



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

WESLEI ANDRADE BOMFIM

**ANÁLISE DE ISOLADOS CLÍNICOS DE HERPES SIMPLEX
ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA AOS ANTIVIRAIS**

Londrina
2017

WESLEI ANDRADE BOMFIM

**ANÁLISE DE ISOLADOS CLÍNICOS DE HERPES SIMPLEX
ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA AOS ANTIVIRAIS**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Carlos Nozawa

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Bomfim, Wesley Andrade.

Análise de isolados clínicos de herpes simplex associados à resistência aos antivirais / Wesley Andrade Bomfim. - Londrina, 2017.
50 f. : il.

Orientador: Carlos Nozawa.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, , 2017.
Inclui bibliografia.

1. Herpes simplex - Tese. 2. Isolados clínicos - Tese. 3. Resistência - Tese. 4. Antivirais - Tese. I. Nozawa, Carlos . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. . III. Título.

WESLEI ANDRADE BOMFIM

ANÁLISE DE ISOLADOS CLÍNICOS DE HERPES SIMPLEX ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA AOS ANTIVIRAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

orientador: Prof. Dr. Carlos Nozawa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a Dra. Fernanda Simões de Almeida
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a Dra. Lígia Carla Faccin Galhardi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 04 de julho de 2017.

Dedico este trabalho a Deus e a todos que sempre me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Carlos Nozawa que me acolheu por esta longa jornada no estudo dos vírus, que sempre me incentivou e estimulou a ser mais crítico em todos experimentos e resultados, e também pela paciência nas horas mais difíceis.

Às professoras Rosa Elisa Carvalho Linhares e Ligia Carla Faccin Galhardi por me acompanharem e darem suporte nas análises dos dados, correções e nos experimentos.

À Prof^a Fernanda Simões Almeida por aceitar fazer parte de minha banca e sempre que possível me ajudar nas dúvidas com relação à genética molecular.

A todos os membros do laboratório de Virologia.

A todos meus colegas de graduação que me ajudaram com palavras de conforto quando os experimentos não davam certo.

A todos meus familiares que sempre torceram por mim nesta longa caminhada.

A minha noiva Débora por sempre estar ao meu lado e sempre me apoiar em minhas escolhas.

À Universidade Estadual de Londrina e o Programa de Pós-graduação em Microbiologia por contribuírem com a minha formação acadêmica e conhecimento.

À Capes pela concessão da bolsa de estudo e auxílio financeiro na consecução da dissertação em dedicação exclusiva, assim como ao CNPq e à Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

Muito Obrigado

"O passado é história, o futuro é mistério, o agora é uma dádiva e por isso se chama presente"

Provérbio chinês

BOMFIM, W. A. **Análise de isolados clínicos de herpes simplex associados à resistência aos antivirais**. 2017. 48 f. Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, 2017.

RESUMO

Infecções causadas pelo vírus herpes simplex (HSV) são tratadas com antiviral análogo de nucleosídeo, sendo o de escolha o aciclovir (ACV). Entretanto, em algumas circunstâncias, por exemplo, após tratamento prolongado, pode ocorrer a seleção de cepas resistentes. Esta resistência ao ACV é geralmente adquirida através de mutações no gene da *timidina quinase (tk) (ul23)*, não sendo incomum a resistência cruzada com outros análogos de nucleosídeos dependentes da *tk* viral, como o penciclovir (PCV) e a brivudina (BVDU). Como tratamento opcional, são empregados os fármacos que não dependem da *tk* viral para sua ação, porém inibem o gene da *DNA polimerase (ul30)*, como o foscarnet (FOS) e o cidofovir (CDV), compostos estes correlacionados à frequentes efeitos secundários tóxicos. Este trabalho teve o intuito de estudar 25 amostras clínicas virais que foram adaptadas em cultura celular e avaliar as cepas de HSV-1 frente aos antivirais de ação dependente dos genes *ul23* e *ul30*, por meio dos testes de MTT e ensaio de redução de plaque, utilizando a concentração inibitória de 50% (CI₅₀), comparativamente às cepas padrões. Foram identificadas quatro cepas resistentes a pelo menos um dos antivirais, sendo que três apresentaram resistência cruzada ao ACV, PCV e BVDU (análogos de nucleosídeos de ação dependente do gene *ul23*). Nenhum isolado apresentou resistência aos antivirais FOS e CDV, de ação dependente do gene *ul30*.

