado por uma bicamada lipídica, ou envelope, o qual é derivado da membrana plasmática da célula hospedeira. O genoma viral codifica todas as proteínas necessárias à sua replicação: o gene *gag* codifica uma poliproteína que é processada para originar a maioria das proteínas estruturais dos

vírus, como p17 (matriz), p24 (capsídeo), p7 (nucleocapsídeo) e p6; *pol* codifica três atividades enzimáticas importantes – uma DNA (ácido desoxirribonucleico) polimerase RNA-dependente ou transcriptase reversa com atividade sobre RNA, a protease, e a integrase viral; e *env* codifica as proteínas transmembranar (gp41) e superficial (gp120) do envelope, responsáveis pela ligação e entrada na célula hospedeira. Muitos genes pequenos codificam proteínas regulatórias que intensificam a produção do vírion ou combatem as defesas dos hospedeiros. Estes incluem *tat*, *ver*, *nef*, e *vpr* (Greene & Peterlin, 2002).

1.3.1 Ciclo da replicação viral

O tropismo do HIV é controlado pela proteína do envoltório gp160 (*env*). O alvo principal para a ligação do *env* é o receptor CD4 presente nos linfócitos e macrófagos, embora a entrada na célula também necessite da ligação a um co-receptor, geralmente o receptor CCR5 ou CXCR4 (Greene & Peterlin, 2002). O CCR5 está presente na linhagem de células macrófagos. A maioria das pessoas infectadas abriga predominantemente o vírus CCR5-trópico; acredita-se que este seja o responsável pela transmissão sexual do HIV e que as primeiras células infectadas neste caso expressem esse co-receptor. A troca do CCR5 pelo CXCR4 está associada com o avanço da doença, e a afinidade do HIV-1 pelo CXCR4 permite a infecção dos linfócitos T (Berger et al., 1999).

O domínio gp41 de *env* controla a fusão da bicamada lipídica do vírus com a célula hospedeira. Após a fusão, todo o RNA viral entra no citoplasma, onde sofre replicação para uma fita dupla de RNA-DNA de vida curta; o RNA original é degradado pela Rnase H para permitir a criação de uma cópia em fita dupla do DNA completo do vírus. Devido ao fato de a transcriptase reversa do HIV ser predisposta a erros e não possuir a função de revisão, mutações são muito frequentes (Coffin, 1995). O DNA do vírus é transportado para dentro do núcleo, onde é integrado a um cromossomo hospedeiro através da integrase viral (Greene & Peterlin, 2002), resultando na transcrição do RNA e na tradução das proteínas virais, as quais são produzidas na forma de precursores de poliproteínas. As poliproteínas, juntamente com o RNA viral, movem-se para a superfície celular e formam novas partículas virais, levando parte da membrana da célula hospedeira. Estas novas partículas

tornam-se infectantes quando a enzima viral protease cliva suas poliproteínas, produzindo as proteínas e enzimas virais estruturais (Souza & Almeida, 2003).

1.3.2 Terapia anti-retroviral

Segundo Tierney e colaboradores (Tierney et al., 2006), existem quatro categorias de tratamento contra a infecção por HIV: terapia para infecções oportunistas; tratamento anti-retroviral; fatores estimulantes hematopoiéticos; e profilaxia para as infecções oportunistas. No período anterior ao uso dos anti-retrovirais, os pacientes necessitavam de tratamento durante toda a vida contra várias infecções, incluindo retinite por citomegalovírus, meningite criptocócica e toxoplasmose. Hoje, no entanto, essa terapia de manutenção contra as infecções oportunistas pode ser limitada em pacientes que têm uma boa resposta aos anti-retrovirais.

A terapia anti-retroviral se iniciou com a aprovação da zidovudina (3'-azido-2',3'-didesoxitimidina ou AZT), um análogo nucleosídico que foi originalmente sintetizado por Horwitz, da Fundação contra o Câncer de Michigan, com o objetivo de avaliar sua atividade antitumoral (Horwitz et al., 1964). Apenas em 1985, comprovou-se sua atividade anti-HIV *in vitro* durante uma triagem utilizando vários compostos anteriormente sintetizados para outras finalidades (Fauci, 2003). Seu mecanismo de ação está relacionado com a inibição, pela sua forma trifosfato, da enzima viral transcriptase reversa (TR) de HIV-1, por competição com o nucleotídeo endógeno, timidina-5'-trifosfato (Mitsuya et al., 1985). Já em 1987, o AZT foi aprovado pela agência norte-americana responsável pelo controle sobre produtos farmacêuticos e alimentícios FDA (*Food and Drug Administration*), baseado em um pequeno experimento clínico (Fischl et al., 1987), e comercializado pelos laboratórios Burroughs-Wellcome (hoje GlaxoSmithKline, GSK). A rota sintética utilizada para a comercialização do AZT foi a de Horwitz, tendo a timidina como substância de partida e rendimento global de 30% (Souza & Almeida, 2003).

Ainda segundo Souza e Almeida (Souza & Almeida, 2003), os estudos de estrutura-atividade que se seguiram após a aprovação do AZT determinaram os grupos farmacofóricos e toxicofóricos dos análogos nucleosídicos inibidores da TR (NRTIs), sendo decisivos para a descoberta de novos compostos pertencentes à

esta classe, como estavudina (d4T), zalcitabina (ddC) e didanosina (ddI), além de outros que também estão no mercado hoje, como lamivudina (3TC), abacavir (ABC), e tenofovir.

Até 1998, novos fármacos anti-retrovirais foram aprovados, dentre eles os NNRTIs e os inibidores de protease (PIs). Os NNRTIs são inibidores da transcriptase reversa não-competitivos, que não necessitam da fosforilação intracelular para se tornarem ativos, e que foram identificados através de *screenings* repetitivos utilizando a enzima viral purificada. São eles: nevirapina, delavirdina e efavirenz (Flexner, 2006). Os PIs, por sua vez, foram descobertos através de estudos de biologia estrutural moderna, tendo o saquinavir como primeiro representante. O indinavir é outro composto pertencente a esta classe de anti-retrovirais, cujo desenvolvimento foi baseado em estudos de modelagem molecular através da purificação e determinação da estrutura cristalográfica do complexo enzima-inibidor. Estes fármacos são ativos contra HIV-1 e HIV-2, e atuam inibindo a protease viral, a qual é responsável por clivar as poliproteínas a fim de produzir proteínas maduras, provocando, desta forma, a formação de partículas virais defeituosas e imaturas. São representados também pelo ritonavir, nelfinavir, amprenavir, fosamprenavir, lopinavir e atazanavir (Fauci, 2003).

Apesar do grande avanço no combate ao HIV, alguns problemas têm sido observados durante o tratamento, como os riscos de toxicidade devido à quimioterapia combinada em longo prazo, a necessidade de adesão total aos regimes prescritos, e o alto custo da terapia por longos períodos, provocando, desta forma, a necessidade de uma relação custo-benefício, que favorece apenas os pacientes com baixas contagens de CD4 e/ou alta carga viral (Tierney et al., 2006).

A resistência viral à terapia empregada é outro problema sério. Existe uma grande probabilidade de alguns indivíduos infectados hospedarem vírus que apresentem mutação simples de aminoácidos, conferindo-lhes algum grau de resistência a alguns anti-retrovirais conhecidos, devido ao alto índice de mutações pelo HIV e ao grande número de vírions infecciosos (Coffin, 1995). Consequentemente, o tratamento com apenas um composto anti-retroviral provoca a formação de vírus resistentes, em alguns casos dentro de poucas semanas (Wei et al., 1995). Para prevenir tais resistências, é necessária uma combinação dos agentes ativos. Atualmente, todas as terapias anti-retrovirais usam combinações de tais agentes. Modelos matemáticos da replicação do HIV sugerem que três é o

número mínimo de fármacos necessários para garantir supressão efetiva da replicação do HIV, por muito tempo, sem causar resistência (Muller & Bonhoeffer, 2003).

