

Filipe Costa Azevedo

**A TRANSCRIPTASE REVERSA COMO ALVO
TERAPÊUTICO EM DOENÇAS RETROVIRAIS**

Universidade Fernando Pessoa,

Porto, 2013

Filipe Costa Azevedo

**A TRANSCRIPTASE REVERSA COMO ALVO
TERAPÊUTICO EM DOENÇAS RETROVIRAIS**

Universidade Fernando Pessoa,

Porto, 2013

Filipe Costa Azevedo

**A TRANSCRIPTASE REVERSA COMO ALVO
TERAPÊUTICO EM DOENÇAS RETROVIRAIS**

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para
obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas

(Filipe Azevedo)

Porto, 2013

Resumo

O impacto imediato da descoberta da enzima transcriptase reversa veio alterar até então o dogma central da biologia molecular, ou seja, que a transferência da informação genética é unidirecional: ADN-> ARN-> Proteína (Gilboa *et al.*, 1979). As transcriptases reversas retrovirais são máquinas moleculares complexas com partes móveis e atividades múltiplas (Flint *et al.*, 2009). Esta enzima também permitiu compreender a persistência de infecções retrovirais, bem como aspetos patogénicos do vírus da imunodeficiência adquirida (VIH) (Flint *et al.*, 2009).

Os retrovírus possuem um genoma composto por duas cadeias simples de ARN e replicam o ARN viral por transcrição reversa pela ação da enzima transcriptase reversa (Tenório *et al.*, 2008). A família dos retrovírus tem vindo a ser um dos principais alvos de estudo de cientistas nas últimas décadas por ser causadora de doenças graves em humanos, como a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (Tenório *et al.*, 2008). O vírus responsável é o Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) e trata-se de um retrovírus que modifica a composição genética das células que infeta, destruindo-as. São conhecidos dois tipos de vírus: VIH-1 e VIH-2 (Araújo, 2005). O avanço mais significativo, em termos de gestão da infeção VIH-1, pode ser atribuído ao tratamento dos pacientes através da utilização de fármacos antivirais, os quais podem suprimir a replicação do VIH-1 a níveis indetetáveis (Arts e Hazuda, 2012).

Até à data, estão disponíveis cerca de 36 medicamentos para o tratamento de infeções por VIH, todos eles aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) (U.S. Department of Health & Human Services, 2013). Entre eles, destacam-se duas classes de fármacos que inibem especificamente a enzima transcriptase reversa - inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRAN) e inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNAN) (Collier *et al.*, 1996; D'Aquila *et al.*, 1996; Staszewski *et al.*, 1996). Uma das grandes ameaças a todas as terapias antivirais que existem atualmente, será sempre o aparecimento de estirpes virais resistentes à ação dos fármacos existentes (Sleiman *et al.*, 2012). Por isso, é importante a presença constante de novos conhecimentos sobre toda a biologia da replicação viral, de forma a se obterem novas terapias em alternativa aos fármacos clássicos já existentes (Buckheit *et al.*, 2010).

Palavras-chave: “transcriptase reversa”; “VIH”; “retrovírus”; “terapia antirretroviral”; “transcrição reversa”

Abstract

The immediate impact of the discovery of the enzyme reverse transcriptase amends by then the central dogma of molecular biology, in other words, the transfer of genetic information is unidirectional: DNA -> RNA -> Protein (Gilboa *et al.*, 1979). The retroviral reverse transcriptases are complex molecular machines with moving parts and multiple activities (Flint *et al.*, 2009). This enzyme also allowed us to understand the persistence of retroviral infections and pathogenic aspects of human immunodeficiency virus (HIV) (Flint *et al.*, 2009).

Retroviruses have a genome consisting of two single strands of RNA and replicate the viral RNA by reverse transcription by the action of the enzyme reverse transcriptase (Tenório *et al.*, 2008). The family of retroviruses has been a main target of study in recent decades to be a cause of serious diseases in humans, such as acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) (Tenório *et al.*, 2008). The virus responsible is the human immunodeficiency virus (HIV), and it is a retrovirus that modifies the genetic composition of the infecting cells, destroying them. There are known two kinds of viruses: HIV-1 and HIV-2 (Araújo, 2005). The most significant, in terms of management of HIV-1 infection can be attributed to treatment of patients through the use of antiviral drugs which can suppress the replication of HIV-1 to undetectable levels (Hazuda and Arts, 2012).

To date are available approximately 36 drugs for the treatment of HIV infections, all approved by the Food and Drug Administration (FDA) (U.S. Department of Health & Human Services, 2013). Among them, we highlight two classes of drugs that specifically inhibit the reverse transcriptase - nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) (Collier *et al.*, 1996; D' Aquila *et al.*, 1996; Staszewski *et al.*, 1996). One of the major threats to all antiviral therapies that will always be the emergence of viral strains resistant to the action of available drugs (Sleiman *et al.*, 2012). Therefore, it is important to the continuing presence of new knowledge about the biology of the whole viral replication in order to obtain new therapies alternative to existing classical drugs (Buckheit *et al.*, 2010).

Keywords: "Reverse transcriptase", "HIV", "retroviruses", "antiretroviral therapy", "reverse transcription"

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Maria Coelho pela disponibilidade que sempre demonstrou, pela ajuda e pelo apoio que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho e pela rapidez e prontidão com que me esclareceu todas as dúvidas que foram surgindo.

Aos meus amigos e à minha família pela ajuda, preocupação e paciência que sempre demonstraram ao longo destes meses.

Índice Geral

Capítulo I – A transcriptase reversa	1
1.1 Descoberta da enzima transcriptase reversa	1
1.2 O que é a transcriptase reversa e o seu impacto	2
1.3 Componentes essenciais da transcriptase reversa	3
1.3.1 ARN genómico	3
1.3.2 Primer tRNA	4
1.3.3 Transcriptase reversa	5
Capítulo II – Retrovírus	6
2.1 Definição e classificação de vírus	6
2.2 Estrutura dos retrovírus	7
2.2.1 Invólucro	7
2.2.2 Cápside	7
2.2.3 Genoma	8
2.3 Doenças causadas por retrovírus	9
2.3.1 Leucemia de células T	9
2.3.2 Síndrome da Imunodeficiência Adquirida e VIH	9
2.4 Ciclo replicação viral do VIH	12
2.5 VIH-1 e o processo de transcrição reversa	14
2.6 Estrutura do ARN viral	16
2.7 A transcriptase reversa do VIH-1	18
Capítulo III – Terapia antirretroviral	21
3.1 Fármacos antirretrovirais	21
3.2 Inibidores da transcriptase reversa análogos dos nucleosídeos (ITRAN)	27
3.2.1 Zidovudina	27
3.2.2 Didanosina	31
3.2.3 Estavudina	33
3.2.4 Zalcitabina	35
3.2.5 Lamivudina	37
3.2.6 Abacavir	39
3.2.7 Tenofovir disoproxil fumarato	42
3.3 Inibidores da transcriptase reversa não análogos nucleosídeos (ITRNAN)	44

3.3.1 Nevirapina	46
3.3.2 Delavirdina	48
3.3.3 Efavirenz	50
Capítulo IV - Desafios estabelecidos/Perspectivas futuras	52
4.1 Desafios estabelecidos	55
4.2 Oportunidades	57
4.3 Conclusão final	59
Referências bibliográficas	60

Índice de figuras

Capítulo II

Figura 1 - Estrutura de um retrovírus. Localização relativa de várias estruturas e proteínas do vírus	8
Figura 2 - Duplicação de um retrovírus, pela transcriptase reversa, de ARN viral para ADN viral (ou provirus) que se integra no genoma celular	13
Figura 3 - Organização genómica na cadeia de ARN de VIH-1	17
Figura 4 - Estrutura da TR de VIH-1	19

Capítulo III

Figura 5 - Cronologia temporal dos vários pontos importantes da era dos fármacos antirretrovirais	22
Figura 6 - Relação fármacos e o seu local de ação	26
Figura 7 - Local de ligação dos ITRNAN	45

Índice de tabelas

Capítulo II

Tabela I - Função dos genes estruturais e não-estruturais do VIH-1	11
--------------------------------------------------------------------	----

Capítulo III

Tabela II - Inibidores da transcriptase reversa análogos dos nucleosídeos (ITRAN)	23
-----------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela III - Inibidores da transcriptase reversa não análogos dos nucleosídeos (ITRNAN)	24
-----------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela IV - Inibidores da protease	25
------------------------------------	----

Tabela V - Fármacos que não devem ser utilizados com os antirretrovirais	26
--------------------------------------------------------------------------	----

Capítulo IV

Tabela VI - Desafios da terapia antirretroviral	53
-------------------------------------------------	----

Tabela VII - Novos paradigmas no tratamento VIH-1/SIDA	54
--------------------------------------------------------	----

Capítulo I – A transcriptase reversa

1.1 Descoberta da enzima transcriptase reversa

Em 1970, os investigadores Howard Temin e David Baltimore apresentaram em trabalhos distintos a primeira evidência concreta da existência em partículas retrovirais da atividade da ácido desoxirribonucleico (ADN)-polimerase dependente da molécula de ácido ribonucleico (ARN) (Flint *et al.*, 2009).

Na tentativa de descobrir a forma como os retrovírus tinham a capacidade de alterar a hereditariedade das células, como acontece no processo de transformação oncogénica, Howard Temin sugeriu que o genoma do ARN retroviral seria integrado na cromatina da célula hospedeira na forma de ADN (Flint *et al.*, 2009). Segundo Flint *et al.* (2009), esta ideia era suportada pela observação de que em condições *in vitro*, as ADN polimerases celulares puras podiam utilizar como molde a molécula de ARN. Por outro lado, David Baltimore, revelou um interesse especial em viriões associados a polimerases, tendo descoberto viriões de estomatite vesicular, um vírus com um genoma de ARN de cadeia negativa. Estes dois investigadores concluíram que as partículas retrovirais também continham ADN polimerase e que esta estava dependente de ARN.

Experiências realizadas posteriormente demonstraram de facto que as próprias partículas retrovirais aumentavam a atividade da enzima. Assim, em 1975, Temin e Baltimore receberam o prémio Nobel da medicina pela descoberta da enzima transcriptase reversa (RT) (Flint *et al.*, 2009).

1.2 O que é a transcriptase reversa e o seu impacto

O impacto imediato da descoberta da enzima transcriptase reversa veio alterar até então o dogma central da biologia molecular, ou seja, que a transferência da informação genética é unidirecional: ADN-> ARN-> Proteína. Esta enzima multifuncional realiza a polimerização de ARN dependente de ADN, a polimerização de ADN dependente de ADN, a síntese de deslocamento de cadeia, a transferência de cadeia e degrada a cadeia de ARN em híbridos de ARN/ - ADN. De forma a desempenhar estas funções, a transcriptase reversa combina duas atividades enzimáticas distintas: a atividade da ADN polimerase que utiliza ARN ou ADN como molde e a atividade da ARNase H que cliva a cadeia de ARN, originando um híbrido de ARN/ADN (Gilboa *et al.*, 1979).

Estas atividades estão localizadas em dois domínios proteicos separados: o domínio da polimerase corresponde ao N-terminal de dois terços da transcriptase reversa, enquanto que o domínio da ARNase H localiza-se no domínio C-terminal de um terço da transcriptase reversa (Champoux, 1993; Telesnitsky e Goff, 1993).

O estudo da transcriptase reversa tem contribuído para um melhor entendimento do processo oncogénico, com a obtenção de melhores informações sobre a base genética desta doença e tem contribuído também para uma melhor deteção de células tumorais na corrente sanguínea, através da utilização, por exemplo, do método de RT-PCR, para deteção de melanoma (Smith *et al.*, 1991) e neuroblastoma (Burchill *et al.*, 1994).

Para ficar a perceber melhor qual a importância desta enzima no processo oncogénico, é importante ficar a conhecer um pouco melhor o genoma humano. 45% do código do genoma humano consiste em elementos transponíveis (do inglês *Transposable Elements - TEs*), enquanto que apenas 2% corresponde a proteínas (Lander *et al.*, 2001). Estes elementos, os TEs, inicialmente eram considerados parasitas intracelulares e até classificados de ADN “lixo”. No entanto, estudos mais recentes concluíram que estas sequências não codificadoras de proteínas, desempenham um papel essencial em termos de regulação do genoma, com a capacidade de alterar a expressão de genes, bem como a capacidade de desenvolvimento de um organismo (Orgel e Crick, 1980; Taft *et al.*, 2007; Caporale, 2006; Slotkin e Martienssen, 2007;

Jurka *et al.*, 2007; Goodier e Kazazian, 2008; Kazazian, 2004; Vences *et al.*, 2009; Nowacki *et al.*, 2009).

Os TEs podem ser divididos em duas classes principais: transposões de ADN (cerca de 2,8%) e os retrotransposões (cerca de 42,2%). A diferença principal entre as duas classes é que os primeiros não necessitam de um intermediário de ARN para se expandirem, enquanto que os segundos necessitam de ARN transcrito, que tem a capacidade de se auto-replicar com a ajuda da transcriptase reversa. Portanto a transcriptase reversa pode ter um papel essencial no estudo de todo o processo oncogénico (Sleiman *et al.*, 2012).

Esta enzima também permitiu compreender a persistência de infeções retrovirais, aspetos patogénicos do vírus da imunodeficiência adquirida (SIDA) e permitiu a investigadores capturarem ARNs mensageiros celulares (mARNs), assim como ADNs complementares (cADNs) de forma a amplificá-los, cloná-los e expressá-los através de metodologias bem estabelecidas (Flint *et al.*, 2009).

1.3 Componentes essenciais da transcriptase reversa

1.3.1 ARN genómico

As partículas retrovirais contêm duas cópias do genoma de ARN, que são mantidas juntas através do emparelhamento de bases. Através da desnaturação parcial e análise microscópica do complexo 70S, conclui-se que o emparelhamento mais estável encontra-se perto das extremidades 5' dos dois genomas. O complexo 70S do ARN também possui duas moléculas de tARN específico, que serve como iniciador da transcrição reversa (Flint *et al.*, 2009).

O facto de conterem duas cópias do genoma de ARN pode ajudar o retrovírus a sobreviver a danos causados nos seus genomas, isto porque, partes de ambos os genomas podem, e normalmente são, usados como moldes durante o processo de transcrição reversa, representando elevadas taxas de recombinação genética neste tipo de vírus. Por exemplo, são capazes juntos de corrigir uma cópia completa de ADN de

dois genomas de ARN aleatórios que estejam danificados. No entanto, várias experiências genéticas têm demonstrado que a utilização de dois modelos de ARN não é uma característica essencial no processo de transcrição reversa. Isto significa, que apenas um único genoma é essencial para que ocorra todos os passos na via de transcrição reversa (Flint *et al.*, 2009).

Tal como no genoma de vírus de ARN cadeia negativa, o genoma retroviral é revestido ao longo do seu comprimento por uma proteína de nucleocapsídeo viral (NC) com aproximadamente uma molécula para 10 nucleotídeos. Esta pequena proteína pode ligar, de forma não específica, tanto ADN como ARN, como promover a ligação a ácidos nucleicos. Várias experiências sugerem que a NC pode facilitar a troca de molde e desempenhar um papel no processo de transcrição reversa semelhante ao papel das proteínas SSB (proteínas de ligação ao ADN de cadeia simples) na síntese de ADN, processo este catalisado por ADN-polimerases de bactérias, em que as proteínas SSB aumentam a eficiência do alongamento (Flint *et al.*, 2009).

1.3.2 Primer tRNA

Os viriões retrovirais contêm um conjunto de ARNs celulares. Este inclui cerca de 100 cópias de uma amostra de tARNs e alguns vestígios de ARNs mensageiros celulares. A maioria destes ARNs celulares não têm uma função esclarecida. No entanto, a molécula de tARN tem um papel fundamental e crítico, visto que é esta molécula que serve de iniciador (*primer*) ao processo de transcrição reversa (Flint *et al.*, 2009). Para que a transcrição reversa se processe é necessário a presença de um iniciador tARN, de um molde ARN e da enzima transcriptase reversa, formando assim um complexo ribonucleoproteico produtivo (Sleiman *et al.*, 2012). Mais à frente será explicado mais em pormenor todo este processo.

1.3.3 Transcriptase reversa

Cada partícula de retrovírus contém 50-100 moléculas de transcriptase reversa. Transcriptase reversa retroviral provavelmente funciona como dímeros, no entanto o número de dímeros em cada virião que estão efetivamente envolvidos na transcrição reversa não é conhecido. Resultados de estudos com partículas virais purificadas sugerem que a síntese de ADN viral pode começar assim que o envelope viral é removido. De notar também que a síntese de ADN ocorre principalmente no citoplasma, numa estrutura subviral chamada complexo RT (Flint *et al.*, 2009).

Transcriptases reversas retrovirais são máquinas moleculares complexas com partes móveis e atividades múltiplas. As diferentes atividades catalíticas que ocorrem em diferentes fases da via de transcrição reversa incluem ARN-direta e ADN-direta do ADN de polimerização, o desenrolamento de ADN, e a hidrólise de ARN em ADN-ARN híbrido de RNase H. As primeiras três atividades pertencem ao domínio da polimerase, com a atividade da RNase H a pertencer a um outro domínio. No processo de hidrólise de ARN em ADN-ARN híbrido, a RNase H funciona primeiramente como uma endonuclease, produzindo oligoribonucleótidos de 2 a 15 nucleótidos (Flint *et al.*, 2009).

Capítulo II – Retrovírus

2.1 Definição e classificação de vírus

Os vírus são pequenos agentes infecciosos que apenas são capazes de se reproduzir dentro das células do seu hospedeiro. A partícula viral é constituída por segmentos de ADN ou ARN, sob a forma de fita simples ou dupla, protegidos por uma cápside proteica composta por unidades estruturais simétricas repetitivas – capsómeros (Rang *et al.*, 2008). Alguns vírus, tal como o VIH, contêm ainda um componente lipídico, geralmente presente na superfície do virião formando um invólucro (que também possui proteínas), cuja finalidade é facilitar a entrada na célula hospedeira.