1.3.2.1 Estavudina

A estavudina (2',3'-didesidro-2',3'-didesoxitimidina ou d4T) (Zerit[®]) é um anti-retroviral pertencente à classe dos NRTIs, sendo um análogo nucleosídico da desoxitimidina cujo grupo 3'-hidroxila foi substituído por uma dupla ligação entre os carbonos C-2' e C-3' da pentose. Assim como o AZT, a d4T foi primeiramente sintetizada por Horwitz e colaboradores. A primeira etapa deste processo envolveu o tratamento da desoxitimidina com excesso de cloreto de metanosulfonil (MsCl), em piridina, produzindo o 3',5'-mesil-2',3'-didesoxitimidina. Em seguida, este reagiu com hidróxido de sódio, em água ou etanol, gerando 2,3'-anidrotimidina, o qual, em contato prolongado com a base, foi convertido no correspondente oxetano. Finalmente, o tratamento com *tert*-butilato de potássio (*t*-BuOK) em dimetilsulfóxido (DMSO) resultou na obtenção da estavudina (Figura 13) (Horwitz et al., 1966).

A atividade anti-HIV da estavudina foi comprovada simultaneamente por grupos nos Estados Unidos, na Bélgica e no Japão (Hamamoto et al., 1987; Riddler et al., 1995), e comparada à atividade do AZT (Horwitz, 1993), sendo aprovada pelo FDA para o tratamento contra o HIV em 1994, e comercializada pelos laboratórios Bristol-Myers Squibb, sob o nome comercial Zerit[®] (Riddler et al., 1995).

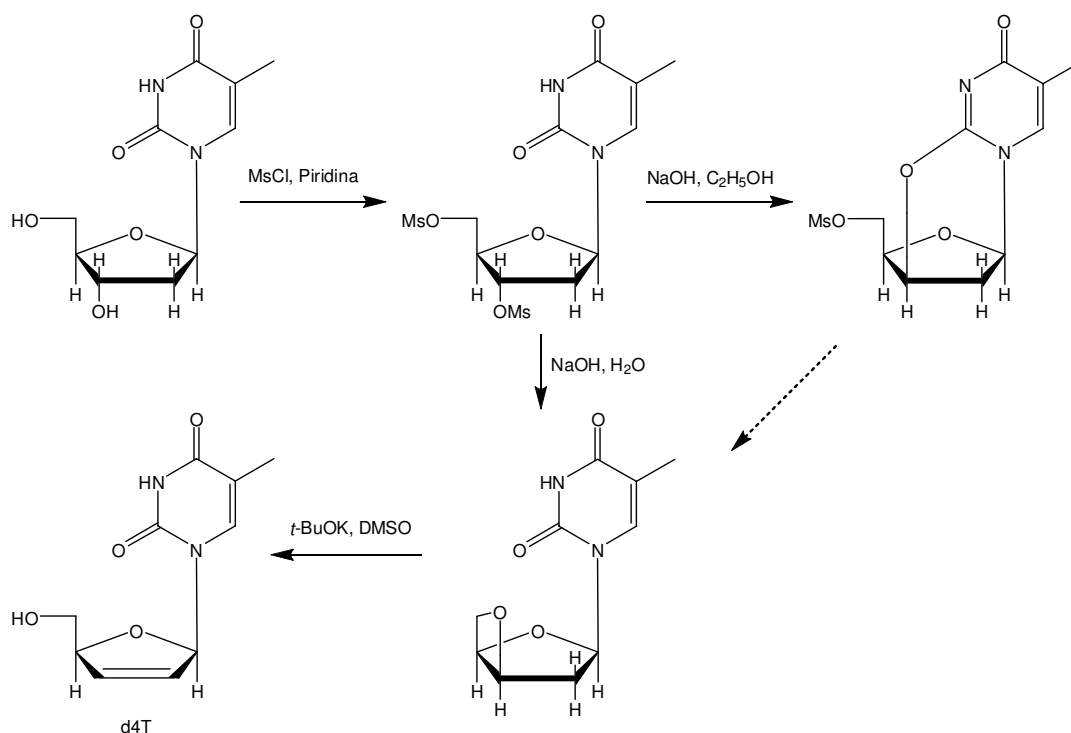


Figura 13: Síntese da estavudina (adaptado de Horwitz et al., 1966).

Assim como os outros análogos nucleosídicos inibidores da transcriptase reversa, d4T necessita ser primeiramente fosforilada no meio intracelular para tornar-se ativa. Tal processo inicia-se com a formação de estavudina-5'-monofosfato (d4T-MP), através da enzima timidina quinase, sendo novamente fosforilada pela timidilato quinase, produzindo estavudina-5'-difosfato (d4T-DP). Finalmente, estavudina-5'-trifosfato (d4T-TP) é obtida pela fosforilação da d4T-DP através da nucleosídeo difosfato quinase, sendo incorporada pela transcriptase reversa no DNA viral e, desta forma, inibindo o término de sua elongação por competição com a desoxitimidina-5'-trifosfato, já que a ligação 3'-5'-fosfodiéster com o nucleotídeo seguinte não é formada devido à perda do grupo 3'-hidroxil (Balzarini et al., 1989; Riddler et al., 1995).

A estavudina é bem absorvida, e sua ligação às proteínas plasmáticas é menor que 5% (Hurst & Noble, 1999). Ela penetra bem no líquido cefalorraquidiano, e atravessa facilmente a placenta humana (Odinecs et al., 1996). Após fosforilação

intracelular, aproximadamente metade da d4T administrada é eliminada na urina sob forma inalterada, enquanto 3% são degradados em timina e ácido beta-aminoisobutírico (BAIBA), não se sabendo o destino metabólico do restante (Cretton et al., 1993). A presença de um conjugado glicuronídeo da estavudina, detectada na urina de macacos Rhesus por Schinazi e colaboradores (Schinazi et al., 1990), permanece, ainda, controversa (Figura 14). O destino metabólico de outros inibidores de transcriptase reversa nucleosídicos é apresentado na Tabela 2 (item 1.3.3).

A principal toxicidade provocada pela d4T é a neuropatia periférica, caracterizada por inflamação dos nervos periféricos, e que provavelmente é provocada pela inibição da síntese do DNA mitocondrial (toxicidade mitocondrial), sendo exacerbada pelo aumento da concentração do anti-retroviral (Riddler et al., 1995; Cherry et al., 2003). A toxicidade mitocondrial também está envolvida com a acidose láctica e a esteatose hepática, principalmente quando a estavudina está associada com a didanosina (Miller et al., 2000).

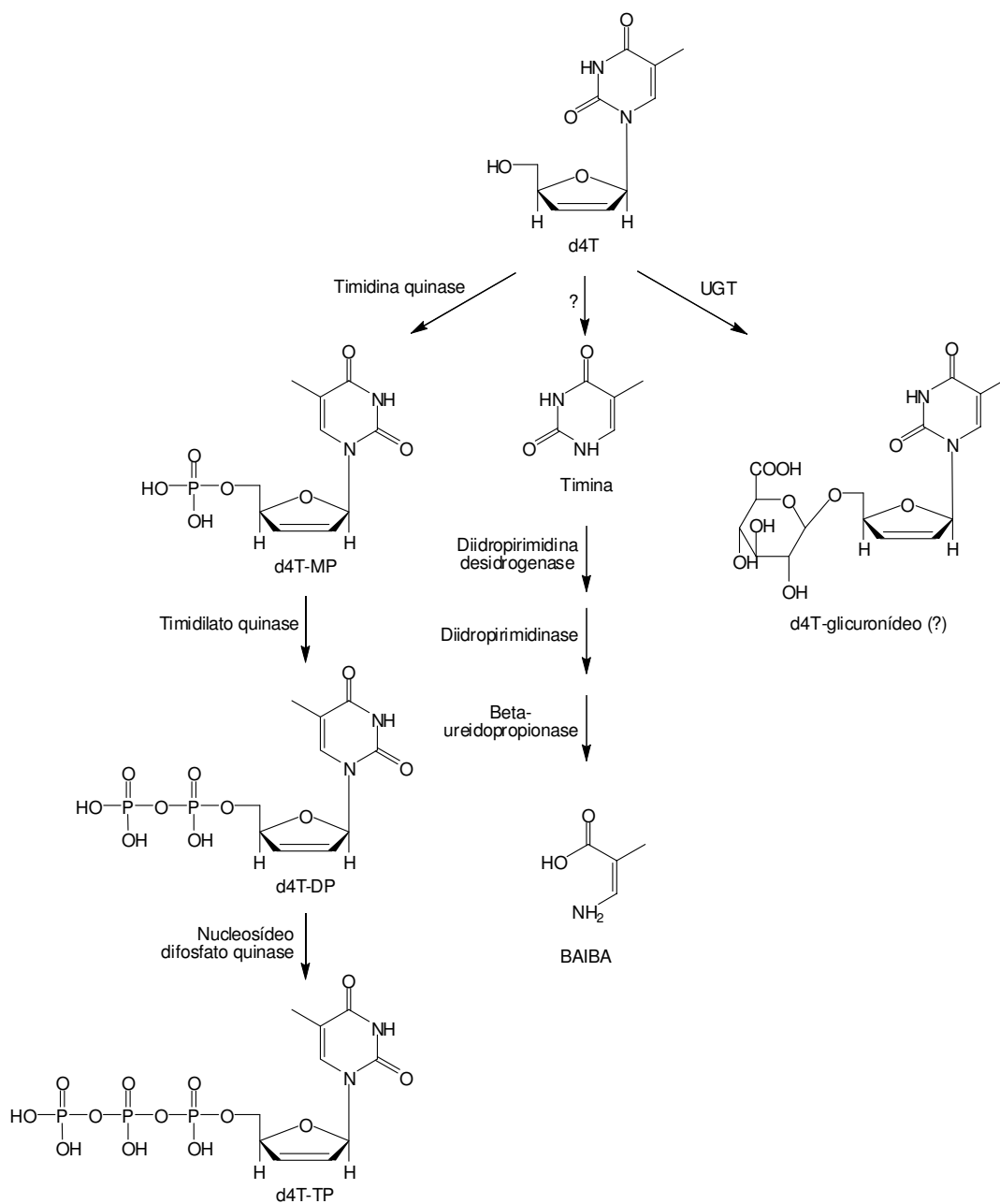


Figura 14: Metabolismo proposto para a estavudina (adaptado de Schinazi et al., 1990; Cretton et al., 1993).

1.3.3 Metabolismo de fármacos anti-HIV

Desde a descoberta dos anti-retrovirais, estudos que envolvem o seu metabolismo têm sido realizados, principalmente na tentativa de explicar os mecanismos tóxicos relacionados com estes fármacos que revolucionaram o tratamento contra o vírus HIV (Li & Chan, 1999). Com a busca por novos agentes terapêuticos, o número de estudos do metabolismo desta classe de fármacos também tem aumentado como parte de seu desenvolvimento, garantindo sua segurança e eficácia, como pode ser observado graficamente (Figura 15) através do número de publicações desde 1987, obtido pela busca no programa “SciFinder”, utilizando a expressão “antiretroviral metabolism”. Os destinos metabólicos dos inibidores de transcriptase reversa nucleosídicos (IsTRN), classe a que pertence a estavudina, estão apresentados na Tabela 2.

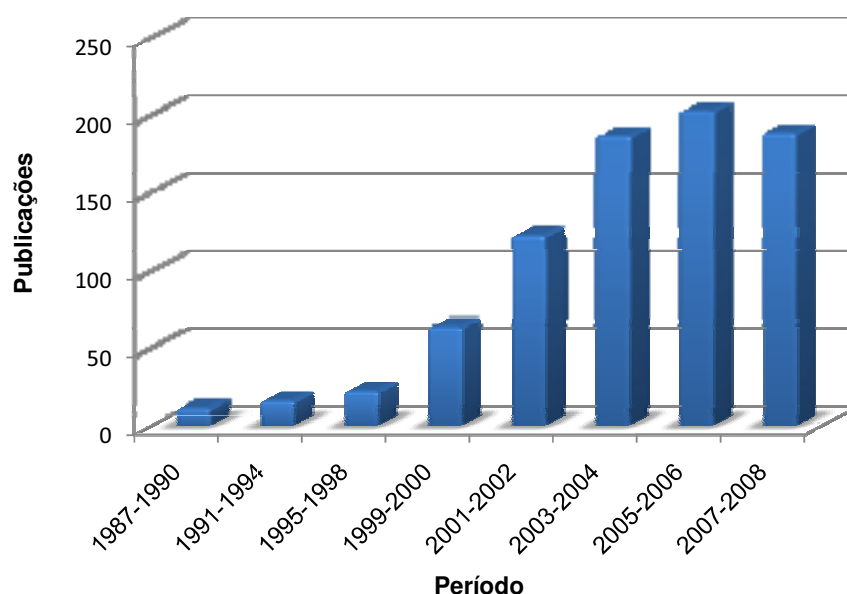


Figura 15: Representação gráfica do número de publicações sobre metabolismo de anti-retrovirais, no período de 1987 a 2008, obtido através de busca no SciFinder utilizando a expressão “antiretroviral metabolism”.

Tabela 2: Destinos metabólicos dos inibidores de transcriptase reversa nucleosídicos.

Nome	Destino metabólico	Referências
<i>Inibidores de transcriptase reversa nucleosídicos</i>		
Zidovudina (AZT)	fosforilação intracelular; glicuronidação; redução do grupo azido; hidroxilação; glicosilação	Cretton et al. 1991; Veal & Back, 1995; Li & Chan, 1999; Nunes, 2008
Didanosina (ddI)	fosforilação intracelular; hidrólise	Kaul et al., 1993; Navé et al., 1994
Zalcitabina (ddC)	fosforilação intracelular	Li & Chan, 1999
Lamivudina (3TC)	fosforilação intracelular	Johnson et al., 1998
Abacavir (ABC)	fosforilação intracelular; carboxilação; glicuronidação	Faletto et al., 1997; McDowell et al., 1999

Os NRTIs são pró-fármacos didesoxinucleosídeos, análogos de nucleosídeos endógenos, que necessitam ser primeiramente fosforilados dentro da célula hospedeira para se tornarem ativas contra a enzima transcriptase reversa. A fosforilação ocorre em três etapas: fosforilação pela nucleosídeo quinase para formar didesoxinucleosídeo monofosfato; fosforilação pela nucleosídeo monofosfato quinase para formar didesoxinucleosídeo difosfato; e fosforilação pela nucleosídeo difosfato quinase para formar didesoxinucleosídeo trifosfato, sendo este o responsável pela atuação sobre a enzima transcriptase reversa por competição com o nucleotídeo endógeno, impedindo o término da elongação do DNA viral (Li & Chan, 1999).

A zidovudina é o agente anti-HIV com maior enfoque nos estudos do metabolismo. Existem três destinos metabólicos principais da zidovudina: fosforilação intracelular, glicuronidação e redução (Figura 16). Seu metabolismo intracelular, envolvendo a formação de zidovudina-5'-trifosfato (AZT-TP), é limitado nas duas últimas etapas de fosforilação devido a uma ineficiência da enzima timidina quinase em formar zidovudina-5'-difosfato (AZT-DP), causando acúmulo de zidovudina-5'-monofosfato (AZT-MP) dentro da célula, e servindo como depósito para formação de AZT-TP. As altas concentrações de AZT-MP inibem a timidilato

quinase, provocando diminuição da concentração intracelular de desoxitimidina-5'-trifosfato e aumento da atividade anti-retroviral. Por outro lado, o acúmulo de AZT-MP intracelular pode estar relacionado com a toxicidade observada durante o uso da zidovudina, representada principalmente por toxicidade hematológica, provocada, provavelmente, pela inibição da ADN polimerase mitocondrial γ (Veal & Back, 1995).