As estruturas virais mais simples são simétricas e incluem estruturas helicoidais e icosaédricas. As estruturas helicoidais têm a forma de um bastão, enquanto que as icosaédricas possuem a forma de uma esfera, constituída a partir de unidades simétricas. Os vírus de simetria helicoidal apresentam os seus capsómeros no ARN na forma de bastões e ao longo de todo o genoma. Estes além de envolverem o ARN, também têm a capacidade de o proteger. A maioria dos vírus ARN de cadeia negativa possuem dentro do seu envelope, nucleocápsides helicoidais. Por outro lado, os vírus que apresentam uma simetria icosaédrica, são vírus pequenos, como por exemplo, os picornavírus e os parvovírus, e a sua estrutura icosaédrica é constituída por 12 capsómeros (Murray *et al.*, 2010).

O Sistema de Classificação de Baltimore ordena os vírus em sete grupos, com base no genoma viral e na forma como ocorre a transcrição a mARN. Em 1971, David Baltimore, sugeriu um tipo específico de classificação de vírus com base na capacidade dos vírus em processar ARN mensageiro durante uma infeção, isto porque, para se replicarem, todos os vírus necessitam de expressar o ARN mensageiro, e o modo como o fazem é determinado pelo tipo de genoma utilizado pelos vírus. Neste sistema de classificação, vírus ARN em que o genoma está no sentido do ARN mensageiro, são denominados vírus ARN sentido positivo, enquanto que os vírus cujo genoma está no sentido contrario ao ARN mensageiro, são denominados vírus ARN sentido negativo (Edward *et al.*, 2009).

Como exemplo de vírus ADN, temos: poxvírus (varíola), herpesvirus (herpes labial, febre glandular), adenovírus (conjuntivite) e papilomavirus (verrugas). No que diz respeito aos vírus ARN, estão incluídos: ortomixovirus (gripe), paramixovirus (sarampo, infecções do trato respiratório), togavírus (rubéola), rabdovirus (raiva), picornavírus (meningite, poliomielite), retrovírus (SIDA, leucemia de células T), arenavirus (meningite, febre Lassa), hepadnavírus (hepatite -B) e arbovírus (encefalite transmitida por artrópodes e várias doenças febris, como por exemplo a febre amarela) (Rang *et al.*, 2008).

Os retrovírus (família *Retroviridae* possuem um genoma composto por duas cadeias simples de ARN e replicam o ARN viral por transcrição reversa pela ação da enzima transcriptase reversa (Tenório *et al.*, 2008). Esta família de vírus inclui os seguintes géneros: *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Lentivirus* e *Spumavirus*.

A família dos retrovírus tem vindo a ser um dos principais alvos de estudo de cientistas nas últimas décadas por ser causadora de doenças graves em humanos, como a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (Tenório *et al.*, 2008). Os membros pertencentes a esta família apresentam as seguintes características: possuem um genoma de ARN de cadeia dupla positiva, possuem a enzima transcriptase reversa responsável por sintetizar o ADN a partir do ARN genómico e têm a capacidade de integrar o seu ADN no genoma da célula hospedeira de forma estável (Silva *et al.*, 2006).

2.2 Estrutura dos retrovírus

2.2.1 Invólucro

O invólucro dos retrovírus deriva da membrana celular lipoproteica e contém proteínas de origem viral. É composto por proteínas responsáveis pelo reconhecimento e interação com as proteínas da célula hospedeira (Coffin, 1996).

2.2.2 Cápside

A cápside protege o genoma viral da ação de fatores adversos, como enzimas da célula hospedeira, além de conferir simetria estrutural (Coffin, 1996).

2.2.3 Genoma

O genoma dos retrovírus possui pelo menos três regiões codificantes (Open Reading Frames – ORF) comuns a todos os retrovírus que são:

- GAG – após o correto processamento da poliproteína GAG, ocorre a produção de três proteínas finais (matriz, cápside e núcleo-cápside);
- POL – codifica três proteínas que possuem atividade enzimática e são importantes na infecção do vírus. Estas proteínas são a transcriptase reversa (RT), responsável pela síntese de ADN viral partindo do ARN viral, a integrase (IN), utilizada na integração da cadeia dupla de ADN do vírus no genoma do hospedeiro e a protease, responsável pela maturação das proteínas dos genes GAG e POL e pela formação do provírus (Miller *et al.*, 2000);
- ENV – codifica a estrutura do envelope.

Existem retrovírus mais complexos que possuem genes adicionais denominados genes regulatórios e acessórios. A estrutura geral de qualquer retrovírus é delimitada por sequências não codificantes repetidas denominadas LTR – *long terminal repeat*. Estas sequências possuem sinais regulatórios que são essenciais à atividade promotora e reguladora da transcrição e integração viral (Coffin, 1979).

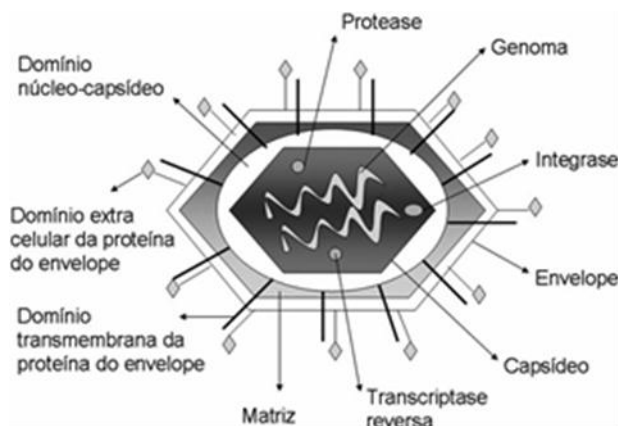


Figura 1 – Estrutura de um retrovírus. Localização relativa de várias estruturas e proteínas do vírus (Retirado de Tenório *et al.*, 2008).

2.3 Doenças causadas por retrovírus

2.3.1 Leucemia de células T

No início do ano de 1980 foi identificado o primeiro retrovírus humano, o HTLV-1 (vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1). Logo de seguida foi isolado e identificado o HTLV-2, e posteriormente o VIH. Ao vírus HTLV-1 está associado nos adultos à leucemia das células T/linfoma (ATLL). Estima-se que cerca de 10 a 20 milhões de pessoas de todo o mundo estejam infetadas por este vírus, e sabe-se que é endémico nalgumas partes do continente Africano, nas Caraíbas, no sudoeste do Japão e em Itália. Aproximadamente 4% dos indivíduos infetados pelo HTLV-1 desenvolvem ATLL, sendo o prognóstico de uma melhoria muito improvável (Shuh e Beilke, 2005). As suas formas de transmissão podem ser: através da amamentação, relações sexuais sem proteção, transfusões de sangue, bem como a partilha de seringas infetadas. O diagnóstico pode ser feito através da identificação dos anticorpos anti-HTLV-1 e anti-HTLV-2, através, por exemplo, de ensaios imunoenzimáticos (ELISA), assim como testes de confirmação como o *Western Blot* e o PCR, sendo este último o mais fiável e por isso mais usado na confirmação da infeção (Bangham e Osame, 2005; Barcellos *et al.*, 2006; Bittencourt, 1998; Bittencourt *et al.*, 2006). A prevenção da infeção por este vírus é importante de forma a evitar o aparecimento da ATL, assim como uma síndrome neurológica crónica degenerativa (mielopatia associada ao HTLV), ou outro tipo de patologias (dermatites infecciosas, artrite) (Bittencourt, 1998; Bittencourt *et al.*, 2006).

2.3.2 Síndrome da Imunodeficiência Adquirida e VIH

Existe uma grande variedade de doenças neurológicas e imunológicas associadas aos lentivírus, sendo a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida – SIDA – a doença mais estudada (Prusiner, 2002). O sistema imunitário dos indivíduos que apresentam esta síndrome é caracterizado pela sua debilidade progressiva, tornando-se muito vulneráveis a todo o tipo de infeções e tumores.

Em 1983 Luc Montagnier isolou e identificou o agente responsável pela doença (Montagnier, 1994). Trata-se de um retrovírus que modifica a composição genética das células que infeta, destruindo-as. A sua atual designação é Vírus da Imunodeficiência

Humana (VIH). São conhecidos dois tipos de vírus: VIH-1, principal responsável pela pandemia e o VIH-2 que tem uma expressão significativa em África e países da Europa como Portugal, França, Reino Unido e Bélgica (Araújo, 2005).

A SIDA caracteriza-se pelo aparecimento de uma ou mais infeções oportunistas. Também podem surgir hemopatias, linfomas ou sarcoma de Kaposi. Normalmente, uma infeção oportunista não se desenvolve num indivíduo imunocompetente. No entanto, em caso de SIDA, podem desenvolver-se várias infeções ao mesmo tempo (Montagnier, 1994).

A interação entre o sistema imunológico do hospedeiro e o VIH envolve, principalmente, os linfócitos T citotóxicos (LTCs e células T CD8⁺) e os linfócitos T *helper* CD4⁺ (células CD4), mas também outras células, como os macrófagos, as células dendríticas e as células *natural killer* – NK (Rang *et al.*, 2008). Como o nome indica, os linfócitos T citotóxicos destroem diretamente as células infetadas pelos vírus e também produzem e libertam citocinas antivirais. As células CD4⁺, ou células *helper*, podem por si só desempenhar um papel direto (lise das células alvo) no controle da replicação do VIH. Uma das características que define a infeção pelo VIH é a perda progressiva destas células (Norris *et al.*, 2004).

O VIH é um vírus de aproximadamente 100 nm de diâmetro, possui invólucro e apresenta na sua superfície uma membrana lipídica e duas glicoproteínas (gp41 e gp120) (Veronesi *et al.*, 2000). Dentro dessa membrana, está a matriz proteica, formada pela proteína p17 e pela capsíde composta pela proteína p24. No interior da capsíde, encontra-se o material genético, assim como as enzimas necessárias à replicação viral e o tARN (Luciw, 1996).

O genoma do VIH é composto por nove genes e duas regiões LTR. Os genes podem ser divididos em dois grupos: os que codificam as proteínas estruturais (gag, pol e env) e os que codificam proteínas não-estruturais (tat, ver, nef, vif, vpu, vpr) (Tabela I) (Veronesi *et al.*, 2000).

Tabela I – Função dos genes estruturais e não-estruturais do VIH-1 (Adaptado de Veronesi <i>et al.</i> , 2000)	
<u>Genes estruturais</u>	<u>Função</u>
<i>gag</i>	Codifica a matriz proteica, cápside e proteínas nucleares
<i>pol</i>	Codifica a transcriptase reversa (que também possui atividade de RNase H), protease e integrase
<i>env</i>	Codifica a proteína inicial de 160 kd que é clivada originando a proteína transmembranar (gp41) e a proteína de superfície (gp120)
<u>Genes não-estruturais regulatórios</u>	
<i>rev</i> (p19)	Transativador pós-transcricional (atua no processamento, transporte e tradução dos ARN mensageiros)
<i>tat</i> (p14)	Transativador da transcrição
<u>Genes não-estruturais acessórios</u>	
<i>vif</i> (p23)	Provavelmente atua na maturação da proteína de envelope
<i>vpr</i> (p15)	Atua na replicação viral
<i>vpu</i> (p15)	Atua na libertação da partícula viral
<i>nef</i> (p27)	Função por esclarecer. Pode reduzir ou aumentar a replicação viral. Parece diminuir a expressão de CD4 na superfície

Tal como referido anteriormente, os vírus necessitam de se ligar e penetrar numa célula de um hospedeiro vivo (animal, planta ou bactéria) e utilizar a maquinaria metabólica desse mesmo hospedeiro para se replicarem (Rang *et al.*, 2008).

2.4 Ciclo replicação viral do VIH

Para compreender melhor a forma como a transcriptase reversa pode ser utilizada como alvo terapêutico, é importante ficar a conhecer o ciclo de replicação viral do VIH.

O ciclo inicia-se com a ligação das partículas virais à superfície da célula, através da interação entre o domínio extracelular do VIH-1 (gp 120) e recetores celulares (Moore et al., 1993; Weiss, 1993). O principal recetor tanto para VIH-1, como VIH-2 é o CD4, enquanto que CCR5 e CXCR4 são os principais co-recetores do VIH-1 (Clapham e McKnight, 2002). Ocorre então a ligação ao co-recetor, a fusão das membranas da célula e do vírus, sendo essa reação mediada pela gp 41, (Lifson *et al.*, 1986; Simon *et al.*, 1998; Starcich *et al.*, 1993) e o núcleo viral é libertado para o citoplasma da célula. Diversos fatores celulares e proteínas virais como, MA, Nef e Vif contribuem para o desencapsulamento do vírus. O ARN viral é transcrito, através da enzima transcriptase reversa, em ADN de cadeia dupla (Hirsch e Curran, 1990; Harrich e Hooker, 2002). De seguida, ocorre a formação de um complexo de pré-integração (pre-integration complex – PIC) que vai interagir com as proteínas citoplasmáticas da célula hospedeira. Estas proteínas possibilitam a passagem do PIC para dentro do núcleo da célula hospedeira. O tamanho do PIC é importante de forma a que ele passe pelo poro da membrana nuclear. Após este processo, e através da ação da integrase e de outras proteínas celulares, o provírus é integrado no genoma da célula hospedeira (Tenório *et al.*, 2008). Uma vez integrado, o ADN viral permanece na célula enquanto ela estiver viva. O vírus é então libertado da célula, e durante este processo, a enzima protease torna a partícula viral madura e capaz de infetar uma nova célula, através do processamento das proteínas percussoras *pol* e *gag* (Luciw, 1996).

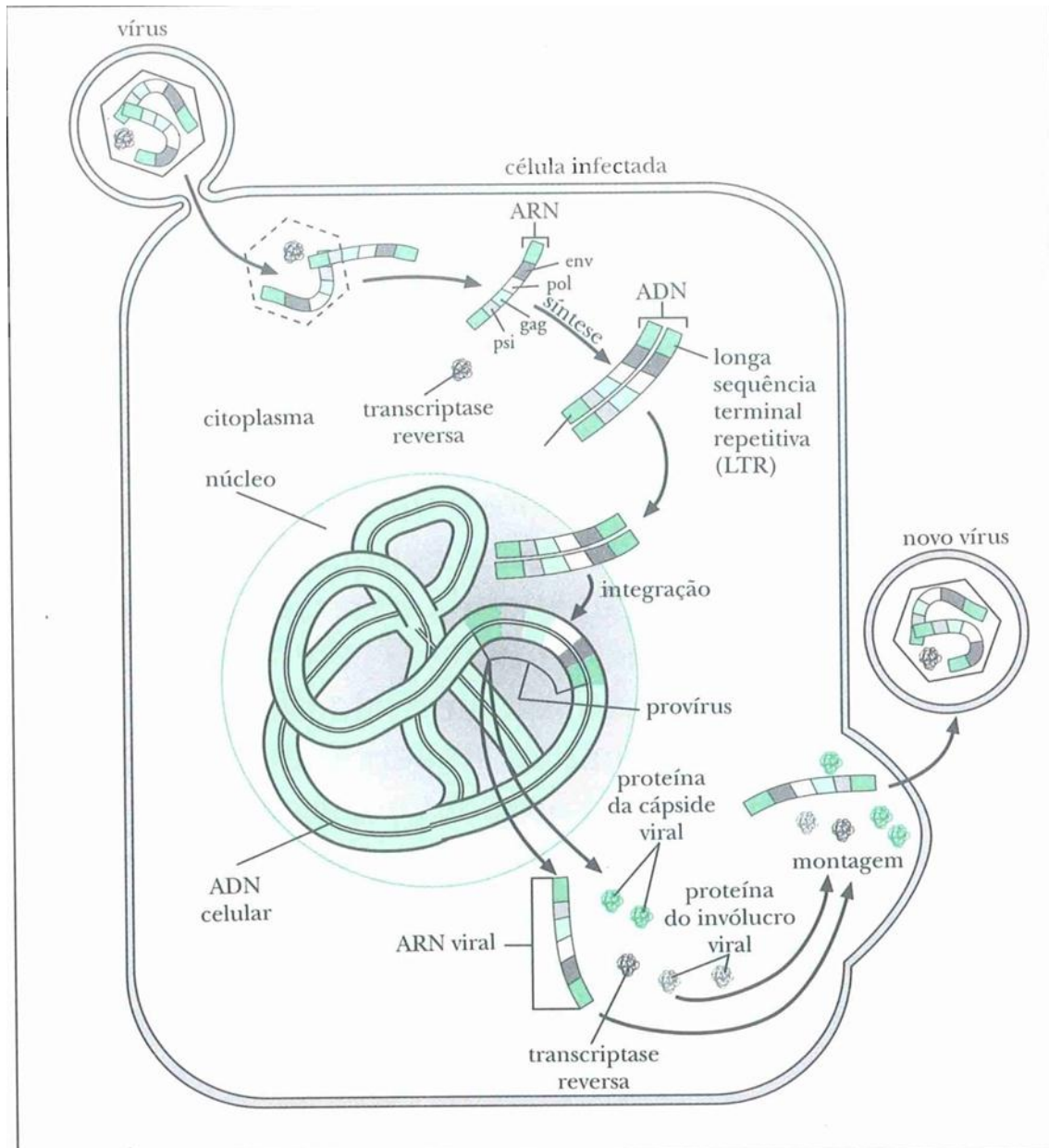


Figura 2 – Duplicação de um retrovírus, pela transcriptase reversa, de ARN viral para ADN viral (ou provirus) que se integra no genoma celular (Retirado de Montagnier, 1994).