A zidovudina sofre rápido metabolismo hepático de primeira passagem, com formação de zidovudina-5'-glicuronídeo (GAZT), um metabólito inativo (Li & Chan, 1999). A enzima UGT2B7 é uma das responsáveis pela conjugação da zidovudina, e está presente no fígado, em sua maioria (Barbier et al., 2000; Turgeon et al., 2003). Em estudos utilizando preparações microsossomais humanas, concluiu-se que a glicuronidação da zidovudina não depende do sexo ou da idade, mas o polimorfismo apresentado pela isoforma UGT2B7 pode contribuir para as variações interindividuais observadas na concentração plasmática do AZT e de seu metabólito conjugado. No entanto, não se deve descartar que tais variações podem estar envolvidas com a glicuronidação catalisada por outras isoformas, bem como com a etapa de fosforilação intracelular da zidovudina, a qual implica em uma maior ou menor disponibilidade do substrato para o metabolismo hepático. Ainda segundo os estudos com microsossomas hepáticos, a extensão do metabolismo do AZT pela UGT pode variar de 60 a 75% em humanos, enquanto em ratos ela é de apenas 10% (Naritomi et al., 2003), devido à maior eficiência catalítica desta enzima nos primeiros (Veal & Back, 1995).

O terceiro destino metabólico da zidovudina consiste na redução de seu grupo azido, provavelmente mediado tanto por isoenzimas do citocromo P450 como pela NADPH-citocromo P450 redutase e pela citocromo b5 redutase, resultando na formação de 3'-amino-3'-desoxitimidina (AMT). Em estudos utilizando hepatócitos de ratos e microsossomas hepáticos de ratos e humanos, observou-se a participação das subfamílias CYP2B, CYP3A e CYP4A nesta reação, comprovada através do aumento da formação do AMT com o uso de indutores destas enzimas. A isoforma CYP2C9 também parece estar envolvida neste processo. Estes estudos indicaram, ainda, que o AMT é de cinco a sete vezes mais tóxico para as células hematopoiéticas que o AZT, comprovando seu papel na citotoxicidade deste anti-retroviral, observada em pacientes. Em outro estudo semelhante, foi encontrado o conjugado glicuronídeo do AMT (GAMT), formado a partir da redução da zidovudina-

5'-glicuronídeo, descartando o AMT como sendo um substrato da UGT (Cretton et al., 1991).

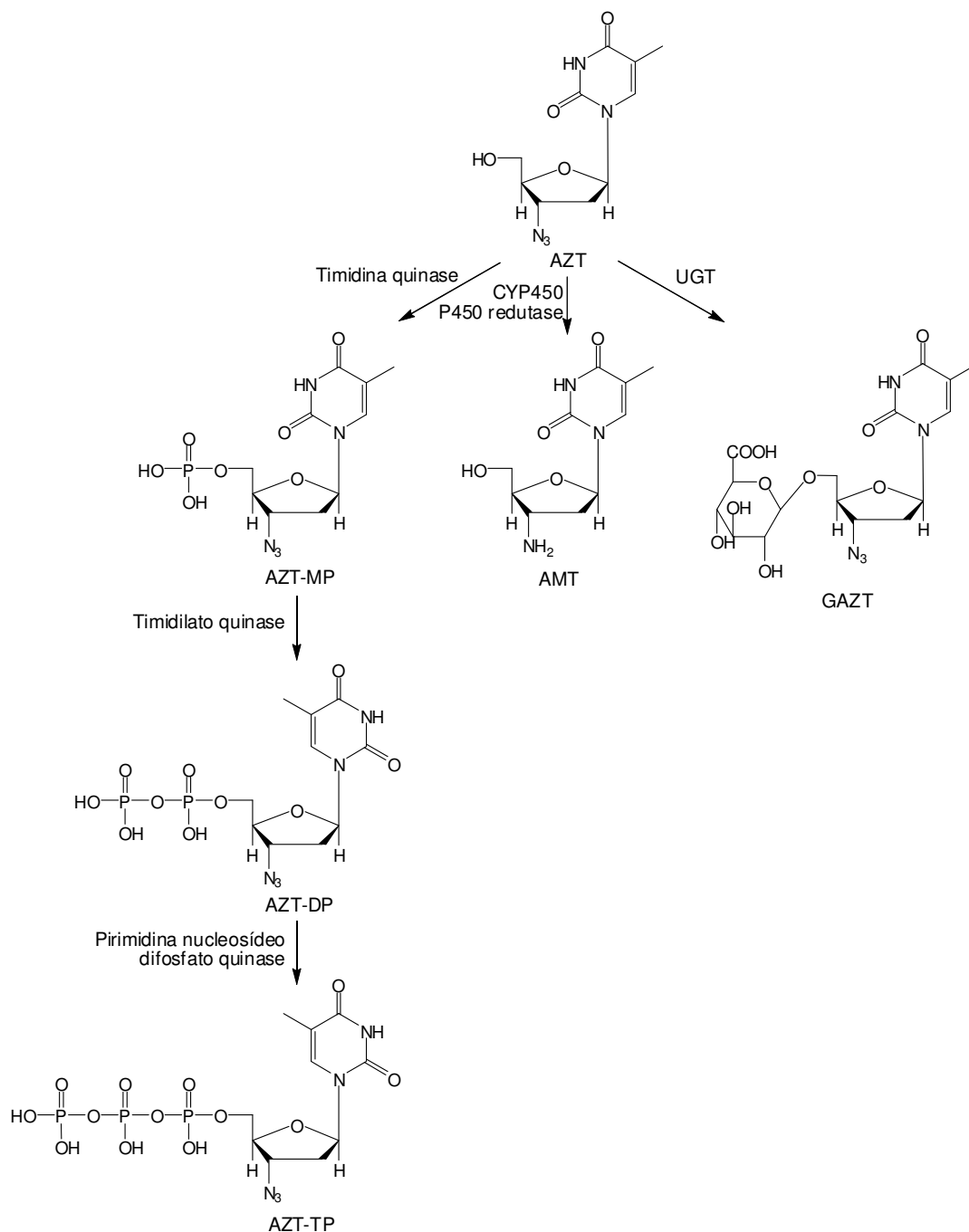


Figura 16: Principais destinos metabólicos da zidovudina em mamíferos (adaptado de Cretton et al. 1991; Veal & Back, 1995; Li & Chan, 1999).

O estudo do metabolismo da zidovudina também foi realizado utilizando modelos microbianos (Figura 17), obtendo derivados não relatados anteriormente na literatura. Kruszewska e colaboradores (Kruszewska et al., 2003) realizaram o estudo de bioconversão do AZT por uma bactéria ambiental, a *Stenotrophomonas maltophilia* PCM 1942. Após dez dias de incubação, um metabólito hidroxilado na posição C-2' do anel da desoxirribose foi produzido com rendimento de aproximadamente 97%. Em nosso laboratório, a biotransformação da zidovudina também foi realizada, utilizando *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 como catalisador. Esta cepa de fungo filamentoso é amplamente conhecida por realizar reações de biotransformação de uma variedade de compostos, de forma semelhante aos mamíferos, sendo bastante empregada nos processos de bioconversão. Em nosso experimento, *C. echinulata* foi capaz de produzir um metabólito glicosilado da zidovudina após sete dias de incubação, utilizando condições brandas de temperatura e pH (Nunes, 2008).

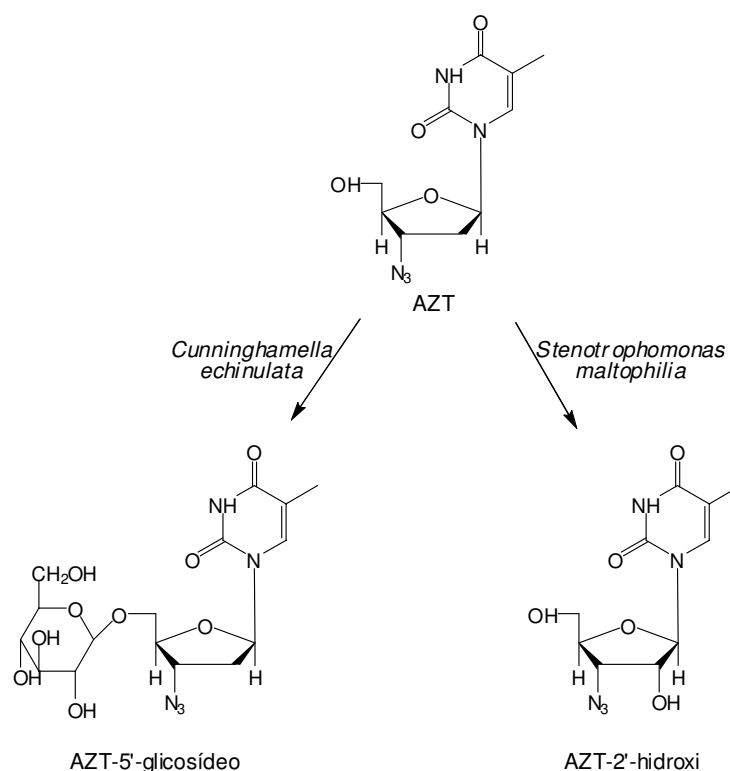


Figura 17: Reações de bioconversão da zidovudina catalisadas por *Stenotrophomonas maltophilia* e *Cunninghamella elegans* (adaptado de Kruszewska et al., 2003; Nunes, 2008).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOURASHED, E. A.; CLARK, A. M.; HUFFORD, C. D. Microbial models of mammalian metabolism of xenobiotics: an updated review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 359-374, 1999.

ABRAHAM, D. J. Molecular modeling in drug design. In: **Burger's Medicinal Chemistry & Drug Discovery**, 6 ed., v. 1, p. 77-168, 2003.

ALVES, S. B.; ROSSI, L. S.; LOPES, R. B.; TAMAI, M. A.; PEREIRA, R. M. *Beauveria bassiana* yeast phase on Agar médium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 81, p. 70-77, 2002.

ANDERSON, R. J.; KUDLACEK, P. E.; CLEMENS, D. L. Sulfation of minoxidil by multiple human cytosolic sulfotransferases. **Chemico-Biological Interactions**, v. 109, p. 53-67, 1998.

ASHA, S. & VIDYAVATHI, M. *Cunninghamella* – a microbial model for drug metabolism studies – a review. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 16-29, 2008.

AZERAD, R. Microbial models for drug metabolism. In: **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, ed. K. Faber, T. Scheper, p. 169-218. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1999.

BALZARINI, J.; HERDEWIJN, P.; DE CLERCQ, E. Differential patterns of intracellular metabolism of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine and 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine, two potent anti-human immunodeficiency virus compounds. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 6127-6133, 1989.

BARBIER, O.; TURGEON, D.; GIRARD, C.; GREEN, M. D.; TEPHLY, T. R.; HUM, D. W.; BÉLANGER, A. 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) is glucuronidated by human UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7). **Drug Metabolism and Disposition**, v. 28, p. 497-502, 2000.

BARRE-SINOUSSE, F.; CHERMANN, J. C.; REY, F.; NUGEYRE, M. T.; CHAMARET, S.; GRUEST, J.; DAUGUET, C.; AXLER-BLIN, C.; VEZINET-BRUN, F.; ROUZIOUX, C.; ROZENBAUM, W.; MONTAGNIER, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, p. 868-871, 1983.

BARREIRO, E. J. & FRAGA, C. A. M. Química medicinal – **As bases moleculares da ação dos fármacos**. Artmed. São Paulo, 2001.

BARREIRO, E. J. & RODRIGUES, C. R. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química Nova**, v. 20, p. 300-310, 1997.

BATHELT, C. M.; ZUREK, J.; MULHOLLAND, A. J.; HARVEY, J. N. Electronic structure of compound I in human isoforms of cytochrome P450 from QM/MM modeling. **Journal of American Chemical Society**, v. 127, p. 12900-12908, 2005.

BERGER, E. A.; MURPHY, P. M.; FARBER, J. M. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. **Annual Review of Immunology**, v. 17, p. 657-700, 1999.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO – AIDS e DST. Ministério da Saúde / Secretaria de Vigilância em Saúde / Programa Nacional de DST e AIDS. Brasília (DF), 2007.

BRUZZESE, V. L.; GILLUM, J. G.; ISRAEL, D. S.; JOHNSON, G. L.; KAPLOWITZ, L. G.; POLK, R. E. Effect of fluconazole on pharmacokinetics of 2',3'-dideoxyinosine in persons seropositive for human immunodeficiency virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 1050-1053, 1995.

CAMPO, V. L. & CARVALHO, I. Síntese de glicoaminoácidos de interesse biológico. **Química Nova**, v. 31, p. 1027-1033, 2008.

CARVALHO, I.; PUPO, M. T.; BORGES, A. D. L.; BERNARDES, L. S. C. Introdução à modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, v. 26, p. 428-438, 2003.

CERNIGLIA, C. E. & YANG, S. K. Stereoselective metabolism of anthracene and phenanthrene by the fungus *Cunninghamella elegans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, p. 119-124, 1984.

CHA, C. J.; KIM, S. J.; KIM, Y. H.; STINGLEY, R.; CERNIGLIA, C. E. Molecular cloning, expression and characterization of a novel class glutathione S-transferase from the fungus *Cunninghamella elegans*. **Biochemical Journal**, v. 368, p. 589-595, 2002.

CHAKRABORTY, P.; BHADURI, A. N.; DAS, P. K. Neoglycoproteins as carriers for receptor-mediated drug targeting in the treatment of experimental visceral leishmaniasis. **The Journal of Protozoology**, v. 37, p. 358-364, 1990.

CHERRY, C. L.; McARTHUR, J. C.; HOY, J. F.; WESSELINGH, S. L. Nucleoside analogues and neuropathy in the era of HAART. **Journal of Clinical Virology**, v. 26, p. 195-207, 2003.

COFFIN, J. M. HIV population dynamics *in vivo*: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. **Science**, v. 267, p. 483-489, 1995.

COJOCARU, V.; WINN, P. J.; WADE, R. C. The ins and outs of cytochrome P450s. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, p. 390-401, 2007.

COLLINS, J. M. Inter-species differences in drug properties. **Chemico-Biological Interactions**, v. 134, p. 237-242, 2001.

COSTA, E. M. M. B.; PIMENTA, F. C.; LUZ, W. C.; OLIVEIRA, V. Selection of filamentous fungi of the *Beauveria* genus able to metabolize quercetin like mammalian cells. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 405-408, 2008.

CRETTON, E. M.; SCHINAZI, R. F.; McCLURE, H. M.; ANDERSON, D. C.; SOMMADOSSI, J. P. Pharmacokinetics of 3'-azido-3'-deoxythymidine and its catabolites and interactions with probenecid in Rhesus monkeys. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, p. 801-807, 1991.

CRETTON, E. M.; ZHOU, Z.; KIDD, L. B.; McCLURE, H. M.; KAUL, S.; HITCHCOCK, M. J. M.; SOMMADOSSI, J. P. In vitro and in vivo disposition and metabolism of 3'-deoxy-2',3'-didehydrothymidine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, p. 1816-1825, 1993.

DARDEN, T. A. & PEDERSEN, L. G. Molecular modeling: an experimental tool. **Environmental Health Perspectives**, v. 101, p. 410-412, 1993.

DE GROOT, M. J. Designing better drugs: predicting cytochrome P450 metabolism. **Drug Discovery Today**, v. 11, p. 601-606, 2006.

DUNGE, A.; SHARDA, N.; SINGH, B.; SINGH, S. Establishment of inherent stability of stavudine and development of a validated stability-indicating HPLC assay method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 1115-1119, 2005.

EKINS, S.; ANDREYEV, S.; RYABOV, A.; KIRILLOV, E.; RAKHMATULIN, E. A.; BUGRIM, A.; NIKOLSKAYA, T. Computational prediction of human drug metabolism. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 1, p. 1-21, 2005.

EKROOS, M. & SJÖGREN, T. Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 103, p. 13682-13687, 2006.