O estudo e a interpretação deste ciclo viral permitiu o desenvolvimento de fármacos antiretrovirais.

É importante salientar, que quando estamos perante um indivíduo não tratado, 10^{10} novas partículas virais podem ser produzidas a cada dia. Além disso, o VIH intracelular pode permanecer na forma latente por longos períodos (Rang *et al.*, 2008).

2.5 VIH-1 e o processo de transcrição reversa

O VIH-1, assim como todos os retrovírus, para manter uma replicação estável, necessita de integrar uma cópia de ADN do seu genoma nos cromossomas dos hospedeiros (Sleiman *et al.*, 2012).

O seu genoma é constituído por duas cadeias simples de ARN, compostas por 9200 nucleótidos. (Yedavalli e Jeang, 2010). As duas moléculas de ARN estão associadas de forma não covalente, como um complexo dimérico (Sleiman *et al.*, 2012).

O processo de transcrição reversa conduz à formação de uma dupla cadeia linear de ADN, tendo como modelo o ARN genómico, através de uma serie de etapas complexas (Herschhorn e Hizi, 2010; Mougél *et al.*, 2009).

Este processo ocorre principalmente no citoplasma da célula do hospedeiro, dentro de um complexo de nucleoproteico (Bowerman *et al.*, 1989; Fassati e Goff, 1999, 2001), que apenas é permeável a pequenas moléculas, como por exemplo as dNTPs, o que permite conservar e evitar a perda do citoplasma bem como de outros fatores essenciais durante o processo de transcrição reversa (Fassati e Goff, 2001). Além disso, este complexo é importante porque também impede que o ARN viral e outros produtos da transcrição reversa sejam degradados pelas nucleases celulares (Sleiman *et al.*, 2012).

A transcrição reversa do VIH-1 ocorre no núcleo da cápside (Arhel *et al.*, 2007), e a partir de microscopia eletrónica de alta resolução é possível visualizar que as cápsides mantêm se associadas às partículas de ADN viral transcritas, desde da entrada na célula até ao momento em que o complexo atinge o poro nuclear (Sleiman *et al.*, 2012).

Assim sendo, a etapa da descapsidação na replicação do VIH-1, não se processa imediatamente após a fusão, mas sim, ocorre, no poro nuclear, a seguir à síntese de ADN viral (Arhel *et al.*, 2007).

Todo este processo é afetado pelo número de proteínas que foram ou não encapsuladas no virião, incluindo a a Nef (Aiken e Trono, 1995; Schwartz *et al.*, 1995), Tat (Harrich *et al.*, 1997), Vif (Goncalves *et al.*, 1996; Sova e Volsky, 1993), Vpr (Stark e Hay, 1998), a proteína de matriz (Kiernan *et al.*, 1998), NCp7 (Li *et al.*, 1996), a integrase (Tsurutani *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2004), a ciclofilina A (Thali *et al.*, 1994), a topoisomerase I (Takahashi *et al.*, 1995) e APOBEC3F (Holmes *et al.*, 2007).

Todos os retrovírus, para terem a capacidade de iniciar a transcrição reversa, necessitam de um iniciador de transcrição. No caso específico do VIH-1, esse iniciador é o tARNLys 3 (Mak e Kleiman, 1997; Rhim *et al.*, 1991).

Durante a formação do vírus, os principais recetores de tARNLys, tARNLys, tARNLys 1,2 e 3, são empacotados na mesma proporção, conforme são encontrados no citoplasma das células hospedeiras (Mak *et al.*, 1994).

A transcrição reversa do VIH-1 é iniciada a partir de uma molécula (tARNLys3) que é fundida com o ARN viral no local de ligação do iniciador da transcrição (PBS). Para ser possível este “corta e cola” da molécula tARNLys3 (mediado pela proteína de nucleocápside – NC), é necessário a abertura da sua estrutura tridimensional, bem como rearranjos na cadeia de ARN, de forma a formar um complexo de iniciação que seja reconhecido pela transcriptase reversa (Sleiman *et al.*, 2012).

A TR do VIH-1 converte o ARN viral em ADN de cadeia dupla no citoplasma da célula infetada. Este ADN de cadeia dupla é então transportado até ao núcleo, onde é integrado no genoma pela ação da integrase, formando-se assim o provírus. A ADN polimerase dependente de ARN do hospedeiro dá origem aos ARNs mensageiros virais. A TR por si só possui todas as capacidades enzimáticas necessárias para a conversão do ARN viral em ADN, sem ter a necessidade de recorrer a outras proteínas virais, assim como alguns fatores celulares (Singh *et al.*, 2010).

De forma a se iniciar a replicação, a TR necessita de um iniciador (*primer*) e de um molde (ARN viral). A replicação é iniciada a partir da molécula de tARNLys3 do hospedeiro (Singh *et al.*, 2010).

Como já referido, a enzima transcriptase reversa utiliza o genoma do vírus, como molde e a molécula tARNLys 3 como iniciador para sintetizar uma cadeia de

ADN (-), produzindo assim um híbrido de ARN-ADN. A parte final da cadeia do iniciador, tARN^{Lys} 3, isto é, a extremidade 3' é complementar à sequência do genoma viral, denominada local de ligação ao iniciador da transcrição (PBS) (Sleiman *et al.*, 2012).

A dupla cadeia de ARN-ADN é o substrato para a atividade da RNase H da transcriptase reversa, que divide/parte a cadeia de ADN em diversos pontos, resultando em fragmentos de ARN híbridos (ARN-ADN) (Sleiman *et al.*, 2012).

Estes fragmentos de ARN-ADN são constituídos por 2 sequências específicas ricas em purina, denominadas cadeias de polipurina (PPTs), que servem como iniciadores à síntese de mais uma cadeia de ADN, criando assim o genoma de cadeia dupla de ADN (Sleiman *et al.*, 2012).

Estes iniciadores serão então removidos pela acção da RNase H, e o ADN viral será então integrado no cromossoma do hospedeiro (Cherepanov *et al.*, 2011).

2.6 – Estrutura do ARN viral

O genoma do vírus, mais especificamente ARN viral, é composto por duas moléculas de ARN de polaridade positiva (Sleiman *et al.*, 2012).

Para além dos clássicos três genes *gag*, *pol* e *env* que codificam para proteínas estruturais e enzimáticas do envelope, proteínas reguladoras são também produzidas (*Tat*, *Rev*, *Vpu*, *Nef*, *Vif* e *Vpr*) (Frankel e Young, 1998). A figura 3A mostra a organização destes genes no ARN genómico de VIH-1.

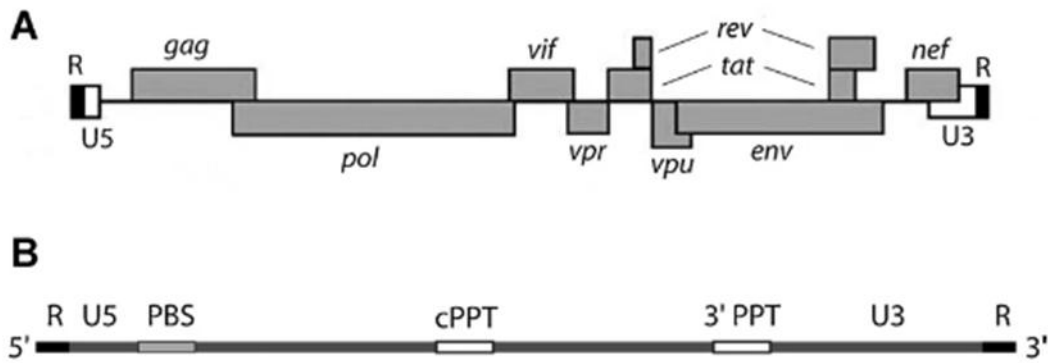


Figura 3 – Organização genômica na cadeia de ARN de VIH-1 (Retirado de Sleiman *et al.*, 2012)

A figura 3B mostra as regiões pertencentes ao ARN viral que estão envolvidas no processo de transcrição reversa.

A primeira região é a região R (redundante) e é composta por mais de cem nucleótidos (Sleiman *et al.*, 2012).

Esta região está presente nas duas cópias do ARN viral nas extremidades 5' e 3' e possibilita a transferência da primeira cadeia durante a transcrição reversa. Contém ainda duas hastes: a sequência TAR (elemento de resposta a *Tat*), composta por 57 nucleótidos e que está envolvida na expressão do ADN proviral através da proteína *Tat* (Peterlin *et al.*, 1986); e o *Poly(A)* que contém o sinal AAUAAA que é apenas funcional na região R na extremidade 3' do genoma do ARN (Sleiman *et al.*, 2012).

Na extremidade 5' está presente outra região, denominada região U5, composta por 83 nucleótidos e situa-se depois da região R e antes da região onde se inicia a transcrição reversa, ou seja, a região PBS (como é possível observar na figura 1B). Esta região é a primeira em que o seu genoma é reversamente transcrito, sobretudo devido à sua posição. Contém ainda, a sequência *att* que está envolvida na integração do ADN proviral no ADN da célula hospedeira (Sleiman *et al.*, 2012).

De seguida, como já referido, encontra-se a região PBS, composta por 18 nucleótidos, sendo esta sequência estritamente complementar aos 18 nucleótidos presentes na extremidade 3' da tRNA^{Lys} 3, que serve como iniciador à transcrição reversa. As sequências PPT (cPPT e 3'PPT), são caracterizadas por serem ricas em

purina e resistentes à atividade da RNase H. Servem como iniciadores à síntese da cadeia de cADN (+) (Sleiman *et al.*, 2012).

Por fim, a região U3, localizada na extremidade 3' antes da região R, serve sobretudo como reguladora da transcrição devido à ação de fatores celulares (Sleiman *et al.*, 2012).

2.7 – A transcriptase reversa do VIH-1

A transcriptase reversa viral é codificada pelo gene *pol* e inicialmente introduzida nos viriões como um precursor *gag-pol*. A atividade proteolítica na TR conduz à produção de um homodímero (p66), em que cada subunidade contém a polimerase e um domínio de RNase H. Este domínio é posteriormente removido através de uma proteólise de uma das subunidades, obtendo-se assim, o heterodímero maduro da TR p51/p66 (Sleiman *et al.*, 2012).

A subunidade p66, que contém como já foi dito, a ADN polimerase e domínios de RNase H, é importante na catalização de um complexo e conversão da cadeia simples de ARN na cadeia dupla de ADN (Hostomsky *et al.*, 1992, Kohlstaedt e Steitz, 1992).

A TR do VIH-1 tem sido alvo de inúmeros fármacos, sendo eles componentes fundamentais na terapia antirretroviral de alta atividade (HAART) (Sleiman *et al.*, 2012).

Um dos passos fundamentais na replicação do VIH é a transcrição reversa do genoma de ARN viral de cadeia simples (+) para ADN de cadeia dupla (dsADN). Por um lado se as proteínas virais e algumas enzimas participam neste processo de conversão de ARN para ADN, a transcrição reversa é essencialmente dependente da atividade da enzima transcriptase reversa (Coffin *et al.*, 1997).

O VIH-1 TR tem duas atividades distintas: ADN polimersase, utilizando quer ARN ou ADN como molde; e atividade de RNase H, que degrada o ARN a partir de híbridos de ADN/ARN (Gilboa *et al.*, 1979). O VIH-1 TR não tem a capacidade de verificação (*proof-reading*), ao contrário das outras ADN polimersases (Sleiman *et al.*, 2012).

O VIH-1 TR é um heterodímero constituído por duas subunidades, a p66 e a p51. A subunidade p66 é composta por 560 aminoácidos, e possui os locais ativos para as funções de polimerização e de RNase H da enzima. A subunidade p51 é composta pelos primeiros 440 aminoácidos da subunidade p66 e resulta da ação da RNase H na subunidade p66 (Champoux, 1993).

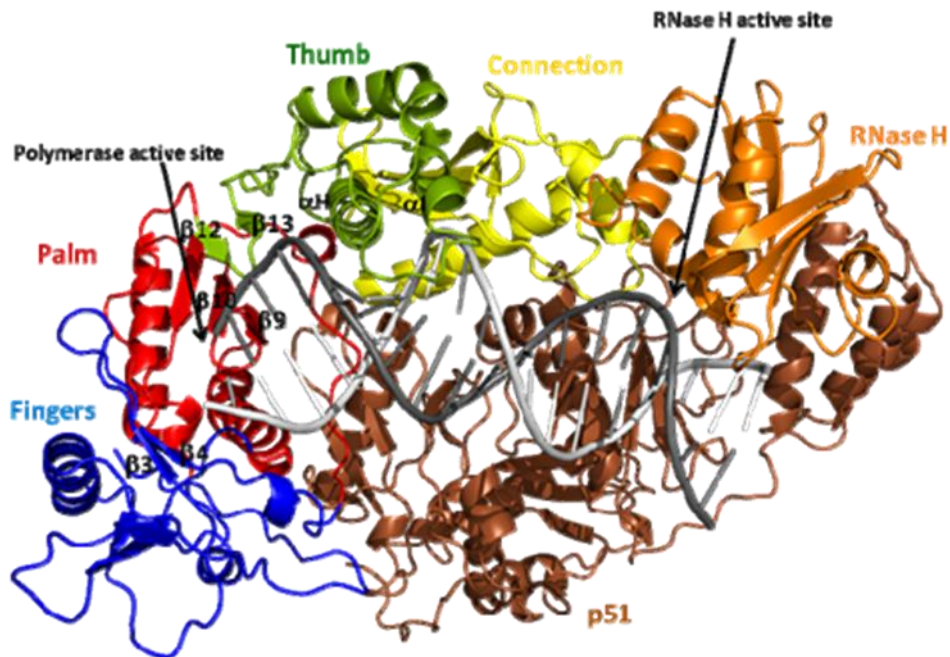


Figura 4 – Estrutura da TR de VIH-1 (Retirado de Sleiman *et al.*, 2012)

A subunidade p66 possui uma forma semelhante a uma mão fechada, e por isso, os seus subdomínios são denominados como palma (representado a vermelho), dedos (representado a azul), e polegar (representado a verde) (Sleiman *et al.*, 2012).

O local de ação da polimerase e RNase H estão representados a laranja. A região entre estes dois últimos está representada a amarelo e é chamada de ligação subdomínio (Sleiman *et al.*, 2012).

A subunidade p51 (representada a castanho escuro), como já referido, provem da ação proteolítica da RNase H sobre a subunidade p66. As suas estruturas quer primárias, quer secundárias são idênticas, no entanto a sua estrutura terciária, é diferente da p66 porque conduz a um arranjo não funcional de resíduos catalíticos (Sleiman *et al.*, 2012).

Na fenda de ligação do ADN, formada pela subunidade p66, é possível observar o *primer* iniciador, representado a branco/cinza (Sleiman *et al.*, 2012).

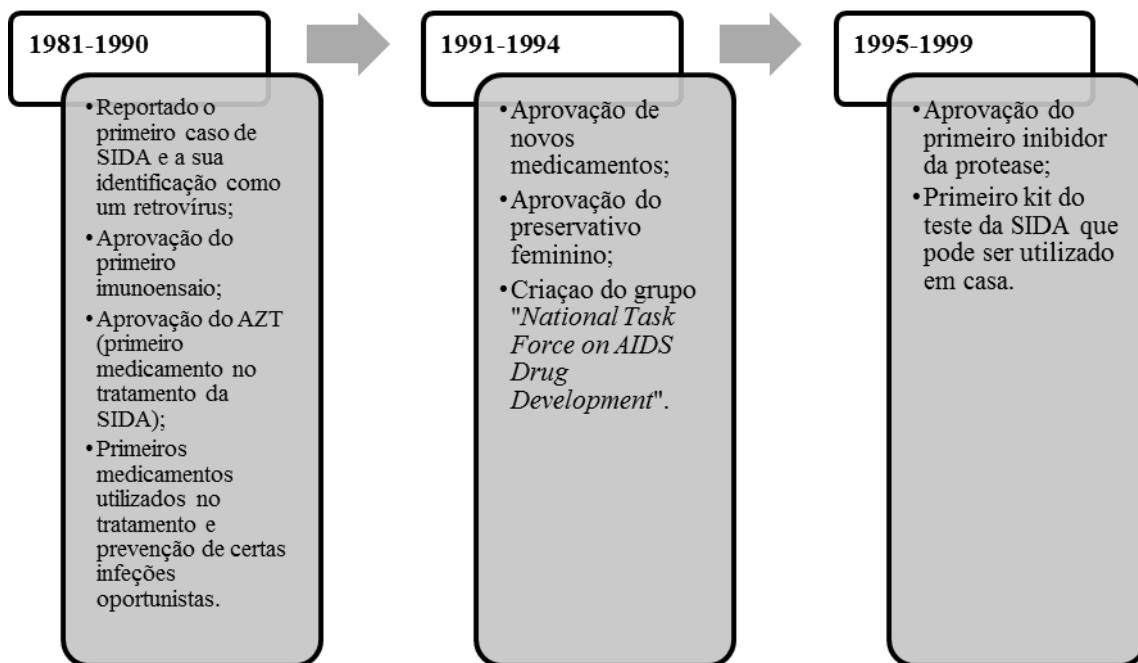
Devido ao seu papel essencial no ciclo de vida do vírus, a TR do VIH-1 tem sido um alvo importante de fármacos antivirais (Sleiman *et al.*, 2012).

Capítulo III – Terapia antirretroviral

3.1 Fármacos antirretrovirais

O avanço mais significativo, em termos de gestão da infeção VIH-1, pode ser atribuído ao tratamento dos pacientes através da utilização de fármacos antivirais, os quais podem suprimir a replicação do VIH-1 a níveis indetetáveis (Arts e Hazuda, 2012).

É possível, portanto, estabelecer uma cronologia temporal no que diz respeito a este tipo de fármacos.