FALETTO, M. B.; MILLER, W. H.; GARVEY, E. P.; ST. CLAIRE, M. H.; DALUGE, S. M.; GOOD, S. S. Unique intracellular activation of the potent anti-human immunodeficiency virus agent 1592U89. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 1099-1107, 1997.

FAUCI, A. S. HIV and AIDS: 20 years of science. **Nature Medicine**, v. 9, p. 839-843, 2003.

FISCHL, M. A.; RICHMAN, D. D.; GRIECO, M. H.; GOTTLIEB, M. S.; VOLBERDING, P. A.; LASKIN, O. L.; LEEDOM, J. M.; GROOPMAN, J. E.; MILDVAN, D.; SCHOOLEY, R. T. et al. The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. **The New England Journal of Medicine**, v. 317, p. 185-191, 1987.

FISHELOVITCH, D.; HAZAN, C.; SHAIK, S.; WOLFSON, H. J.; NUSSINOV, R. Structural dynamics of the cooperative binding of organic molecules in the human cytochromo P450 3A4. **Journal of American Chemical Society**, v. 129, p. 1602-1611, 2007.

FLEXNER, C. In: **Goodman & Gilman's – The Pharmacological Basis of Therapeutics**; Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L., eds.; 11th ed., Ed: McGraw-Hill, cap. 50, 2006.

FURA, A. Role of pharmacologically active metabolites in drug discovery and development. **Drug Discovery Today**, v. 11, p. 133-142, 2006.

GANDHI, R. B.; BOGARDUS, J. B.; BUGAY, D. E.; PERRONE, R. K.; KAPLAN, M.A. Pharmaceutical relationships of three solid state forms of stavudine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 201, p. 221-237, 2000.

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 20, p. 17-48, 2000.

GOTOH, O. Substrate recognition sites in cytochromo P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 83-90, 1992.

GOTTLIEB, M. S.; SCHANKER, H. M.; FAN, P. T.; SAXON, A.; WEISMAN, J. D.; POZALSKI, I. Pneumocystis pneumonia – Los Angeles. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 30, p. 250, 1981.

GRADOLATTO, A.; CANIVENC-LAVIER, M. C.; BASLY, J. P.; SIESS, M. H.; TEYSSIER, C. Metabolism of apigenin by rat liver phase I and phase II enzymes and by isolated perfused rat liver. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, p. 58-65, 2004.

GREENE, W. C.; PETERLIN, B. M. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: basic science as a passport to future therapy. **Nature Medicine**, v. 8, p. 673-680, 2002.

GRIFFITHS, D. A.; BEST, D. J.; JEZEQUEL, S. G. The screening of selected microorganisms for use as models of mammalian drug metabolism. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 373-381, 1991.

GROGAN, G. J.; HOLLAND, H. L. The biocatalytic reactions of *Beauveria* spp. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 1-32, 2000.

GUENGERICH, F. P. Cytochrome P450s and others enzymes in drug metabolism and toxicity. **The AAPS Journal**, v. 8, p. E101-E111, 2006.

GUENGERICH, F. P. & ISIN, E. M. Mechanisms of cytochrome P450 reactions. **Acta Chimica Slovenica**, v. 55, p. 7-19, 2008.

GULATI, R.; BHATTACHARYA, A.; PRASAD, A. K.; GUPTA, R.; PARMAR, V. S.; SAXENA, R. K. Biocatalytic potential of *Fusarium globulosum* lipase in selective acetylation/desacetylation reactions and in ester synthesis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 609-613, 2001.

HAMAMOTO, Y.; NAKASHIMA, H.; MATSUI, T.; MATSUDA, A.; UEDA, T.; YAMAMOTO, N. Inhibitory effect of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxynucleosides on infectivity, cytopathic effects, and replication of human immunodeficiency virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 31, p. 907-910, 1987.

HANNEMANN, F.; BICHET, A.; EWEN, K. M.; BERNHARDT, R. Cytochrome P450 systems – biological variations of electron transport chains. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, p. 330-344, 2007.

HOLLAND, H. L. Bioconversions. In: David B. Finkelstein, Christopher Ball. **Biotechnology of filamentous fungi**, Butterworth Heinemann, 1991.

HOLLAND, H. L.; QI, J.; MANOHARAN, T.S. Synthesis of (S)-4-hydroxy- α -lapachone and biotransformation of some 4-chromanones by *Mortierella isabellina* ATCC 42613. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 73, p. 1399-1405, 1995.

HORWITZ, J. P. The development of a rational antiretroviral therapy for Aids. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, n. 21, p. 7-14, 1993.

HORWITZ, J.; CHUA, J.; DA ROOGE, M.; NOEL, M.; KLUNDT, I. Nucleosides. IX. The formation of 2', 2'-unsaturated pyrimidine nucleosides via a novel beta-elimination reaction. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 31, p. 205-211, 1966.

HORWITZ, J. P.; CHUA, J.; NOEL, M. Nucleosides. V. The Monomesylates of 1-(2'-Deoxy- β -D-lyxofuranosyl) thymine. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 29, p. 2076-2078, 1964.

HOSAGRAHARA, V. P., HANSEN, L. K.; REMMEL, R. P. Induction of the metabolism of midazolam by rifampin in cultured porcine hepatocytes: preliminary evidence for CYP3A isoforms in pigs. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 27, p. 1512-1518, 1999.

HURST, M.; NOBLE, S. Stavudine: an update of its use in the treatment of HIV infection. **Drugs**, v. 58, p. 919-949, 1999.

JOHNSON, M. A.; HORAK, J.; BREUEL, P. The pharmacokinetics of lamivudine in patients with impaired hepatic function. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 54, p. 363-366, 1998.

JULSING, M. K.; VASILEV, N. P.; SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; MUNTENDAM, R.; WOERDENBAG, H. J.; QUAX, W. J.; WOLFSON, H. J.; IONKOVA, I.; KAYSER, O. Metabolic stereoselectivity of cytochrome P450 3A4 towards deoxypodophyllotoxin: *in silico* predictions and experimental validation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 1171-1179, 2008.

KAPOOR, N.; KHANDAVILLI, S.; PANCHAGNULA, R. Simultaneous determinations of lamivudine and stavudine in antiretroviral fixed dose combinations by first derivative spectrophotometry and high performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 761-765, 2006.

KARPLUS, M.; McCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nature Structural Biology**, v. 9, p. 646-652, 2002

KARTHA, K. P. R.; ALOUI, M.; FIELD, R. A. Iodine: A versatile reagent in carbohydrate chemistry. **Tetrahedron Letters**, v. 37, p. 8807, 1996.

KAUL, S.; SHYU, W. C.; SHUKLA, U. A.; DANDEKAR, K. A.; BARBHAIYA, R. H. Absorption, disposition, and metabolism of [14C]didanosine in the beagle dog. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 21, p. 447-453, 1993.

KOROLEV, D.; BALAKIN, K. V.; NIKOLSKY, Y.; KIRILLOV, E.; IVANENKOV, Y. A.; SAVCHUK, N. P.; IVASHCHENKO, A. A.; NIKOLSKAYA, T. Modeling of human cytochrome P450-mediated drug metabolism using unsupervised machine learning approach. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 3631-3643, 2003.

KRUSZEWSKA, H.; CHMIELOWIEC, U.; BEDNAREK, E.; WITOWSKA-JAROSZ, J.; DOBROWOLSKI, J. C.; MISICKA, A. Spectroscopic identification of AZT derivative obtained from biotransformation of AZT by *Stenotrophomonas maltophilia*. **Journal of Molecular Structure**, v. 651-653, p. 645-650, 2003.

LANGOWSKI, J. & LONG, A. Computer systems for the prediction of xenobiotic metabolism. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 407-415, 2002.

LEACH, A. R. Empirical force field models: molecular mechanics. In: **Molecular modeling: principles and applications**, 2. ed., Pearson education, p. 165-252, 2001.