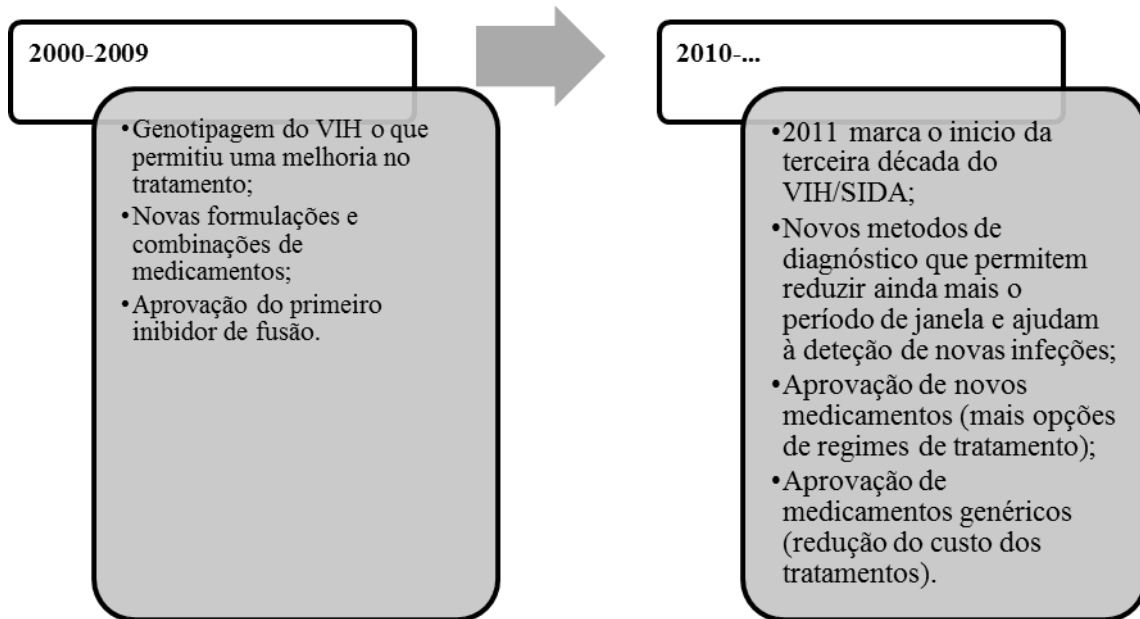


Figura 5 – Cronologia temporal dos vários pontos importantes da era dos fármacos antirretrovirais (Adaptado de U.S. Department of Health & Human Services, 2013).

Até à data, estão disponíveis cerca de 36 medicamentos para o tratamento de infeções VIH, todos eles aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) (U.S. Department of Health & Human Services, 2013). Estes fármacos antiretrovirais são formulados individualmente ou em combinação, para o tratamento de pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Humana (SIDA), e condições relacionadas, sendo a maioria medicamentos orais, administrados em horários convenientes (Broder, 2010).

Podemos dividir este tipo de fármacos em seis classes distintas (Collier *et al.*, 1996; D'Aquila *et al.*, 1996; Staszewski *et al.*, 1996):

- inibidores da transcriptase reversa análogos dos nucleosídeos (ITRAN);
- inibidores da transcriptase reversa não análogos dos nucleosídeos (ITRNAN);
- inibidores da protease;
- inibidores da integrase;
- inibidores de fusão; e
- antagonistas co-receptor

Na tabela seguinte (Tabela II) estão representados os mais importantes ITRAN disponíveis, bem como algumas das suas características.

Tabela II – Inibidores da transcriptase reversa análogos dos nucleosídeos (ITRAN)
(Adaptado de Meliço-Silvestre e Saraiva da Cunha, 2003).

Nome genérico	Zidovudina (AZT, ZDV)	Didanosina (ddI)	Zalcitabina (ddC)	Estavudina (D4T)	Lamivudina (3TC)	Abacavir (ABC)	Tenofovir disoproxil fumarato
Marca	Retrovir®	Videx®, Videx EC®	Hivid®	Zerit®	Epivir®	Ziagen®	Vread
Interação com alimentos	Sem efeito	Tomar 1/2h antes ou 1h depois das refeições	Sem efeito	Sem efeito	Sem efeito	Sem efeito (o álcool aumenta os níveis de ABC em 41%)	Aumento da biodisponibilidade quando tomado com as refeições
Biodisponibilidade oral	60%	40%-30%	85%	86%	86%	83%	25% em jejum; 39% com refeição gorda
Semi-vida sérica	1,1h	1,6h	1,2h	1,0h	3-6h	1,5h	17h
Semi-vida intracelular	3h	25-40h	3h	3,5h	12h	3,3h	10-50h
Toxicidade mais importante	Anemia, cefaleias, intolerância GI, insónia	Pancreatite, neuropatia periférica, náusea, diarreia	Neuropatia periférica, estomatite	Pancreatite, neuropatia periférica, fraqueza neuromuscular	Toxicidade mínima	Reação de hipersensibilidade (pode ser fatal), febre, náusea, vômitos, mal estar, fadiga, perda do apetite, sintomas respiratórios	Astenia, cefaleias, diarreia, náusea, vômitos, flatulência
Nota	A acidose láctica com esteatose hepática é um efeito raro mas potencialmente fatal dos ITRAN						

É importante salientar que deve ser interrompida de imediato a toma de Abacavir nos doentes que apresentam sinais ou sintomas de hipersensibilidade, como febre, fadiga, vômitos, diarreia e dor abdominal. Além disso a sua toma não deverá ser reiniciada uma vez que, os sintomas reaparecem com maior gravidade incluindo hipotensão grave e morte (Meliço-Silvestre e Saraiva da Cunha, 2003).

Dos fármacos acima apresentados, o primeiro a ser administrado a doentes com infecção VIH-1, bem como, o primeiro a ser aprovado foi o Zidovudina (segundo FDA).

No que diz respeito aos ITRNAN, a tabela seguinte (Tabela III), resume os mais importantes assim como algumas das suas características.

Tabela III – Inibidores da transcriptase reversa não análogos dos nucleosídeos (ITRNAN) (Adaptado de Meliço-Silvestre e Saraiva da Cunha, 2003).

Nome genérico	Nevirapina (NVP)	Delavirdina (DLV)	Efavirenz (EFV)
Marca	Viramune®	Rescriptor®	Sustiva®, Stocrin®
Interação com alimentos	Sem efeito	Sem efeito	Evitar tomar com refeições muito gordas
Biodisponibilidade oral	> 90%	85%	Dados não disponíveis
Semi-vida sérica	25-30h	5,8h	40-55h
Toxicidade mais importante	Hepatite com necrose hepática	Aumento das transaminases, cefaleias	Sintomas no SNC (sonolência, confusão, amnésia, dificuldade de concentração), aumento das transaminases, teratogénico apenas em macacos

Outra classe distinta dos dois anteriores grupos mas igualmente importante, são os fármacos pertencentes à classe dos inibidores da protease do VIH (Tabela III).

Tabela IV – Inibidores da protease (Adaptado de Meliço-Silvestre e Saraiva da Cunha, 2003).

Nome genérico	Indinavir (IDV)	Ritonavir (RTV)	Saquinavir (SQV)	Saquinavir (SQV)	Nelfinavir (NFV)	Amprenavir	Lopinavir/ritonavir
Marca	Crixivan®	Norvir®	Invirase®	Fortovase®	Viracept®	Agenerase®	Kaletra®
Interação com alimentos	Tomar 1h antes ou 2h após as refeições	Tomar se possível com as refeições pois poderá ser melhor tolerado	Sem interação com as refeições se tomado juntamente com o RTV	Tomar com refeição maior	Tomar com refeição ou lanche	Evitar refeições muito gordas	Evitar refeições moderadamente gordas
Biodisponibilidade oral	65%	Não determinada	4%	Não determinada	20-80%	Não determinada	Não determinada
Semi-vida sérica	1,5-2h	3-5h	1-2h	1-2h	3,5-5h	7,1-10,6h	5-6h
Toxicidade mais importante	Nefrolitíase, intolerância GI, náusea, aumento das transaminase, cefaleias, anemia hemolítica	Intolerância GI, náusea, vômito, diarreia, hepatite, pancreatite, aumento dos triglicérides, transaminases e ácido úrico	Intolerância GI, náusea, diarreia, cefaleias, aumento das transaminases	Intolerância GI, náusea, diarreia, dor abdominal, dispepsia, cefaleias e aumento das transaminases	Diarreia	Intolerância GI, náusea, vômitos, diarreia e aumento das transaminases	Intolerância GI, náusea, vômitos, diarreia, astenia e aumento das transaminases
Nota	Possível aumento de episódios hemorrágicos em doentes com hemofilia Redistribuição da gordura e alterações lipídicas Hiperglicemia						

De forma a reverter a redistribuição da gordura corporal poderá ser necessário a suspensão da toma de qualquer fármaco pertencente a esta classe. Além disso existe uma dificuldade acrescida no controlo dos níveis de glicemia nos doentes com diabetes prévia bem como em novos casos de diabetes (Meliço-Silvestre e Saraiva da Cunha, 2003).

É importante referir que existem fármacos que não devem ser administrados concomitantemente com os antirretrovirais. A tabela seguinte (Tabela V) exemplifica alguns desses casos comparando diversos antirretrovirais com diferentes classes de outro tipo de fármacos.

Tabela V – Fármacos que não devem ser utilizados com os antirretrovirais
(Adaptado de Meliço-Silvestre e Saraiva da Cunha, 2003).

	Bloqueador es canais de cálcio	Cardíaco	Agentes hipolipemiant es	Anti- micobacterianos	Anti- histamínicos	GI	Neuroléptico	Psicotrópicos
INDINAVIR	Nenhum	Nenhum	Sinvastatina Lovastatina	Rifampicina	Astemizol Terfenadrina	Cisapride	Nenhum	Midazolam Triazolam
RITONAVIR	Bepridil	Amiodarona Flecainida Propafenona Quinidina	Sinvastatina Lovastatina	Nenhum	Astemizol Terfenadrina	Cisapride	Pimozide	Midazolam Triazolam
SAQUINAVIR	Nenhum	Nenhum	Sinvastatina Lovastatina	Rifampicina	Astemizol Terfenadrina	Cisapride	Nenhum	Midazolam Triazolam
NELFINAVIR	Nenhum	Nenhum	Sinvastatina Lovastatina	Rifampicina	Astemizol Terfenadrina	Cisapride	Nenhum	Midazolam Triazolam
AMPRENAVIR	Bepridil	Nenhum	Sinvastatina Lovastatina	Rifampicina	Astemizol Terfenadrina	Cisapride	Nenhum	Midazolam Triazolam
LOPINAVIR/ RITONAVIR	Nenhum	Flecainida Propafenona	Sinvastatina Lovastatina	Rifampicina	Astemizol Terfenadrina	Cisapride	Pimozide	Midazolam Triazolam
NEVIRAPINA	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Sem dados	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum
DELAVIRDINA	Nenhum	Nenhum	Sinvastatina Lovastatina	Rifabutina Rifampicina	Astemizol Terfenadrina	Cisapride Inibidores H2 Inibidores Bomba Protões	Nenhum	Midazolam Triazolam
EFAVIRENZ	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Astemizol Terfenadrina	Cisapride	Nenhum	Midazolam Triazolam

De uma forma mais resumida, a imagem seguinte apresenta diversos fármacos de acordo com o seu local de ação. Os fármacos a negrito correspondem aos fármacos aprovados pela FDA, enquanto que os restantes correspondem a fármacos de ensaios pré-clínicos ou fármacos que foram retirados.



Figura 6 – Relação fármacos e o seu local de ação (Retirado de Arts e Hazuda, 2012)

3.2 Inibidores da transcriptase reversa análogos dos nucleosídeos (ITRAN)

Os ITRAN foram a primeira classe de fármacos a serem aprovados pela FDA (Young, 1988). Todos eles são pró-fármacos, ou seja, dentro da célula necessitam de ser fosforilados para exercerem a sua ação (Mitsuya *et al.*, 1985).

Existem três fatores determinantes que afetam a potência dos ITRAN, são eles: a eficiência em que estes fármacos (pró-fármacos) são convertidos na sua espécie ativa, sob a forma de trifosfato (De Clercq, 2004; Parniak e Sluis-Cremer, 2000); a ativação destes, é feita por quinases celulares que possibilitam a agregação de α , β e γ fosfatos aos pró-fármacos (por exemplo no caso do fármaco Tenofovir, como este já possui um grupo fosfato só necessita da adição de apenas dois fosfatos); e a forma de trifosfato deve ser um inibidor eficaz da TR do VIH (Perno *et al.*, 1988).

Importante também referir que segundo Schneider *et al.* (2000) e Gallois-Montbrun *et al.* (2002), a ausência de um grupo 3'-OH nesta classe de fármacos, diminui significativamente a eficácia de ativação, a potência total e as interações com a TR.

Outro ponto importante, é a variação que existe dentro desta classe em termos de eficácia de incorporação dos trifosfatos por parte da TR, como por exemplo existe uma incorporação mais eficiente no caso da zidovudina, sob a forma de zidovudina-5'-trifosfato (AZT-TP) (Kerr e Anderson, 1997), do que acontece com a lamivudina, sob a forma de lamivudina-5'-trifosfato (3TC-TP) (Feng e Anderson, 1999).

3.2.1 Zidovudina

i) Principais Características

O primeiro fármaco pertencente aos ITRAN, aprovado pela FDA foi a Zidovudina (AZT). A Zidovudina (3' -azido-3' -desoxitimidina) é um análogo da timidina com atividade antiviral contra o VIH-1, o VIH-2, entre outros retrovírus (Mitsuya *et al.*, 1985; McLeod e Hammer, 1992). A infecção aguda por VIH-1, mais propriamente em linhagens humanas de células T e em linfócitos sanguíneos periféricos,

é inibida por este fármaco no intervalo de concentrações de $<0,001$ a $0,04 \mu\text{g/ml}$. Tem também a capacidade de inibir a replicação do VIH em macrófagos cerebrais humanos, assim como outros vírus como o HBV e o EBV, no entanto em monócitos-macrófagos humanos ou em células quiescentes é menos activo (Geleziunas *et al.*, 1993).

ii) Mecanismo de ação e resistência

Quanto ao seu mecanismo de ação, o fármaco após entrada nas células hospedeiras é fosforilado pela timidina cinase celular (Furman *et al.*, 1986). Nas células estão presentes níveis altos de monofosfato e níveis baixos de difosfato e trifosfato. O trifosfato de zidovudina, que possui uma semi-vida intracelular de 3h, inibe competitivamente a transcriptase reversa em relação ao trifosfato de timidina (TTP). É importante salientar também que a zidovudina conduz à interrupção da cadeia de ADN, devido ao seu grupo 3'-azido que impede a formação de ligações 5'-3' fosfodiester (St. Clair *et al.*, 1987).

Por outro lado, o monofosfato de zidovudina também inibe de forma competitiva a timidilato cinase celular o que resulta na redução dos níveis intracelulares de TTP. Assim, como se verifica uma redução da competição pelo trifosfato de zidovudina, é possível que exista um aumento dos efeitos antivirais e citotóxicos por parte deste fármaco (Furman *et al.*, 1986). A seletividade antiviral da zidovudina pode ser explicada pela maior afinidade pela transcriptase reversa do VIH do que pelas ADN polimerases humanas (Ono *et al.*, 1989).

Podemos associar a resistência a mutações que conduzem a substituições de aminoácidos em múltiplos locais na TR, mais especificamente os codões 41, 67, 70, 215 e 219. Este tipo de mutações surge de forma sequencial e são necessárias várias mutações para conferir um alto nível de resistência (Brunton, *et al.*, 2006).

iii) Absorção, distribuição e eliminação

É um fármaco que é rapidamente absorvido, sendo a sua biodisponibilidade oral de aproximadamente 60% (Dudley, 1995; Blum *et al.*, 1988). Em pacientes infetados por VIH, a absorção varia amplamente e fica retardada pela ingestão de alimentos. As

concentrações encontradas na saliva são idênticas às presentes na corrente sanguínea, sendo menores no sémen. As concentrações no sangue do recém-nascido são maiores, e as concentrações no líquido amniótico são superiores aos níveis séricos maternos (Watts *et al.*, 1991).

O tempo de semi-vida plasmático está compreendido no intervalo de 0,9 a 1,5 horas. Este fármaco sofre um efeito de primeira passagem, sendo prontamente convertido no seu metabolito 5' -O-glicuronídeo, cujo seu tempo de semi-vida plasmático é idêntico, no entanto não possui qualquer tipo de atividade antiviral. Encontra-se também presente no plasma baixas concentrações de outro metabolito, a 3' -amino-3' -desoxitimidina, que poderá contribuir para a mielotoxicidade (Stagg *et al.*, 1992). A depuração renal envolve tanto a secreção tubular como a filtração glomerular, e após a administração oral e em média, há uma recuperação ao nível da urina de 14% e 75% do fármaco e do seu metabolito glicuronidico, respectivamente (Brunton, *et al.*, 2006).

iv) Efeitos adversos

Os dois principais efeitos adversos deste fármaco são a granulocitopenia e a anemia (McLeod e Hammer, 1992). Este tipo de toxicidade hematológica está aumentada quando se utilizam doses maiores de zidovudina, no caso da terapia prolongada e quando se verifica uma diminuição das células CD4 no caso de doença avançada. No caso das doses actualmente recomendadas, cerca de 30 a 40% dos pacientes infectados por VIH manifestam anemia e granulocitopenia (Volberding *et al.*, 1990; Fischl *et al.*, 1990a; Fischl *et al.*, 1990b).