LEE, L. M.; KARON, J. M.; SELIK, R.; NEAL, J. J.; FLEMING, P. L. Survival after AIDS diagnosis in adolescents and adults during the treatment Era, United States, 1984-1997. **Journal of American Medical Association**, v. 285, p. 1308-1315, 2001.

LEWARS, E. Introduction to quantum mechanics in computational chemistry. In: **Computational Chemistry: Introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics**, Kluwer Academic Publishers, p. 81-158, 2003.

LI, X.; CHAN, W. K. Transport, metabolism and elimination mechanisms of anti-HIV agents. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 39, p. 81-103, 1999.

LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. O renascimento de um fármaco: talidomida. **Química Nova**, v. 24, p. 683-688, 2001.

LISOWSKA, K.; DLUGONSKI, J. Concurrent corticosteroid and phenanthrene transformation by filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 85, p. 63-69, 2003.

McDOWEL, J. A.; CHITTICK, G. E.; RAVITCH, J. R.; POLK, R. E.; KERKERING, T. M.; STEIN, D. S. Pharmacokinetics of [^{14}C]abacavir, a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase inhibitor, administered in a single oral dose to HIV-1-infected adults: a mass balance study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 2855-2861, 1999.

MEIJER, D. K. F. & SWART, P. J. Isolated perfused liver as a tool to study the disposition of peptides, liver first-pass effects, and cell-specific drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 46, p. 139-156, 1997.

MILEY, M. J.; ZIELINSKA, A. K.; KEENAN, J. E.; BRATTON, S. M.; RADOMINSKA-PANDYA, A.; REDINBO, M. R. Crystal structure of the cofactor-binding domain of the human phase II drug metabolism enzyme UDP-glucuronosyltransferase 2B7. **Journal of Molecular Biology**, v. 369, p. 498-511, 2007.

MILLER, K. D.; CAMERON, M.; WOOD, L. V.; DALAKAS, M. C.; KOVACS, J. A. Lactic acidosis and hepatic steatosis associated with use of stavudine: report of four cases. **Annals of Internal Medicine**, v. 133, p. 192-196, 2000.

MIRMEHRABI, M. & ROHANI, S. Polimorphic behavior and crystal habit of an anti-viral/HIV drug: stavudine. **Crystal Growth & Design**, v. 6, p. 141-149, 2006.

MITSUYA, H. ; WEINHOLD, K. J.; FURMAN, P. A.; ST CLAIR, M. H.; LEHRMAN, S. N.; GALLO, R. C.; BOLOGNESI, D.; BARRY, D. W.; BRODER, S. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus *in vitro*. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 82, p. 7096-7100, 1985.

MODA, T. L.; TORRES, L. G.; CARRARA, A. E.; ANDRICOPULO, A. D. PK/DB: database for pharmacokinetic properties and predictive *in silico* ADME models. **Bioinformatics**, v. 24, p. 2270-2271, 2008.

MOODY, J. D.; FREEMAN, J. P.; CERNIGLIA, C. E. Biotransformation of doxepin by *Cunninghamella elegans*. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 27, p. 1157-1164, 1999.

MOODY, J. D.; HEINZE, T. M.; HANSEN, E. B.; CERNIGLIA, C. E. Metabolism of ethanolamine-type antihistamine diphenhydramine (Benadryl)TM by the fungus *Cunninghamella elegans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 310-315, 2000a.

MOODY, J. D.; ZHANG, D.; HEINZE, T. M.; CERNIGLIA, C. E. Transformation of amoxapine by *Cunninghamella elegans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3646-3649, 2000b.

MOUSSA, C.; HOUZIAUX, P.; DANREE, B.; AZERAD, R. Microbial models of mammalian metabolism. Fungal metabolism of phenolic and nonphenolic *p*-cymene-related drugs and prodrugs. II. Metabolites of nonphenolic derivatives. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 25, p. 311-316, 1997.

MULLER, V.; BONHOEFFER, S. Mathematical approaches in the studies of viral kinetics and drug resistance in HIV-1 infection. **Current Drug Targets – Infectious Disorders**, v. 3, p. 329-344, 2003.

NARITOMI, Y.; TERASHITA, S.; KAGAYAMA, A.; SUGIYAMA, Y. Utility of hepatocytes in predicting drug metabolism: comparison of hepatic intrinsic clearance in rats and humans in vivo and in vitro. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, p. 580-588, 2003.

NAVÉ, J. F.; ESCHBACH, A.; WOLFF-KUGEL, D.; HALAZY, S.; BALZARINI, J. Enzymatic phosphorylation and pyrophosphorylation of 2',3'-dideoxyadenosine-5'-monophosphate, a key metabolite in the pathway for activation of the anti-HIV (human immunodeficiency virus) agent 2',3'-dideoxyinosine. **Biochemical Pharmacology**, v. 48, p. 1105-1112, 1994.

NUNES, Elaine Souza. **Aplicação da bioconversão da zidovudina por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 na síntese de derivados funcionalizados por carboidratos**. Goiânia, 2008. 144 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás.

ODINECS, A.; NOSBISCH, C.; KELLER, R. D.; BAUGHMAN, W. L.; UNADKAT, J. D. In vivo maternal-fetal pharmacokinetics of stavudine (2', 3'-didehydro-3'-deoxythymidine) in pigtailed macaques (*Macaca nemestrina*). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 196-202, 1996.

OMURA, T. Forty years of cytochrome P450. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 266, p. 690-698, 1999.

ORENSTEIN, J. M.; FOX, C.; WAHL, S. M. Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections. **Science**, v. 276, p. 1857-1861, 1997.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 189-259, 2004.

PARDRIDGE, W. M. Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. **Molecular Interventions**, v. 3, p. 90-105, 2003.

PARK, H.; LEE, S.; SUH, J. Structural and dynamical basis of broad substrate specificity, catalytic mechanism, and inhibition of cytochrome P450 3A4. **Journal of American Chemical Society**, v. 127, p. 13634-13642, 2005.

PEARCE, C. M.; LUSHNIKOVA, M. V. Microbiological production of omeprazole metabolites by *Cunninghamella elegans*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 41, p. 87-91, 2006.

PELKONEN, O.; TURPEINEN, M.; UUSITALO, J.; RAUTIO, A.; RAUNIO, H. Prediction of drug metabolism and interactions on the basis of in vitro investigations. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 96, p. 167-175, 2005.

PETERSON, D. H. & MURRAY, H. C. Microbial oxygenation of steroids at carbon 11. **Journal of American Chemical Society**, v. 74, p. 1871-1872, 1952.

PETERSON, J. A. & GRAHAM, S. E. A close family resemblance: the importance of structure in understanding cytochromes P450. **Structure**, v. 6, p. 1079-1085, 1998.

PHILLIPS, J. C.; BRAUN, R.; WANG, W.; GUMBART, J.; TAJKHORSHID, E.; VILLA, E.; CHIPOT, C.; SKEEL, R. D.; KALÉ, L.; SCHULTEN, K. Scalable molecular dynamics with NAMD. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, p. 1781-1802, 2005.

POTHULURI, J. V.; FREEMAN, J. P.; EVANS, F. E.; CERNIGLIA, C. E. Biotransformation of fluorene by the fungus *Cunninghamella elegans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 1977-1980, 1993.

PRASAD, G. S.; GIRISHAM, S.; REDDY, S. M.; SRISAILAM, K. Biotransformation of albendazole by fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1565-1571, 2008.

QIAO, L.; ZHOU, Y. Z.; CHEN, H.; CAO, J. Q.; PEI, Y. H. One new bufadienolide biotransformed from cinobufagin by *Cunninghamella elegans*. **Chinese Chemical Letters**, v. 19, p. 299-301, 2008.

RIDDLER, S. A.; ANDERSON, R. E.; MELLORS, J. W. Antiretroviral activity of stavudine (2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine, d4T). **Antiviral Research**, v. 27, p. 189-203, 1995.

RITTER, J. K. Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. **Chemico-Biological Interactions**, v. 129, p. 171-193, 2000.