Na fase inicial da terapia com zidovudina ocorrem diversos efeitos adversos como cefaleias intensas, náuseas, vômitos, insónia e mialgia, no entanto estes sintomas têm tendência a diminuir com a continuidade do tratamento. Pigmentação ungueal, miopatia, neurotoxicidade também são outros efeitos adversos possíveis, enquanto que, mais raramente, pode surgir edema macular, ulceração esofágica e hepatite. A hepatite, por seu lado, pode associar-se a dor, fraqueza e alteração morfológica mitocondrial (Dalakas *et al.*, 1990). Também foram descritos outros sintomas como acidose láctica

grave e hepatomegalia com esteatose (Chattha *et al.*, 1993). A zidovudina é mutagénica *in vitro* e é embriotóxica em animais. (Brunton, *et al.*, 2006).

v) Uso terapêutico

A zidovudina é considerada o principal agente para o tratamento do vírus VIH de pacientes com contagens de CD4 inferiores a $500/\text{mm}^3$. Este fármaco reduz o número de infeções oportunistas, conduzindo a uma melhor qualidade de vida, ao prolongamento da sobrevivência e verifica-se também um aumento nas contagens de CD4 (McLeod e Hammer, 1992).

Segundo Fischl *et al.*, doses de 500 a 600 mg/dia deste fármaco são igualmente eficazes em relação a doses superiores, com a vantagem de serem significativamente menos tóxicas (Fischl *et al.*, 1990).

Ficou provado então, que doses diárias de 500mg de zidovudina retardam a progressão da doença em pacientes infetados pelo VIH com sintomas iniciais ou assintomáticos e contagens de linfócitos CD4 inferiores a $500/\text{mm}^3$ (Volberding *et al.*, 1994; Fischl *et al.*, 1994).

É de realçar também o facto, de que a administração de zidovudina em mulheres infetadas durante a gestação, com uma dose diária de 500mg com início entre a 14^a e 34^a semana em conjunto com a administração intravenosa durante o parto, bem como nos seus recém-nascidos, com uma dose de 2 mg/kg a cada 6 horas por um período de 6 semanas, com início 8 a 12 horas após o parto, reduz o risco de transmissão neonatal do VIH em 68% (Connor *et al.*, 1994).

Em termos de resistência e segundo Richman, (1993), existe uma correlação entre a frequência e o grau de resistência à zidovudina, com o estágio da infeção, com a contagem de CD4 e com a duração da terapia.

3.2.2 Didanosina

i) Principais Características

A didanosina (ddl) (2'-3'-didesoxiinosina) é um análogo do nucleosídeo purínico e tem ação contra VIH-1 e VIH-2 e também contra a maioria dos isolados resistentes à zidovudina (McLaren *et al.*, 1991).

No que diz respeito à sua atividade antiviral e sua citotoxicidade em células mononucleares de sangue periférico é cerca de 10 a 1000 vezes menos potente que a zidovudina. No entanto, é mais ativa em monócitos-macrófagos humanos que não estejam em processo de divisão (Gao *et al.*, 1993). Note-se que não exerce qualquer tipo de toxicidade para células precursoras hematopoiéticas ou para linfócitos (Heagy *et al.*, 1991; Sommadossi, 1993).

ii) Mecanismo de ação e resistência

Inicialmente a didanosina difunde para o interior das células, sendo metabolizada pela 5'-nucleotidase e outras enzimas, obtendo-se assim a sua forma ativa, o 2', 3'-trifosfato de dideoxiadenosina (ddATP). O trifosfato, por sua vez, atua de duas formas, como inibidor competitivo da transcriptase reversa viral em relação ao trifosfato de desoxiadenosina e como um elemento de interrupção da cadeia da síntese de ADN viral (Brunton, *et al.*, 2006). Em termos de seletividade, esta está relacionada com o facto de existir uma maior afinidade da ddATP pela transcriptase reversa viral do que pelas ADN polimerases celulares. A didanosina inibe também a síntese de ADN mitocondrial (Chen *et al.*, 1991).

A resistência a este fármaco está relacionada com a diminuição de 2 a 25 vezes na sensibilidade *in vitro*, como também a mutações no codão 74, 135 ou 184 da transcriptase reversa (St. Clair *et al.*, 1991; Reichman *et al.*, 1993).

iii) Absorção, distribuição e eliminação

A biodisponibilidade oral da didanosina varia com fatores como a dose, é menor com doses maiores de fármaco e é menor também em crianças. O intervalo de valores para a biodisponibilidade oral da didanosina situa-se entre 35 a 45% (Knupp *et al.*, 1991; Balis *et al.*, 1992).

A administração concomitante com alimentos pode diminuir a absorção da didanosina em 50% ou mais. O tempo de semi-vida é, em média, de 0,6 a 1,5 horas, mas triplica na insuficiência renal. A eliminação deste fármaco situa-se entre 40 a 60%, sem sofrer modificações na urina, por filtração glomerular e secreção tubular, após administração de uma dose intravenosa. (Brunton, *et al.*, 2006).

iv) Efeitos adversos

Os principais efeitos adversos dose-dependentes da didanosina são uma neuropatia periférica dolorosa e a pancreatite. Ambas estão associadas a doses maiores do fármaco, superiores a 750 mg/dia, e desenvolvem-se nos primeiros 3 a 6 meses de tratamento (Liebman e Cooley, 1993). No caso da pancreatite, o seu aparecimento está relacionado com diversos fatores como, quando existe história prévia de pancreatite, quando há uma exposição à pentamidina por via intravenosa e na doença avançada por VIH.

Outros efeitos podem ocorrer, como por exemplo, diarreia, erupções cutâneas, distúrbios do sistema nervoso central, que incluem cefaleia, insônia e convulsões, aumento dos níveis de aminotransferases e ácido úrico, entre outros menos comuns (Brunton, *et al.*, 2006).

v) Uso terapêutico

Indicado em adultos e em crianças com mais de 6 meses de idade em que apresentem intolerância ou agravamento da sua condição depois da utilização de zidovudina, para o tratamento da infeção avançada por VIH. Administra-se também a pacientes com doença avançada por VIH que tenham usado zidovudina por 4 meses ou mais. Em pacientes com 4 meses ou mais de terapia prévia com zidovudina, a

administração de didanosina, com uma dose diária dupla de 250 mg, reduz significativamente novos diagnósticos de SIDA quando comparado com a administração de zidovudina, no entanto, em termos de prolongamento da sobrevida não tem esse efeito (Kahn *et al.*, 1992; Spruance *et al.*, 1994).

Nos casos de pacientes com infecção avançada que tenham intolerância ou que a zidovudina não tenha sido eficaz, a didanosina tem a capacidade de atrasar a progressão da doença (Abrams *et al.*, 1994).

3.2.3 Estavudina

i) Principais Características

A estavudina (d4T) (2', 3' -didesidro-2', 3'-didesoxitimedina) é caracterizada como análogo do nucleosídeo timidina e tem a capacidade de inibir a replicação do VIH-1 em concentrações semelhantes às da zidovudina (Brunton, *et al.*, 2006).

Em relação à zidovudina, as estirpes de VIH-1 resistentes a este fármaco, são sensíveis à estavudina, além disso a estavudina tem a vantagem, em relação à zidovudina, de ser 10 vezes menos tóxica para as células progenitoras da medula óssea *in vitro* (Sommadosi, 1993), no entanto a estavudina inibe a síntese mitocondrial de ADN (Chen *et al.*, 1991).

ii) Mecanismo de ação e resistência

Após a entrada nas células por difusão, a estavudina é de imediato fosforilada pela timidina cinase celular. As enzimas celulares irão converter de forma rápida o monofosfato em difosfato e trifosfato. Por sua vez, o trifosfato de estavudina atua como inibidor competitivo da transcriptase reversa em relação ao trifosfato de desoxitimidina, e a sua incorporação conduz à interrupção do alongamento da cadeia de ADN (Riddler *et al.*, 1995). Este trifosfato de estavudina também tem a capacidade de inibir as polimerases β e γ (Ono *et al.*, 1989).

É de realçar que existe uma variante de VIH-1, com uma mutação no codão 75 da transcriptase reversa, que possui uma resistência cruzada para estavudina, didanosina e zalcitabina (Lacey e Larder, 1994).

iii) Absorção, distribuição e eliminação

Em termos de estabilidade, este fármaco é estável em meio ácido e é bem absorvido após a administração oral. O tempo de semi-vida é de aproximadamente 1 hora e cerca de 40% do fármaco surge na urina sem sofrer qualquer tipo de modificação quer por secreção tubular, quer por filtração glomerular (Brunton, *et al.*, 2006).

iv) Efeitos adversos

A neuropatia periférica sensitiva dolorosa é o principal efeito adverso associado à estavudina (Browne *et al.*, 1993). Este efeito pode tornar-se reversível, com a suspensão do fármaco, com a possibilidade de continuidade do tratamento com doses menores de fármaco. Portanto são aconselhadas doses reduzidas, mais propriamente 20 mg duas vezes ao dia, para pacientes com infeção avançada, com o objetivo de reduzir esta toxicidade associada (Brunton, *et al.*, 2006).

Como tal é muito importante evitar a administração de estavudina a pacientes que estejam a ser medicados com didanosina e zalcitabina a fim de reduzir os riscos do aparecimento de uma neuropatia (Brunton, *et al.*, 2006).

v) Uso terapêutico

Indicado para pacientes adultos que apresentem intolerância a outras terapias para o tratamento de infeção avançada por VIH. Mais especificamente, em pacientes com SIDA ou infeção avançada por VIH e contagens de CD4 \leq 400/mm³, o uso de estavudina origina melhorias significativas em termos dos sintomas clínicos, nos níveis do antígeno p24 e nas contagens de CD4 (Browne *et al.*, 1993).

3.2.4 Zalcitabina

i) Principais Características

A zalcitabina (ddC) (2', 3'-didesoxicitidina), análogo do nucleosídeo citosina, tem a vantagem de ser eficaz contra VIH-1 e VIH-2, como também contra estirpes resistentes à zidovudina (Broder, 1990; Whittington e Brogden, 1992). É mais ativa em monócitos/macrófagos e possui uma potência semelhante em células mononucleares do sangue periférico em relação à zidovudina (Sommadossi, 1991).

ii) Mecanismo de ação e resistência

Através do processo de difusão facilitada entra nas células e é fosforilada pela desoxicitidina cinase juntamente com outras enzimas celulares dando origem ao seu metabolito ativo, 5'-trifosfato de didesoxicitidina (ddCTP) (Broder, 1990; Whittington e Brogden, 1992). O trifosfato atua como inibidor competitivo da transcriptase reversa em relação ao trifosfato de desoxicitidina (dCTP) o que leva à interrupção do alongamento da cadeia de ADN viral. Inibe também a ADN polimerase β celular (Ono *et al.*, 1989).

Tem a capacidade ainda de inibir a síntese mitocondrial de ADN em baixas concentrações e de reduzir as dimensões do *pool* intracelular de dCTP, potencializando assim a sua atividade antiviral (35he net *al.*, 1991).

As estirpes resistentes apresentam mutações da transcriptase reversa dos codões 65, 69 ou 184 (Gu *et al.*, 1994).

iii) Absorção, distribuição e eliminação

A biodisponibilidade oral varia, visto que, em adultos atinge cerca de 80% enquanto que nas crianças esse valor poder ser menor (Broder, 1990). O tempo de semi-vida varia no intervalo de 1 a 3 horas e aumenta proporcionalmente à queda da função renal. A principal via de eliminação é a excreção renal e após administração intravenosa, aproximadamente 75% do fármaco é recuperado na urina sem sofrer nenhuma alteração (Brunton, *et al.*, 2006).

iv) Efeitos adversos

Como acontece com outros fármacos, o principal efeito adverso é também a neuropatia periférica, o que por si só constitui um fator determinante para a dose de zalcitabina a administrar (Fischl *et al.*, 1993; Whittington e Brogden, 1992). A administração de doses atualmente recomendadas, sugere que 30% dos pacientes acabam por desenvolver este efeito adverso, estando este risco aumentado, com contagens baixas de CD4, com a insuficiência renal, com a administração de fármacos nefrotóxicos, como também com a dose e duração da terapia (Brunton, *et al.*, 2006).

Durante o primeiro mês de tratamento é possível também o aparecimento de outros efeitos e sintomas como, erupção cutânea, febre, náuseas, estomatite ulcerativa e cefaleia. No caso da estomatite ulcerativa, esta no período de uma a duas semanas acaba por desaparecer, mesmo com a continuidade da administração de zalcitabina (Brunton, *et al.*, 2006).

v) Uso terapêutico

Indicado em adultos com contagens de CD4 inferiores a $300/\text{mm}^3$ para o tratamento, em associação com a zidovudina, de infecção avançada pelo VIH e como monoterapia para pacientes que sejam intolerantes à zidovudina (Brunton, *et al.*, 2006).

Nos casos de pacientes com SIDA e com menos de 3 meses de terapia prévia com zidovudina, a zalcitabina, com uma posologia de 0,75 mg a cada 8 horas, torna-se menos eficaz que a zidovudina para diminuir o número infeções oportunistas e prolongar a sobrevida (Fischl *et al.*, 1993).

Nos pacientes que apresentam contagens de CD4 inferiores ou iguais a $300/\text{mm}^3$ e em que já foi administrado zidovudina por um período de tempo igual ou inferior a 4 semanas, apresentam valores maiores e mais persistentes de CD4 quando utilizam uma terapia combinada de zalcitabina, com uma dosagem de 0,75mg a cada 8 horas, e de zidovudina, 200mg a cada 8 horas, do que aqueles que só utilizam zidovudina em monoterapia (Brunton, *et al.*, 2006).

3.2.5 Lamivudina

i) Principais características

A lamivudina (3TC) (2',3'-dideoxi-3'-tiacitidina) é um análogo da citosina. Tem a capacidade de inibir a transcriptase reversa do VIH e a ADN polimerase do HBV (inibe 50% da replicação do HBV *in vitro* em concentrações no intervalo de 4 a 7 ng/mL) (Laurence *et al.*, 2012).

ii) Mecanismo de ação e resistência

Enzimas celulares convertem a lamivudina em trifosfato de lamivudina, que se trata de um potente inibidor da ADN polimerase/transcriptase reversa do HBV. Como o tempo de semi-vida do trifosfato é de aproximadamente 17 a 19 horas, apenas é necessário uma administração diária deste fármaco (Laurence *et al.*, 2012).

A lamivudina quando combinada com penciclovir demonstra uma aumento da atividade antiviral contra hepadnavirus. Mutações na porção YMDD da ADN polimerase do HBV originam uma redução de 40 a 140 vezes na sensibilidade *in vitro* (Laurence *et al.*, 2012). Os vírus que mantêm mutações YMDD têm uma menor capacidade de replicação *in vitro* do que o HBV do tipo selvagem. Resistência a este fármaco está associada a uma fibrose progressiva, perda de tecido em recetores de transplante, exacerbações de hepatite e níveis elevados de ADN do HBV (Dienstag *et al.*, 2003).

iii) Absorção, distribuição e eliminação

Possui uma boa absorção e a maior parte do fármaco é eliminado na urina sem qualquer alteração (Rang *et al.*, 2008). Doses de 3mg/kg/dia, em crianças infetadas pelo HBV, conduzem a níveis plasmáticos mais baixos comparando aos adultos que

receberam uma dose de 100mg diários. Nos casos de insuficiência renal moderada é essencial uma redução das doses (Laurence *et al.*, 2012).

iv) Efeitos adversos

Nas doses atualmente utilizadas para o tratamento da infecção crônica por HBV, a lamivudina foi bem tolerada. Apenas se verifica um aumento dos níveis de aminotransferases após terapia com lamivudina (Laurence *et al.*, 2012).

v) Uso terapêutico

A lamivudina é usada no tratamento de hepatite crônica pelo HBV em adultos e crianças. No caso dos adultos, doses de 100mg/dia num período de um ano, levam à supressão dos níveis de ADN do HBV, com reduções na inflamação hepática em mais de 50% dos pacientes e normalização dos níveis de aminotransferases em mais de 41% dos pacientes (Dienstag *et al.*, 2003). Nas crianças com idades compreendidas entre os 2 e os 17 anos, a lamivudina, com uma dose de 3mg/kg/dia até um máximo de 100mg/dia num período máximo de um ano, verifica-se também uma normalização dos níveis de aminotransferases em 50% das crianças (Jonas *et al.*, 2002). Uma terapia prolongada tem a vantagem de diminuir para metade o risco do desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em pacientes com fibrose avançada ou cirrose. O desenvolvimento de resistência é mais provável após transplantes e em indivíduos co-infetados por VIH/HBV. A administração deste fármaco antes e após um transplante de fígado pode suprimir uma infecção recorrente por HBV (Laurence *et al.*, 2012).

3.2.6 Abacavir

i) Principais características

O abacavir (ABC) é um análogo da guanósina e é considerado um dos fármacos com maior eficácia dentro deste grupo de fármacos (Rang *et al.*, 2008).

ii) Mecanismo de ação e resistência

O abacavir é metabolizado a nível intracelular, por enzimas intracelulares, em 2'-desoxiguanósina, que inibe de forma competitiva a transcriptase reversa do VIH e interrompe a extensão da cadeia de ADN proviral (Hervey e Perry, 2000). Este metabolito é cerca de 90-2900 vezes mais selectivo para a transcriptase reversa do VIH, do que para as ADN polimerases α , β , γ , e ϵ . Este fármaco demonstra uma boa atividade inibitória contra ambas as estirpes, VIH-1 e VIH-2, e quando combinado com outros fármacos antirretrovirais, o abacavir tem atividade sinérgica contra o VIH-1 (Hervey e Perry, 2000).

Mutações na região codificante da TR do VIH-1, mais especificamente nas posições M184V, L74V, K65R e Y115F, levam ao aparecimento de resistências. A mutação na posição M184V que por si só conduz a um alto nível de resistência para a lamivudina, no caso do abacavir não se verifica qualquer alteração ou redução da sua sensibilidade (Hervey e Perry, 2000).

iii) Absorção, distribuição e eliminação

É bem absorvido por via oral e é metabolizado no fígado em compostos inativos. (Rang *et al.*, 2008).

Uma dose única de 300mg via oral é significado de uma biodisponibilidade absoluta de cerca de 83%. Após a administração de uma dose única de 300mg por via oral, em pacientes em jejum, a área sob a curva concentração-tempo é de 5,48 mg/L.h. A administração concomitante com alimentos não afeta de forma significativa a absorção. O tempo de semi-vida do abacavir é de aproximadamente 2 horas. Menos de 2% do fármaco é eliminado na urina sem que tenha sofrido qualquer tipo de alteração (Hervey e Perry, 2000). Como este fármaco não inibe as enzimas do citocromo P450, não há o risco de interações com outros fármacos que sejam metabolizados por esta via. As propriedades farmacocinéticas de outros fármacos como a zidovudina e/ou lamivudina não é afetada quando há a administração conjunta com o abacavir (Hervey e Perry, 2000).

iv) Efeitos adversos

Este tipo de terapia combinada (abacavir mais dois ITRAN) tem como principal efeito adverso, as náuseas que os pacientes ficam sujeitos. Estes efeitos são mais marcantes no início do tratamento, no entanto são efeitos ligeiros e transitórios (Hervey e Perry, 2000). Outros efeitos como vômitos, mal-estar generalizado, fadiga, diarreia, distúrbios do sono, tosse e erupção cutânea forma registados em 5% dos pacientes. Pode acontecer a necessidade de interrupção do tratamento, devido ao desenvolvimento de uma reação de hipersensibilidade (demonstrado em 3% dos pacientes), que inclui o envolvimento de vários sistemas de órgãos e que se caracteriza pelo aparecimento de febre e/ou erupção cutânea. Esta reação se acontecer, ocorre no período das primeiras 6 semanas de tratamento. Se houver interrupção do tratamento estes sintomas desaparecem, caso não haja essa interrupção ou que seja retomada novamente, os sintomas podem se tornar mais graves, conduzindo à hipotensão com elevado risco de vida, podendo levar à morte (Hervey e Perry, 2000).

v) Uso terapêutico

Em pacientes adultos infectados pelo VIH aconselha-se uma posologia de 300mg de abacavir duas vezes por dia em combinação com outros agentes antirretrovirais. No caso de lactentes, crianças e adolescentes com idade entre 3 meses a 16 anos, a administração de 8mg/kg duas vezes por dia é a recomendada, podendo ir até uma dose diária máxima de 600mg/dia (Hervey e Perry, 2000).

Ensaio clínico em que foi utilizado o abacavir em combinação com outros fármacos antirretrovirais, demonstraram uma redução mais acentuada dos níveis de ARN do VIH (Hervey e Perry, 2000). Além disso a combinação de abacavir com lamivudina e zidovudina, reduz a carga viral para valores que não são detectáveis, como também aumenta o número de células CD4. Resultados destes ensaios, mostram também, uma maior eficácia quando o tratamento engloba a conjugação de abacavir com dois ITRAN, do que um inibidor da protease com dois ITRAN (Hervey e Perry, 2000).

O abacavir utilizado num regime terapêutico de combinação com outros fármacos antirretrovirais reduz efetivamente a carga viral em adultos e crianças com infeção por VIH. Mais especificamente, o abacavir em combinação com lamivudina e zidovudina é geralmente bem tolerado, o seu regime de dosagem é simples e conveniente, tem a vantagem de “poupar” outras classes de fármacos antirretrovirais para posterior utilização e tem a capacidade de suprimir de forma sustentada a replicação viral (Hervey e Perry, 2000). Esta combinação tripla constitui uma alternativa aos pacientes intolerantes aos inibidores da protease ou então, àqueles que apenas pretendem utilizar os inibidores da protease posteriormente (Hervey e Perry, 2000).

3.2.7 Tenofovir disoproxil fumarato (Tenofovir DF)

i) Principais características

O tenofovir (TDF) é um derivado da adenosina 5'-monofosfato e é o único fármaco deste grupo atualmente comercializado para o tratamento da infecção por VIH. Este fármaco está disponível apenas como pró-fármaco - disoproxil fumarato, uma vez que o seu composto “mãe” possui uma fraca biodisponibilidade oral, enquanto que na forma de disoproxil fumarato, a sua biodisponibilidade oral melhora significativamente, assim como a sua capacidade de penetração celular. Tal como lamivudina e emtricitabina, o tenofovir é ativo contra o VIH-1, VIH-2, e VHB (Chapman *et al.*, 2003).

ii) Mecanismo de ação e resistência

O TDF é rapidamente hidrolisado em tenofovir e posteriormente é então fosforilado por quinases celulares no seu metabolito ativo – difosfato tenofovir. Este composto ativo, a nível intracelular, é um inibidor competitivo da transcriptase reversa virai e está incorporado no ADN do VIH de forma a provocar a interrupção da cadeia. Este difosfato de tenofovir possui um amplo espectro de atividade contra as ADN polimerases virais, no entanto possui baixa afinidade para as ADN polimerases humanas α , β e γ (Brunton, *et al.*, 2006).

Resistência específica ocorre com uma única substituição no codão 65 da transcriptase reversa (na posição K65R).

Esta mutação reduz três a quatro vezes a sensibilidade *in vitro* do tenofovir. A mutação K65R foi relatada em apenas 2% a 3% dos pacientes tratados com o tenofovir. Esta mutação normalmente não está associada a um fracasso do tratamento (Chapman *et al.*, 2003).

iii) Absorção, distribuição e eliminação

O TDF possui uma biodisponibilidade oral de cerca de 25%. Uma refeição rica em gorduras aumenta a biodisponibilidade oral para aproximadamente 39%, mas a administração pode ser feita independentemente da presença ou não de alimentos (Chapman *et al.*, 2003). O seu tempo de semi-vida situa-se no intervalo de 14 a 17 horas (Bang and Scott, 2003). A posologia é de apenas uma administração diária. Entre 70% e 80% de uma dose intravenosa de tenofovir é recuperado inalterado na urina. As doses devem ser reduzidas em pacientes com insuficiência renal (Chapman *et al.*, 2003).

iv) Efeitos adversos

O tenofovir, geralmente, é bem tolerado, e tem poucos efeitos adversos associados, sendo apenas problemas de flatulência o efeito adverso mais comum. O tenofovir é significativamente menos tóxico do que a estavudina e não é tóxico para as células tubulares renais humanas (Chapman *et al.*, 2003). No entanto, raros episódios de insuficiência renal aguda foram relatados com o uso de tenofovir, como tal este fármaco deve ser usado com precaução em doentes com doença renal pré-existente. Como o tenofovir também tem atividade contra o HBV e portanto tem a capacidade de diminuir as concentrações plasmáticas de ADN de HBV, recomenda-se precaução na utilização deste medicamento em pacientes co-infetados pelo HBV. A descontinuação do tratamento com o tenofovir pode conduzir a uma recuperação por parte do HBV, entrando novamente em replicação conduzindo à exacerbação da hepatite (Chapman *et al.*, 2003).

v) Uso terapêutico

Em ensaios clínicos realizados, verificou-se, com a administração de tenofovir, uma diminuição acentuada das concentrações de ARN do VIH no plasma cerca de 4,5 a 7,4 vezes em relação à administração do placebo, após um período de 48 semanas de tratamento (Chapman *et al.*, 2003). Diversos estudos têm confirmado a atividade antirretroviral do tenofovir em regimes de terapia combinada com outros agentes, incluindo outros ITRAN, inibidores de protease e/ou ITRNAN. Estes ensaios também confirmaram que a administração de lamivudina e efavirenz, juntamente com tenofovir 300 mg uma vez ao dia, foi tão eficaz e menos tóxica do que a administração de estavudina 40mg duas vezes ao dia (Gallant *et al.*, 2004).

3.3 Inibidores da transcriptase reversa não análogos nucleosídeos (ITRNAN)

Os ITRNAN ligam-se a um local hidrofóbico, próximo do local ativo da TR e na base do polegar p66 (Singh *et al.*, 2010).

Este local hidrofóbico é formado por resíduos L100, K101, K103, T107, V106, V108, V179, Y181, Y188, v189, G190, F227, W229, L234 e Y318 de p66 e E138 de p51 (Esnouf *et al.*, 1995; Kohlstaedt *et al.*, 1992).

Foi também demonstrado que este local na ausência de ITRNAN não existe. Como tal, ocorrem mudanças conformacionais em larga escala nas cadeias laterais de resíduos da TR, mais propriamente nos resíduos Y181 e Y188, de forma a ser criada essa ligação (Tantillo *et al.*, 1994).

A ligação leva a uma alteração na conformação da proteína, afetando assim a sua afinidade para com o substrato, resultando na inibição da atividade enzimática da TR. São classificados como inibidores não competitivos alostéricos da TR (Carlini *et al.*, 2010).

É possível observar na imagem seguinte uma espécie de bolsa formada pelos resíduos hidrofóbicos que estão representados a cor azul-turquesa, compostos por átomos de azoto e oxigênio, respectivamente representados pela cor azul escura e vermelha. A “palma” e o “polegar” do p66 estão representados a vermelho e a verde, respectivamente.

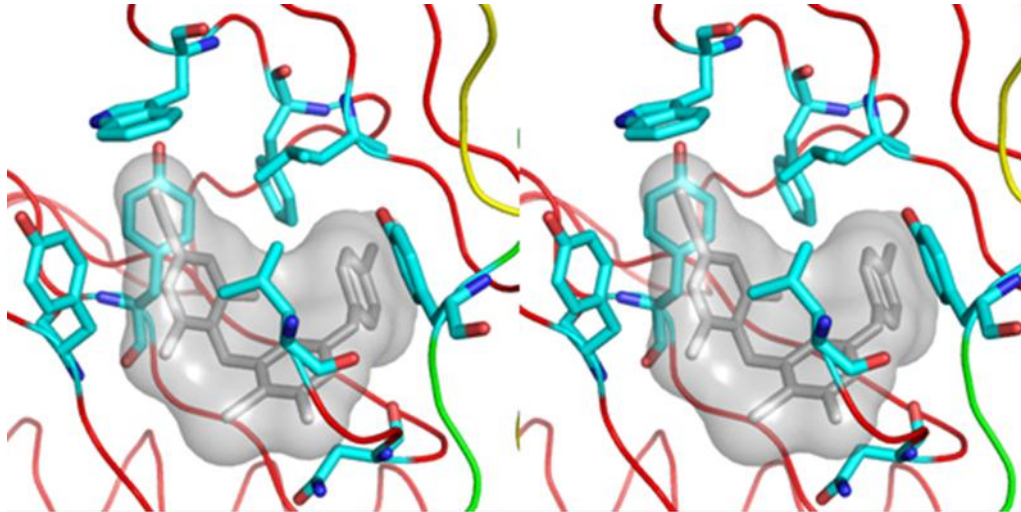


Figura 7 – Local de ligação dos ITRNAN (Retirado de Sleiman *et al.*, 2012)

Segundo Ding *et al.* (1995) e Ren *et al.* (1995) várias estruturas ITRNAN-TR têm semelhanças no que diz respeito ao modo de ligação dos fármacos, assim como à forma de borboleta que adquirem após a ligação.

Ou seja, vários estudos demonstraram que os ITRNAN alteram a conformação do “polegar”, do local ativo da polimerase e do local de ligação ao iniciador, o que sugere que se existem diferenças estruturais na ligação de vários ITRNAN, então é possível que diferentes ITRNAN tenham diferentes mecanismos de ação (Sleiman *et al.*, 2012).

A ligação que é feita pelos ITRNAN altera a conformação do “polegar” do subdomínio p66, muda a posição do iniciador e provoca o desalinhamento de alguns componentes importantes no local de ação da polimerase (Sleiman *et al.*, 2012).

3.3.1 Nevirapina

i) Principais Características

A nevirapina (NVP) é uma dipiridodiazepinona (11-ciclopropil-5,11-diidro-4-metil-6H-dipiridodiazepin-6-ona) com atividade potente contra o VIH-1. Como os outros fármacos pertencentes a esta classe, a nevirapina não possui uma atividade significativa contra o VIH-2 ou outro tipo de retrovírus (Harris e Montaner, 2000). Pode ser usada com o objetivo de evitar a transmissão mãe-bebe do VIH se a administração for feita a ambos (Rang *et al.*, 2008).

ii) Mecanismo de ação e resistência

A nevirapina é um inibidor não competitivo, que se liga a um local específico da transcriptase reversa do VIH-1, longe do local ativo, induzindo uma alteração conformacional que interrompe a atividade catalítica (Brunton *et al.*, 2006).

Uma vez que o local alvo deste fármaco se encontra no VIH, resistências ao fármaco podem desenvolver-se rapidamente. Uma única mutação no codão 103 ou 181 da transcriptase reversa diminui a susceptibilidade mais de cem vezes (Kuritzkes, 2004). Resistências a este fármaco também está associada a mutações nos codões 100, 106, 188, e 190, mas também mutações nas posições K103N ou Y181C são suficientes para acontecer uma falha do tratamento clínico (Eshleman *et al.*, 2004).

iii) Absorção, distribuição e eliminação

A nevirapina é bem absorvida e possui uma biodisponibilidade superior a 90%, e esta biodisponibilidade não é alterada nem por alimentos nem por antiácidos (Smith *et al.*, 2001). É eliminada principalmente através do metabolismo oxidativo e envolve tanto o CYP3A4, como o CYP2B6. Menos de 3% do fármaco é eliminado de forma

inalterada na urina (Smith *et al.*, 2001). Possui um tempo de semi-vida de cerca de 25 a 30 horas. É aconselhável inicialmente, uma posologia de 200mg diário durante 14 dias, que poderá ser aumentada para 200mg duas vezes por dia caso não se verifique o aparecimento de qualquer efeito adverso (Brunton *et al.*, 2006).

iv) Efeitos adversos

O principal efeito adverso, e que ocorre em aproximadamente 16% dos pacientes em que utilizaram nevirapina, é a erupção cutânea, que na maioria dos pacientes, com a continuidade do tratamento acabará por desaparecer. Ensaio clínico demonstraram também, que cerca de 7% dos pacientes que interromperam a terapia devido ao aparecimento das erupções cutâneas, e que utilizaram glucocorticoides este efeito adverso agravou-se (Harris e Montaner, 2000).

v) Uso terapêutico

A nevirapina é indicada em adultos e crianças para o tratamento da infecção pelo VIH-1 em combinação com outros fármacos antirretrovirais. Ensaio clínico onde se recorreu somente à monoterapia, verificou-se uma redução drástica, cerca de 99% das concentrações plasmáticas de ARN do VIH, no entanto após 8 semanas de tratamento houve um retorno para os valores normais, essencialmente devido ao rápido desenvolvimento de resistências (Havliř *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1995). Por outro lado, em 52% dos pacientes, uma terapia combinada de 3 fármacos, nevirapina, zidovudina e didanosina, conduziu a uma diminuição da concentração plasmática de ARN VIH para valores indetetáveis (Montaner *et al.*, 1998). Uma única dose de nevirapina é normalmente utilizada em grávidas infetadas pelo VIH de forma a prevenir a transmissão do vírus para o feto. Para tal, uma dose única de 200mg de nevirapina seguido por uma única dose dada ao recém-nascido reduz a infecção neonatal pelo VIH em 13% (Guay *et al.*, 1999).

3.3.2 Delavirdina

i) Principais características

Delavirdina (DLV) é um heteroarilpiperazina que inibe seletivamente o VIH-1, não tendo qualquer tipo de atividade significativa contra o VIH-2 ou outros retrovírus (Brunton, *et al.*, 2006).

ii) Mecanismo de ação e resistência

A DLV é um inibidor não competitivo e liga-se a um local na periferia da TR do VIH-1 e tem a capacidade de induzir uma alteração conformacional que interrompe a atividade catalítica. O complexo delavirdina-transcriptase reversa é estabilizado por pontes de hidrogénio ligadas à lisina no codão 103, e por fortes interações hidrofóbicas com a prolina na posição 236 (Spence *et al.*, 1995).

Uma única mutação no codão 103 181 da transcriptase reversa diminui a susceptibilidade em mais de cem vezes (Kuritzkes, 2004).

iii) Absorção, distribuição e eliminação

Possui uma boa absorção oral, especialmente a pH inferior a 2. Antiácidos, assim como inibidores da bomba de prótons, diminuem a absorção da delavirdina. A ingestão de alimentos não provoca qualquer tipo de interação com o fármaco (Smith *et al.*, 2001). Este fármaco não possui um tempo de semi-vida definido, visto que há uma proporcionalidade direta com o tempo de semi-vida e o aumento da dose de fármaco (Scott e Perry, 2000). É eliminada principalmente através do metabolismo oxidativo pelo CYP3A4., com menos de 5% do fármaco a aparecer de forma inalterada na urina. Apesar, e como já referido, os valores farmacocinéticos não serem constantes, o tempo de semi-vida mais comum é aproximadamente 5,8 horas, o que

significa que a posologia recomendada será de 400 mg três vezes por dia, com um intervalo de 2 a 11 horas entre as administrações devido à variabilidade das propriedades farmacocinéticas que varia de paciente para paciente (Smith *et al.*, 2001).

iv) Efeitos adversos

O principal efeito adverso e que ocorre em cerca de 18 a 36% dos pacientes são as erupções cutâneas, e que acaba por desaparecer com a continuidade do tratamento. Dermatites severas poderão aparecer, mas é trata-se de um evento bastante raro. Valores elevados das transaminases também podem surgir, no entanto não existe um risco do aparecimento de uma hepatite fulminante (Para *et al.*, 1999).

v) Uso terapêutico

Como acontece com a nevirapina, um regime de monoterapia com delavirdina, resulta apenas inicialmente numa redução dos níveis plasmáticos de ARN VIH, no entanto devido ao desenvolvimento de resistências, posteriormente, há uma rápida emergência destas partículas virais. Portanto será sempre um regime de terapia combinada, aquele que conduz a melhores resultados e a uma melhor eficácia terapêutica (Para *et al.*, 1999). Como a posologia obriga a uma toma de três vezes ao dia, este fármaco não é dos mais utilizados atualmente (Brunton, *et al.*, 2006).