RODRIGUES, C. R. Processos modernos no desenvolvimento de fármacos: modelagem molecular. **Cadernos temáticos de química nova na escola**, v. 3, p. 43-49, 2001.

SANBONMATSU, K. Y.; TUNG, C. -S. High performance computing in biology: multimillion atom simulations of nanoscale systems. **Journal of Structural Biology**, v. 157, p. 470-480, 2007.

SANT'ANNA, C. M. R. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações da IUPAC para 1997). **Química Nova**, v. 25, p. 505-512, 2002.

SANTORO, M. I. R. M.; TABORIANSKI, A. M.; SINGH, A. K.; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. Stability-indicating methods for quantitative determination of zidovudine and stavudine in capsules. **Química Nova**, v. 29, p. 240-244, 2006.

SILVA, T. H. A. Modelagem molecular com o auxílio do computador. In: Maria Auxiliadora Fontes Prado, Eliezer J. Barreiro. (Org.). **Práticas de química farmacêutica y medicinal**. 1 ed. Pamplona: Cytel Sub-Programa X Química Farmacêutica, p. 67-85, 2002.

SCHINAZI, R. F.; BOUDINOT, F. D.; DOSHI, K. J.; McCLURE, H. M. Pharmacokinetics of 3'-fluoro-3'-deoxythymidine and 3'-deoxy-2',3'-didehydrothymidine in Rhesus monkeys. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, p. 1214-1219, 1990.

SCHMITZ, G.; FRANKE, D.; STEVENS, S.; TAKORS, R.; WEUSTER-BOTZ, D.; WANDREY, C. Regioselective oxidation of terfenadine with *Cunninghamella blakesleeana*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, p. 313-324, 2000.

SCOTT, E. E. & HALPERT, J. R. Structures of P450 3A4. **TRENDS in Biochemical Sciences**, v. 30, p. 5-7, 2005.

SMITH, R. V. & ROSAZZA, P. Microbial systems for study of biotransformations of drugs. **Biotechnology and Bioengineering**, v. XVII, p. 785-814, 1975.

SOUZA, M. V. N.; ALMEIDA, M. V. Drogas anti-VIH: passado, presente e perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 26, p. 366-372, 2003.

SZKLARZ, G. D. & HALPERT, J. R. Molecular modeling of cytochrome P450 3A4. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 11, p. 265-272, 1997.

STOUT, C. D. Cytochrome P450 conformational diversity. **Structure**, v. 12, p. 1921-1922, 2004.

TAKAHASHI, J. A.; BARROSO, H. A.; OLIVEIRA, A. B. Optimization of diterpenes bioconversion process by the fungus *Cephalosporium aphidicola*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 83-86, 2000.

TESTA, B.; BALMAT, A. L.; LONG, A. Predicting drug metabolism: concepts and challenges. **Pure and Applied Chemistry**, v. 76, p. 907-914, 2004.

THOMAS, G. Metabolismo dos fármacos. In: **Química Medicinal: Uma Introdução**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

TIERNEY, L. M.; MCPHEE, S. J.; PAPADAKIS, M. A. In: **Current Medical Diagnosis & Treatment**, 45. ed., McGraw-Hill, cap. 31, 2006.

TRAPNELL, C. B.; KLECKER, R. W.; JAMIS-DOW, C.; COLLINS, J. M. Glucuronidation of 3'-azido-3'-deoxythymidine (zidovudine) by human liver microsomes: relevance to clinical pharmacokinetic interactions with atovaquone, fluconazole, methadone, and valproic acid. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 1592-1596, 1998.

TSAI, C. S. Molecular modeling: molecular mechanics. In: **An introduction to computational biochemistry**, Wiley-Liss, New York, p. 285-314, 2002.

TURGEON, D.; CARRIER, J. S.; CHOUINARD, S.; BÉLANGER, A. Glucuronidation activity of the UGT2B17 enzyme toward xenobiotics. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, p. 670-676, 2003.

UCKUN, F. M.; PENDERGRASS, S.; QAZI, S.; SAMUEL, P.; VENKATACHALAM, T. K. Phenyl phosphoramidate derivatives of stavudine as anti-HIV agents with potent and selective in-vitro antiviral activity against Adenovirus. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, p. 225-234, 2004.

UNAIDS, WHO ; AIDS epidemic update : December 2007. Geneva: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, 2007.

VAN DE WATERBEEMD, H. & GIFFORD, E. ADMET *in silico* modeling: towards prediction paradise? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, 2003.

VAN DEN BRINK, H. J. M.; VAN GORCOM, R. F. M.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J.; PUNT, P. J. Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 23, p. 1-17, 1998.

VEAL, G. J.; BACK, D. J. Metabolism of zidovudine. **General Pharmacology**, v. 26, p. 1469-1475, 1995.

WADE, R. C.; WINN, P. J.; SCHILICHTING, I.; SUDARKO. A survey of active site access channels in cytochromes P450. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, p. 1175-1182, 2004.

WANG, R. F.; CAO, W. W.; KHAN, A. A.; CERNIGLIA, C. E. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of a cytochrome P450 gene from *Cunninghamella elegans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 188, p. 55-61, 2000.

WEI, X.; GHOSH, S. K.; TAYLOR, M. E. et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. **Nature**, v. 373, p. 117-122, 1995.

WERCK-REICHHART, D. & FEYEREISEN, R. Cytochromes P450: a success story. **Genome Biology**, v. 1, p. 1-9, 2000.

WILKENING, S.; STAHL, F.; BADER, A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, p. 1035-1042, 2003.

WILLIAMS, D. A. Drug metabolism. In: **Foye's principles of medicinal chemistry**. 5. Ed. Philadelphia: Lippencot W. E. W., 2001.

WILLIAMS, P. A.; COSME, J.; VINKOVIC, D. M.; WARD, A.; ANGOVE, H. C.; DAY, P. J.; VONRHEIN, C.; TICKLE, I. J.; JHOTI, H. Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone. **Science**, v. 305, p. 683-686, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Health Statistics, Geneva, 2008.

WYNALDA, M. A.; HUTZLER, J. M.; KOETS, M. D.; PODOLL, T.; WIENKERS, L. C. In vitro metabolism of clindamycin in human liver and intestinal microsomes. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, p. 878-887, 2003.

YANO, J. K.; WESTER, M. R.; SCHOCH, G. A.; STOUT, C. D.; JOHNSON, E. F. The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by x-ray crystallography to 2,05-Å resolution. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 38091-38094, 2004.

ZHANG, D.; EVANS, F. E.; FREEMAN, J. P.; DUHART, B.; CERNIGLIA, C. E. Biotransformation of amitriptyline by *Cunninghamella elegans*. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 23, p. 1417-1425, 1995.

ZHANG, D.; EVANS, F. E.; FREEMAN, J. P.; YANG, Y.; DECK, J.; CERNIGLIA, C. E. Formation of mammalian metabolites of cyclobenzaprine by the fungus, *Cunninghamella elegans*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 102, p. 79-92, 1996a.

ZHANG, D.; FREEMAN, J. P.; SUTHERLAND, J. B.; WALKER, A. E.; YANG, Y.; CERNIGLIA, C. E. Biotransformation of chlorpromazine and methdilazine by *Cunninghamella elegans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 798-803, 1996b.

ZHANG, D.; HANSEN, E. B.; DECK, J.; HEINZE, T. M.; SUTHERLAND, J. B.; CERNIGLIA, C. E. Fungal biotransformation of antihistamine azatadine by *Cunninghamella elegans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3477-3479, 1996c.

ZHANG, D.; YANG, Y.; LEAKEY, J. E. A.; CERNIGLIA, C. E. Phase I and phase II enzymes produced by *Cunninghamella elegans* for the metabolism of xenobiotics. **FEMS Microbiology Letters**, v. 138, p. 221-226, 1996d.

ZHOU, D.; AFZELIUS, L.; GRIMM, S. W.; ANDERSSON, T. B.; ZAUHAR, R. J.; ZAMORA, I. Comparison of methods for the prediction of the metabolic sites for CYP3A4-mediated metabolic reactions. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 34, p. 976-983, 2006.