3.3.3 Efavirenz

i) Principais características

O efavirenz (EFV) é um 1,4-dihidro-2H-3,1-benzoxazin-2-ona com atividade contra o VIH-1. Como acontece com os outros dois fármacos já referidos e que pertencem a esta mesma classe, não possui qualquer tipo de atividade inibitória contra o VIH-2 ou outros retrovírus (Young *et al.*, 1995).

ii) Mecanismo de ação e resistência

Como já foi referido anteriormente, e sendo uma característica comum aos fármacos pertencentes a esta classe, o EFV é um inibidor não competitivo e liga-se a um local na periferia da TR do VIH-1 e tem a capacidade de induzir uma alteração conformacional que interrompe a atividade catalítica (Brunton, *et al.*, 2006).

A resistência ao fármaco pode aparecer, devido à mutação no codão 103 da TR (local K103N), que leva a uma diminuição da susceptibilidade em mais de 100 vezes (Kuritzkes, 2004).

iii) Absorção, distribuição e eliminação

O EFV é bem absorvido e atinge o pico de concentração plasmática em 5 horas. A sua biodisponibilidade aumenta cerca de 22% com a ingestão de alimentos ricos em gordura (Smith *et al.*, 2001). O EFV é eliminado através de metabolismo oxidativo, principalmente pelo CYP2B6 e, em menor extensão pelo CYP3A4. A eliminação do fármaco por via renal não é significativa (Smith *et al.*, 2001). Possui um tempo de semi-vida entre 40 a 55 horas, o que permite apenas uma toma diária (Brunton, *et al.*, 2006).

iv) Efeitos adversos

Ensaio clínico realizados, demonstram que, 27% dos pacientes adultos desenvolveram no início do tratamento, erupções cutâneas (Adkins e Noble, 1998). O efeito adverso mais importante resultante da utilização do EFV envolvem o sistema nervoso central (SNC). Mais de 53% dos pacientes reportaram problemas ao nível do SNC ou problemas psiquiátricos, no entanto este tipo de sintomas só ocorre aquando da administração da primeira dose de fármaco. A resolução destes problemas associados ao SNC pode demorar horas ou semanas dependendo da gravidade dos mesmos. Os sintomas mais comuns caracterizam-se pela depressão, alucinação e/ou mania, e de forma geral acabam por desaparecer ao fim de 4 semanas de tratamento. Outros efeitos adversos, como aumento dos níveis de colesterol total, aumentos dos níveis das transaminases e enxaqueca, também podem surgir (Adkins e Noble, 1998). O EFV é o único fármaco pertencente a esta classe que é teratogénico em primatas (Brunton, *et al.*, 2006).

v) Uso terapêutico

O EFV foi o primeiro fármaco a ser aprovado pela FDA com apenas uma toma diária. Deve ser sempre utilizado em combinação com outros fármacos antirretrovirais e nunca em monoterapia, como acontece com os outros ITRNAN (Brunton, *et al.*, 2006).

Ensaio clínico demonstraram também que 70% dos pacientes, que utilizaram uma terapia combinada de EFV, AZT e 3TC, obtiveram níveis inferiores de concentrações plasmáticas de ARN VIH-1 do que aqueles que utilizaram um regime terapêutico constituído por indinavir, AZT e 3TC (Staszewski *et al.*, 1999). Em crianças infetadas pelo VIH-1 em que já utilizaram um ITRAN, 60% delas obtiveram uma melhoria significativa e melhores resultados após 48 semanas de tratamento com EFV, nelfinavir e um ITRAN. O EFV é um dos fármacos mais utilizados atualmente a nível mundial visto ser eficaz, possui uma grande tolerabilidade e por um período grande de tempo e por ser mais conveniente em termos de posologia (Brunton, *et al.*, 2006).

Capítulo IV – Desafios estabelecidos/Perspectivas futuras

Nos dias de hoje, pode-se ter a impressão que a pandemia do VIH está estabilizada e que se pode tornar facilmente controlável, mesmo em termos financeiros, cortando alguns custos inerentes. No entanto, este tipo de pensamento pode ser uma grande barreira para novos progressos que possam surgir, assim como, pode resultar na perda de alguns ganhos já conseguidos até hoje (Broder, 2009).

A constante evolução tecnológica e avanços científicos que têm sido feitos nesta área, leva a que terapias como a terapia antirretroviral de alta atividade (HAART) façam aumentar a expectativa de vida dos pacientes infetados com VIH. No entanto uma das grandes ameaças a todas as terapias antivirais que existem atualmente, será sempre o aparecimento de estirpes virais resistentes à ação dos fármacos atualmente utilizados (Sleiman *et al.*, 2012).

De forma a procurar sempre a melhor terapia, mais eficaz, mais potente, dezenas de estruturas da transcriptase reversa são armazenadas no Protein Data Bank (via eletrónica, em www.rcsb.org), permitindo assim, estudar mais em pormenor e ficar com o conhecimento de detalhes acerca dos mecanismos de replicação viral, e possibilitou também a realização de mais experiências bioquímicas, o que conduziu à descoberta de novas terapias, bem como à melhoria das existentes, com o objetivo de se tornarem terapias mais potentes contra estirpes de resistência (Sleiman *et al.*, 2012).

As tabelas seguintes exemplificam alguns assuntos inacabados, bem como alguns desafios e oportunidades.

Tabela VI – Desafios da terapia antirretroviral (Adaptado de Broder, 2009)

Desafios estabelecidos	
<u>Integração do provírus e latência viral imprevisível</u>	A carga viral pode surgir novamente a qualquer momento, portanto o tratamento deve ser para toda a vida
<u>Resistência aos fármacos, aumento da diversidade genética do VIH-1, assim como surgimento de novas infecções causadas por novos retrovírus</u>	A resistência à maioria dos fármacos atualmente disponíveis é um facto. O alvo mais comum destes fármacos são codificados pelo gene viral <i>pol</i> , como tal é necessário novos alvos. Existe também uma necessidade imediata de novos agentes terapêuticos de elevada barreira genética de forma a serem uma solução para estirpes resistentes de VIH-1. Existem reservatórios de retrovírus em primatas, o que por si só constitui uma oportunidade para o cruzamento de espécies e surgimento de novos retrovírus.
<u>Complicações cardíacas e metabólicas</u>	A terapia antirretroviral pode representar um fator de risco para o desenvolvimento de problemas cardíacos. É indispensável, portanto, um esquema de terapia ajustado e bem definido de forma a reduzir possíveis riscos cardiometabólicos. A determinação do gene responsável por este tipo de efeitos adversos, aliado a medidas preventivas poderá resultar em melhores resultados clínicos (Iakoubova <i>et al.</i> , 2008).
<u>Falta de uma vacina eficaz e de algum tipo de produto de aplicação tópica contra a transmissão do VIH-1</u>	Ensaio clínicos recentes utilizando vacinas como prevenção primária revelaram fracasso. Em termos de saúde pública existe uma necessidade significativa, principalmente para proteger as mulheres contra infecção por VIH-1, para um tipo de microbicida VIH.
<u>Prolifaxia pré-exposição (PrEP)</u>	Fármacos como o Tenofovir disoproxil fumarato podem ser utilizados com o objetivo de proteger indivíduos não infetados em ambientes de alto risco. Ensaio clínicos sobre PrEP estão a ser feitos. No entanto não há qualquer tipo de garantia acerca da eficácia e segurança destes PrEP bem como os resultados a longo prazo.
<u>Novos investimentos no VIH-1/SIDA devido ao facto dos sistemas de saúde já estarem cronicamente sobrecarregados</u>	A pandemia da SIDA expôs e realçou as deficiências dos sistemas de prestação de cuidados de saúde nos países pobres e sem recursos. Existe atualmente, um grande esforço, para fortalecer os sistemas de saúde dos países em desenvolvimento. É importante que assim seja, de modo que o VIH-1/SIDA não seja prejudicial para a saúde pública e represente uma ameaça à estabilidade e segurança global.

Tabela VII – Novos paradigmas no tratamento VIH-1/SIDA (Adaptado de Broder, 2009)

Novos paradigmas no tratamento VIH-1/SIDA		
<u>Tecnologia</u>	<u>Objetivo</u>	<u>Comentários</u>
Inibidores do proteossoma, adaptando produtos que já estejam a ser utilizados na terapia oncológica (Sheehy, 2008; Malim and Emerman, 2008)	As proteínas virais acessórias, <i>Vif</i> , <i>Vpu</i> e <i>Vpr</i> , estão “definidas” a estabelecerem uma ligação com ligases de ubiquitina de forma a ocorrer a degradação proteossomal de fatores de restrição do hospedeiro.	Adaptação de inibidores do proteossoma, que já tenham sido aprovados pela FDA ou que estejam em desenvolvimento clínico para o cancro, como terapia antirretroviral somente com adaptações na dose. A <i>Vif</i> pode ter a capacidade de proteger APOBEC3G ou APOBEC3F. Outra proteína viral, como a <i>Vpu</i> , pode proteger as células CD4. É preciso ter especial atenção aos efeitos secundários e utilizar sempre doses reduzidas.
Antagonistas específicos da <i>Vif</i> (Nathans <i>et al.</i> , 2008)	Inibir a <i>Vif</i> e ao mesmo tempo ativar a APOBEC3G, atuando, ao nível do hospedeiro, como um fator de restrição viral.	Descoberta de um composto com atividade antagónica contra <i>Vif</i> . O que pode permitir restaurar a atividade antiviral de cadeias de ADN que anteriormente tenham sofrido de morte viral, como por exemplo através de hipermutações.
ARN de interferência (siARN) (Morris, 2008; Verdel <i>et al.</i> , 2009; Suzuki <i>et al.</i> , 2005; Weinberg <i>et al.</i> , 2006; Lim <i>et al.</i> , 2008; Han <i>et al.</i> , 2007; Suzuki <i>et al.</i> , 2008; Kumar <i>et al.</i> , 2008; Hawkins <i>et al.</i> , 2009; Yamagishi <i>et al.</i> , 2009)	Inibir a replicação viral através do silenciamento de genes (tanto silenciamento génico transcricional – TGS como silenciamento génico pós-transcricional).	Vias dependentes de siARN podem levar a: silenciamento génico pós-transcricional, porque o siARN tem a capacidade de clivar no citoplasma o ARN mensageiro; e silenciamento transcricional.

4.1 Desafios estabelecidos

Podem-se destacar alguns pontos importantes, como o desafio que é apresentado na tabela 3, que fala na verdadeira erradicação do VIH-1, cujo atualmente, com as tecnologias disponíveis, ainda não foi possível. Outro ponto importante trata-se da latência viral, isto é, os provírus podem existir nas células T de memória, persistindo por longos períodos de tempo constituindo assim um reservatório retroviral muito difícil de controlar (Marcelo, 2006). Esta situação ainda é mais grave quando estes reservatórios de vírus se encontram dentro de células dendríticas e macrófagos, sendo que nestes últimos, pode constituir um refúgio viral ao nível do cérebro (Broder, 2009).

Se há descontinuação da terapia, então existe uma recuperação viral, o que significa que este tipo de terapia deve ser realizada durante toda a vida (Broder, 2009).

Há cerca de 25 anos atrás, quando começaram-se a utilizar as primeiras terapias antirretrovirais onde se obteve sucesso, o VIH-1/SIDA era sinónimo de uma imunodeficiência fulminante, em que o indivíduo ficava predisposto a diversas infeções, associado ao aparecimento do sarcoma de Kaposi bastante agressivo ou outras neoplasias com ritmo elevado e letal (Broder, 2009).

Hoje em dia, os fatos são diferentes, existe um cuidado adicional tanto com a sobrevivência prolongada, como com a identificação e gestão cuidadosa dos efeitos a longo prazo derivados da terapia. A terapia antirretroviral crónica pode conduzir a problemas cardíacos e metabólicos, como resistência à insulina, dislipidemias, lipodistrofia (distribuição anormal da gordura corporal), o aumento do risco do desenvolvimento de doenças cardíacas e o aparecimento de diabetes tipo 2 (Sabin *et al.*, 2008; Silverberg *et al.*, 2009; Filardi *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2009). Segundo Friis-Møller *et al.* (2007), está associado um maior risco de aparecimento de aterosclerose, nos pacientes que foram alvo de terapia antirretroviral, mais especificamente, utilizando a classe de fármacos pertencentes aos inibidores da protease.

Outro grande desafio é o de ajustar o tipo de terapia a utilizar com o perfil de risco cardíaco do paciente, alterando assim o risco associado de desenvolver problemas cardíacos. No entanto e segundo Hsue *et al.* (2004), a infeção por VIH-1 já constitui por si só um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardíacas. Por outro lado,

não é possível prever com precisão adequada, a carga de efeitos adversos, quer metabólicos como cardíacos, nos sistemas de saúde dos países mais pobres e sem recursos. Um estudo realizado recentemente, que contou com aproximadamente 5000 pessoas infectadas pelo VIH-1, demonstrou, através da realização de eletrocardiogramas, uma surpreendente evidência de doença isquêmica do coração (Carr *et al.*, 2008).

Todo este tipo de efeitos adversos e o que eles provocam, que provêm deste tipo de terapia, são um entrave quando se pensa em administrar este tipo de fármacos antirretrovirais em indivíduos, que ainda não estando infectados, constituem um risco no controle da transmissão do VIH-1, ou seja, impedem assim qualquer tipo de medidas preventiva (Broder, 2009).

Em qualquer situação o mais importante é a procura por terapias mais eficazes e seguras, e sempre que for possível ter especial atenção às realidades deste tipo de terapia nos países pobres e com recursos escassos (Broder, 2009).

Um desafio igualmente importante prende-se com pacientes pediátricos infectados pelo VIH-1, em particular crianças com idade inferior a 5, 6 anos. Não existe uma grande quantidade de formulações pediátricas, combinações de dose fixa, bem como um maior número de opções de terapia contra estirpes resistentes. Isto acontece, porque para além de poucos fármacos serem aprovados em utilização pediátrica, não existem certezas de qual é o melhor momento quer para iniciar o tratamento, como orientações em termos de dosagem (Giaquinto, 2010).

Deve-se portanto, maximizar ao máximo a utilidade e a eficácia de todas as classes de fármacos conhecidas quer para adultos, quer para crianças, como também, ter a possibilidade de utilizar novos fármacos para complementar a terapia existente ou até mesmo substituir os atuais, sempre com o objetivo de melhorar as estratégias atuais de tratamento (Broder, 2009).

Nestes últimos anos apesar do esforço que tem sido feito no que diz respeito a prevenção de mortes prematuras através de avanços na terapia antiretroviral, o número anual de novas infeções pelo VIH-1 nos EUA é cerca de 50000. Um estudo de 2007 revela ainda que no mundo inteiro havia aproximadamente 2,7 milhões de novas infeções causados por VIH-1 (Broder, 2009).

Em termos epidemiológicos, mais propriamente em África, a SIDA pode ser vista como uma zoonose, devido ao constante contato dos seus habitantes com os macacos (Hahn *et al.*, 2000). É muito comum nas comunidades onde os seus membros utilizam a carne de macaco como fonte de proteína, o que pode levar a que os retrovírus infetem a comunidade (Peeters *et al.*, 2002; Wolfe *et al.*, 2004). Em particular, aplica-se no caso dos chimpanzés (*Pan troglodytes troglodytes*), na África Ocidental e Central (infecção por VIH-1) e em macacos (*Cerocebus atys*) na África Ocidental (infecção por VIH-2) (Wain *et al.*, 2007; Van Heuverswyn e Peeters, 2007).

A forte industrialização que a África sub-sariana sofreu, agrava em larga medida este problema das zoonoses, uma vez que a exploração comercial e o melhoramento das suas redes de estradas, conduz a uma maior procura pela carne de caça, em locais que anteriormente eram de difícil acesso, locais estes onde é possível que estejam novos reservatórios humanos de retrovírus. Portanto é de extrema importância considerar que o desenvolvimento de novos fármacos antirretrovirais eficazes nunca será um “negócio acabado” (Broder, 2009).

4.2 Oportunidades

De fato, como já foi referido, os principais e clássicos fármacos utilizados para este tipo de terapia são principalmente aqueles que atuam na enzima transcriptase reversa, na protease e na integrase, o que trouxe diversas moléculas ativas bastante eficazes na terapia antirretroviral (Richman *et al.*, 2009). No entanto, é igualmente importante, a presença constante de novos conhecimentos sobre toda a biologia da replicação viral, sempre o mais rápido possível, para se obterem novas terapias em alternativa aos fármacos clássicos já referidos (Buckheit *et al.*, 2010).

Por exemplo, a descoberta e conclusão do projeto genoma humano abriu inúmeras portas para a descoberta de novos genes e proteínas alvo em doenças microbianas em geral e especificamente no caso do VIH-1/SIDA (Broder, 2004; Hutcheson *et al.*, 2008). Outro exemplo importante é o da latência viral do VIH-1 onde já estão a ser feitos vários estudos (Lehrman *et al.*, 2005).

Como a tabela VI refere, estratégias terapêuticas como a adoção de inibidores do proteossoma, terapêutica baseada em ARN, incluindo moléculas como microARN e ARN interferentes (siARN), estes últimos direcionados a silenciar genes específicos e essenciais à transcrição, tendo igualmente a capacidade de impedir a replicação do provirus (Morris, 2008; Verdel *et al.*, 2009). De facto esta última estratégia tem sido amplamente estudada, visto que estas moléculas, siARN, também parecem ser eficazes tanto no combate ao cancro, como de muitas outras doenças graves (Swanton *et al.*, 2004; Napoli *et al.*, 2009). Um dia pode vir a ser possível, através da utilização destas moléculas, induzir modificações epigenéticas permanentes, e assim, ter a capacidade de um controlo altamente específico do genoma humano (Morris *et al.*, 2008).

É muito provável que no futuro surjam mais soluções para a terapia antirretroviral, associada a um enorme progresso na área, cujas ramificações não serão somente confinadas aos retrovírus (Broder, 2009).

4.3 Conclusão final

O progresso que tem vindo a ser feito tem sido considerável e ao mesmo tempo surpreendente diminuindo o número de mortes prematuras causadas por VIH-1/SIDA. Há cerca de 25 anos atrás pensava-se que este retrovírus humano era intratável, hoje em dia nem de perto se coloca essa hipótese (Broder, 2009).

É importante perceber também que os medicamentos antirretrovirais disponíveis atualmente não estão, nem devem estar limitados apenas a países ricos em recursos, porque deverá haver uma vontade política de forma a agir em conjunto para ajudar os países mais necessitados (Broder, 2009).

Inegavelmente, o combate aos retrovírus nunca estará acabado, principalmente em áreas como a resistência viral aos fármacos, a diversidade genética e os efeitos adversos que provêm de uma terapia a longo prazo (Broder, 2009).

Para concluir, de realçar que existem inúmeras novas ideias científicas que podem levar a terapia antirretroviral para um degrau acima do atual, para um nível totalmente novo. Para isso têm sido feitas diversas pesquisas em laboratório, assim como, vários ensaios clínicos, de forma a melhorar a qualidade de vida daqueles que se encontram ainda, nos dias de hoje, em perigo (Broder, 2009).

Bibliografia

Adkins, J.C., Nobel, S. (1998) Efavirenz. *Drugs*, 56, 1055-1064.

Aiken, C., Trono, D. (1995) Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis. *Journal of Virology*, 69, 5048–5056.

Arhel, N.J., *et al.* (2007). HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *EMBO Journal*, 26, 3025–3037.

Arts, E.J. e Hazuda, D.J. (2012) HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2, 7-161.

Bang, L.M, Scott, L.J. (2003) Emtricitabine: Na antirretroviral agente for HIV infection. *Drugs*, 63, 2413-2424.

Bangham, C.R.M, Osame, M. (2005) Cellular immune response to HTLV-1. *Oncogene*, 24, 6035-6046.

Barcellos, N.T., *et al.* (2006) Human T lymphotropic vírus type I/II infection Prevalence and risk factors in individuals testing for in counseling centers from southern Brazil. *Sexually transmitted Dis*, 33, 302-306.

Bittencourt, A.L. (1998) Vertical transmission of HTLV-I/IIA review. *Rev Inst Med Trop*, 40, 245-251.

Bittencourt, A.L., *et al.* (2006) Manifestações infanto-juvenis da infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV-1). *J Pediatr*, 86, 411-420.

Bowerman, B., *et al.* (1989) A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA. *Genes and Development*, 3, 469–478.

Broder, S. M. D. (2009) The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. *Antiviral Res*, 85, 1.

Brunton, L.L., *et al.* (2006) *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basics of THERAPEUTICS*. United States of America. The McGraw-Hill Companies.

Burchill, S. A., *et al.* (1994) Neuroblastoma cell detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for tyrosine hydroxylase mRNA. *Int J Cancer*, 57, 671-5.

Caporale, L.H. (2006) *The Implicit Genome*. Oxford University Press.

Carlini, F., *et al.* (2010) The reverse transcription inhibitor abacavir shows anticancer activity in prostate cancer cell lines. *PLoS ONE*, 5, 14221.

Chapman, T., *et al.* (2003) Tenofovir disoproxil fumarate. *Drugs*, 63, 1597-1608.

Champoux, J.J. (1993). Roles of ribonuclease H in reverse transcription. *In*: Skalka, A.M., Goff, S.P. (Eds.). *Reverse Transcriptase*. New York, Cold Spring Harbor Press, Plainview, pp. 103-118.

Cherepanov, P., *et al.* (2011) Structural insights into the retroviral DNA integration apparatus. *Current Opinion in Structural Biology*, 21, 249–256.

Coffin, J.M. (1979) Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses. *J Gen Virol*, 42, 1-26.

Coffin, J.M. (1996) The Víruses and their Replication. *In*: Chanock R.M., Melnick J.L., Monath T.P. (Eds). *Fields Virology*, 3rd Ed, Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, pp. 1767-1847.

Coffin, J.M., *et al.* (1997) *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.

Dalgleish, A.G., *et al.* (1984) The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, 312, 763-7.

De Clercq, E. (2004) Antiviral drugs in current clinical use. *J Clin Virol*, 30, 115-133.

Dienstag, J.L., *et al.* (2003) Histological outcome during long-term lamivudine therapy. *Gastroenterology*, 124, 105-117.

Ding, J., *et al.* (1995) Structure of HIV-1 reverse transcriptase in a complex with the non- nucleoside inhibitor alpha-APA R 95845 at 2.8 Å resolution. *Structure*, 3, 365–379.

Edward, K., *et al.* (2009) *Basic Virology*. John Wiley & Sons.

Eshleman, S.H., *et al.* (2004) Comparison of nevirapine (NVP) resistance in Ugandan women 7 days vs. 6-8 weeks after single-dose NVP prophylaxis: HIVNET 012. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 20, 595-599.

Esnouf, R., *et al.* (1995) Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. *Nat Struct Biol*, 2, 303–308.

Fassati, A., Goff, S.P. (2001) Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*, 75, 3626–3635

Feng, J.Y., Anderson, K.S. (1999) Mechanistic studies comparing the incorporation of (+) and (-) isomers of 3TCTP by HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry*, 38, 55–63.

Flint, S. J., *et al.* (2009). *Principles of Virology*, Washington, DC, ASM Press.

Frankel, A.D., Young, J.A. (1998) HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 1–25.

Gallant, J.E., *et al.* (2004) Efficacy and safety of tenofovir DF vs stavudine in combination therapy in antiretroviral-naïve patients: A 3-year randomized trial. *JAMA*, 292, 191-201.

Gallois-Montbrun, S., *et al.* (2002) Improving nucleoside diphosphate kinase for antiviral nucleotide analogs activation. *J Biol Chem*, 277, 39953–39959

Gilboa, E., *et al.* (1979) A detailed model of reverse transcription and tests of crucial aspects. *Cell*, 18, 93-100.

Goncalves, J., *et al.* (1996) Role of Vif in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. *Journal of Virology*, 70, 8701–8709.

Goodier, J.L., Kazazian, H.H. (2008) Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites. *Cell*, 135, 23–35.

Guay, L.A., *et al.* (1999) Intrapartum and neonatal single-dose nevirapine compared with zidovudine for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 in Kampala, Uganda: HIV-NET 012 randomised trial. *Lancet*, 354, 795-802.

Harrich, D., *et al.* (1997) Tat is required for efficient HIV-1 reverse transcription. *EMBO Journal*, 16, 1224–1235.

Harris, M., Montaner, J.S. (2000) Clinical uses of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Rev Med Virol*, 10, 217-229.

Havlir, D., *et al.* (1995) A pilot study to evaluate the development of resistance to nevirapine in asymptomatic human immunodeficiency virus-infected patients with CD4 cell counts of $>500/\text{mm}^3$: AIDS Clinical Trials Group Protocol 208. *J Infect Dis*, 172, 1379-1383.

Herschhorn, A., Hizi, A. (2010) Retroviral reverse transcriptases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67 , 2717–2747.

Hervey, P.S., Perry, C.M. (2000) Abacavir: A review of its clinical potential in patients with HIV infection. *Drugs*, 2, 447-479.

Holmes, R.K., *et al.* (2007) APOBEC3F can inhibit the accumulation of HIV-1 reverse transcription products in the absence of hyper-mutation. Comparisons with APOBEC3G. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 2587–2595.

Hostomsky, Z., *et al.* (1992) Reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1: functionality of subunits of the heterodimer in DNA synthesis. *Journal of Virology*, 66, 3179–3182.

Jonas, M., *et al.* (2002) Clinical trial of lamivudine in children with chronic hepatitis B. *N Engl J Med*, 346, 1706-1713.

Jurka, J., *et al.* (2007) Repetitive sequences in complex genomes: structure and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 8,241–259.

Kazazian, H.H. (2004) Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science*, 303, 1626–1632.

Kerr, S.G., Anderson, K.S. (1997) Pre-steady-state kinetic characterization of wild type and 3'-azido-3'- deoxythymidine (AZT) resistant human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: implication of RNA directed DNA polymerization in the mechanism of AZT resistance. *Biochemistry*, 36, 14064–14070.

Kiernan, R.E., *et al.* (1998) Role of matrix in an early pos-tentry step in the human immunodeficiency virus type 1 life cycle. *Journal of Virology*, 72, 4116–4126.

Kim, S.Y., *et al.* (1989) Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J Virol*, 63, 3708-13.

Kohlstaedt, L.A., Steitz, T.A. (1992) Reverse transcriptase of human immunodeficiency virus can use either human tRNA(3Lys) or Escherichia coli tRNA(2Gln) as a primer in an in vitro primer-utilization assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 9652–9656.

Kuritzkes, D.R. (2004) Preventing and managing antiretroviral drug resistance. *AIDS Patient Care STDs*, 18, 259-273.

Lander, E.S., *et al.* (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 860–921

Laurence, L.B., *et al.* (2012) *As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman*. New York, The McGraw-Hill Companies.

Li, X., *et al.* (1994) Effects of alterations of primer-binding site sequences on human immunodeficiency virus type 1 replication. *Journal of Virology*, 68, 6198–6206.

Lifson, J.D., *et al.* (1986) Induction of CD4-dependent cell fusion by HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. *Nature*, 323, 725-8.

Luciw, P.A. (1996) Human immunodeficiency viroses and their replication. *In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.). Fields Virology*. Philadelphia, Lippincott-Raven, pp. 1881-1952.

Mak, J., *et al.* (1994) Role of Pr160gag-pol in mediating the selective incorporation of tRNA(Lys) into human immunodeficiency virus type 1 particles. *Journal of Virology*, 68, 2065–2072.

Mak, J., Kleiman, L., (1997) Primer tRNAs for reverse transcription. *Journal of Virology*, 71, 8087–8095.

Meliço-Silvestre, A., Saraiva da Cunha, J.G. (2003) *Doenças infecciosas: O desafio da clinica*. Coimbra. Edições MinervaCoimbra.

Miller, R.J., *et al.* (2000) Human immunodeficiency virus and AIDS: insights from animal lentiviruses. *J Virol*, 74, 7187-7195.

Mitsuya, H., *et al.* (1985) 3' –Azido-3' –deoxythymidine (BW A509U): Na antiviral agente that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci*, 82, 96-100.

Montagnier, L. (1994) *Vírus e Homens. O Combate contra a SIDA*. Éditions Odile Jacob.

Montaner, J.S., *et al.* (1998) A randomized, double-blind trial comparing combinations of nevirapine, didanosine, and zidovudine for HIV-infected patients: The INCAS Trial. *JAMA*, 279, 930-937.

Mougel, M., *et al.* (2009) When is it time for reverse transcription to start and go? *Retrovirology*, 6, 24.

Murray, P.R., *et al.* (2010) *Microbiologia Médica*. Elsevier Editora Ltda.

Nowacki, M., *et al.* (2009) A functional role for transposases in a large eukaryotic genome. *Science*, 324, 935–938.

Orgel, L.E., Crick, F.H. (1980) Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature*, 28, 604–607.

Para, M.F., *et al.* (1999) ACTG 260: A randomized, phase I-II, dose-ranging trial of the anti-human immunodeficiency virus activity of delavirdine monotherapy. The AIDS Clinical Trials Group Protocol 260 Team. *Antimicrob Agents Chemother*, 43, 1373-1378.

Parniak, M.A., Sluis-Cremer, N. (2000) Inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Adv Pharmacol*, 49, 67-109.

Perno, C.F., *et al.* (1988) Inhibition of human immunodeficiency virus (HIV - 1/HTLV-III_{Ba}-L) replication in fresh and cultured human peripheral blood monocytes/macrophages by azidothymidine and related 2',3'-dideoxynucleosides. *J Exp Med*, 168, 1111–1125.

Peterlin, B.M., *et al.* (1986) Elevated levels of mRNA can account for the trans-activation of human immunodeficiency virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 9734–9738.

Prusiner, S.B. (2002) Historical essay. Discovering the cause of AIDS. *Science*, 298, (5599):1726.

Rang, H.P., *et al.* (2008) *Farmacologia*. Rio de Janeiro, Elsevier.

Ren, J., *et al.* (1995) High resolution structures of HIV-1 RT from four RT-inhibitor complexes. *Nat Struct Biol*, 2, 293–302.

Rhim, H., *et al.* (1991) Deletions in the tRNA(Lys) primer-binding site of human immunodeficiency virus type 1 identify essential regions for reverse transcription. *Journal of Virology*, 65, 4555–4564.

Schneider, B *et al.* (2000). Role of nucleoside diphosphate kinase in the activation of anti-HIV nucleoside analogs. *J Bioenerg Biomembr*, 36, 317–324.

Schwartz, O., *et al.* (1995) Human immunodeficiency virus type 1 Nef increases the efficiency of reverse transcription in the infected cell. *Journal of Virology*, 69, 4053–4059.

Shuh, M., Beilke, M. (2005) The human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1): new insights into clinical aspects and molecular pathogenesis of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) and tropical spastic paraparesis/HTLV-associated myelopathy (TSP/HAM). *Microsc Res Tech*, 68, 176-96.

Silva, F.H., *et al.* (2006) Beyond retrovírus infection: HIV meets gene therapy. *Genet Mol Biol*, 629, 67-379.

Singh, K., *et al.* (2010) Structural Aspects of Drug Resistance and Inhibition of HIV-1 Reverse Transcriptase. *Viruses*, 2, 606-638.

Sleiman, D., *et al.* (2012) Initiation of HIV-1 reverse transcription and functional role of nucleocapsid-mediated tRNA/viral of genome interactions. *Virus Res.*

Slotkin, R.K., Martienssen, R. (2007) Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet*, 8, 272–285.

Smith, B., *et al.* (1991) Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet*, 338, 1227-9.

Smith, P.F., *et al.* (2001) Clinical pharmacokinetics of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Clin Pharmacokinet*, 40, 893-905.

Sova, P., Volsky, D.J. (1993) Efficiency of viral DNA synthesis during infection of permissive and nonpermissive cells with vif-negative human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*, 67, 6322–6326.

Spence, R.A., *et al.* (1995) Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. *Science*, 267, 988-993.

Stark, L.A., Hay, R.T. (1998) Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viral protein R (Vpr) interacts with Lys-tRNA synthetase: implications for priming of HIV-1 reverse transcription. *Journal of Virology*, 72, 3037–3044.

Staszewski, S., *et al.* (1999) Efavirenz plus zidovudine and lamivudine, efavirenz plus indinavir, and indinavir plus zidovudine and lamivudine in the treatment of HIV-1 infection in adults. *New Engl J Med*, 341, 1865-1873.

Taft, R.J., *et al.* (2007) The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *Bioessays*, 29, 288–299.

Takahashi, H., *et al.* (1995) Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: enhancement of activity by interaction with cellular topoisomerase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 5694–5698.

Tantillo, C., *et al.* (1994) Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance. *J Mol Biol*, 243, 369–387.

Telesnitsky, A., Goff, S.P. (1993). Strong-stop strand transfer during reverse transcription. *In*: Skalka, A.M., Goff, S.P. (Eds.). *Reverse Transcriptase*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, pp. 49-83.

Thali, M., *et al.* (1994) Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature*, 372, 363–365.

Tsurutani, N., *et al.* (2000) Identification of critical amino acid residues in human immunodeficiency virus type 1 IN required for efficient proviral DNA formation at steps prior to integration in dividing and nondividing cells. *Journal of Virology*, 74, 4795–4806.

U.S. Department of Health & Human Services. Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection. [Em linha] Disponível em <<http://www.fda.gov/ForConsumers/ByAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSA ctivities/ucm118915.htm>> [Consultado em 12-03-2013].

U.S. Department of Health & Human Services. Timeline / History. [Em linha] Disponível em <<http://www.fda.gov/ForConsumers/ByAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSA ctivities/ucm117935.htm>> [Consultado em 12-03-2013].

Veronesi, R., *et al.* (2000) *Retroviroses Humanas – HIV/AIDS*. Atheneu, São Paulo.

Vinces, M.D., *et al.* (2009) Unstable tandem repeats in promoters confer transcriptional evolvability. *Science*, 324, 1213–1216.

Yedavalli, V.S., Jeang, K.T. (2010) Trimethylguanosine capping selectively promotes expression of Rev-dependent HIV-1 RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 14787–14792.

Young, F.E. (1988) The role of the FDA in the effort against AIDS. *Public Health Rep*, 103, 242-245.

Young, S.D., *et al.* (1995) A novel, highly potent nonnucleoside inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother*, 39, 2602.-2605.

Wei, X., *et al.* (1995) Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*, 373, 117-122.

Wu, X., *et al.* (1999) Human immunodeficiency virus type 1 integrase protein promotes reverse transcription through specific interactions with the nucleoprotein reverse transcription complex. *Journal of Virology*, 73, 2126–2135.

Zhu, K., *et al.* (2004) Requirement for integrase during reverse transcription of human immunodeficiency virus type 1 and the effect of cysteine mutations of integrase on its interactions with reverse transcriptase. *Journal of Virology*, 78, 5045–5055.