Palavras-chaves: herpes simplex; isolados clínicos; resistência; antivirais.

BOMFIM, W. A. **Analysis of clinical isolates of herpes simplex associated with resistance to antivirals.** 2017. 48 p. Dissertation presented as requisite for obtaining the title of Master, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, 2017.

ABSTRACT

Infections caused by the herpes simplex virus (HSV) are treated with nucleoside analogue antiviral, the choice being acyclovir (ACV). However, in some circumstances, for example, after prolonged treatment, selection of resistant strains may occur. This resistance to ACV is generally acquired through mutations in the thymidine kinase (tk) gene (ul 23), and cross-resistance with other viral tk-dependent nucleoside analogues such as penciclovir (PCV) and brivudine (BVDU) . As an optional treatment, drugs that do not depend on viral tk for their action are used, but inhibit the DNA polymerase (ul30) gene, such as foscarnet (FOS) and cidofovir (CDV), which are correlated to frequent toxic side effects . The aim of this study was to study 25 viral clinical samples that were adapted in cell culture and to evaluate HSV-1 strains against the ulnar and ul30 gene-dependent strains by means of MTT tests and plaque reduction assay, using the 50% inhibitory concentration (IC50), compared to the standard strains. Four strains resistant to at least one of the antivirals were identified, and three presented cross-resistance to ACV, PCV and BVDU (ul23 gene-dependent nucleoside analogues). None of the isolates presented resistance to the FOS and CDV antivirals, whose action is dependent on the ul30 gene.

Key words: herpes simplex; clinical isolates; resistance; antivirals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura do HSV	17
Figura 2 – Fotomicrografia eletrônica de transmissão do HSV	17
Figura 3 – Organização do genoma do HSV	19
Figura 4 – Ciclo de replicação do HSV	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Identificação do local da coleta dos materiais	35
Tabela 2 – Genes avaliados, desenho dos primers e produto da PCR.....	37
Tabela 3 – Genes avaliados, desenho dos primers e produto da PCR.....	40
Tabela 4 – Origem do material e tipagem das cepas por PCR	42
Tabela 5 – Concentração Inibitória 50% (CI50) dos antivirais por MTT	44
Tabela 6 – Concentração Inibitória 50% (CI50) dos antivirais pela redução de plaque.....	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	FAMÍLIA HERPESVIRIDAE	14
2.2	HERPES SIMPLEX.....	16
2.2.1	Estrutura	16
2.2.2	Genoma.....	18
2.2.2.1	Genes	19
2.2.3	Ciclo replicativo.....	20
2.2.4	Patogenia da infecção	22
2.3	ANTIVIRAIS UTILIZADOS CONTRA O HSV	23
2.3.1	Aciclovir	23
2.3.2	Penciclovir	25
2.3.3	Cidofovir	25
2.3.4	Foscarnet.....	26
2.3.5	Brivudina.....	26
2.4	POLIMORFISMO NOS GENES ul23 e ul30.....	26
3	OBJETIVOS	29
4	REFERÊNCIAS	30
5	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	33
	Caracterização de isolados clínicos de herpes simplex e resistência aos antivirais.	33
	Resumo	33
	Introdução	33
	Materiais e Métodos	34
	Resultados e Discussão	41
	Conclusão	47
	Referências Bibliográficas	48

1. Introdução

O vírus herpes simplex (HSV) é causador de infecções de considerável importância na saúde pública mundial. Após a infecção primária, o vírus pode persistir nos gânglios neurais sensoriais e autônomos durante toda a vida do hospedeiro. Em indivíduos imunocompetentes, o HSV pode causar recidivas como lesões orolábiais ou genitais incomodas e por vezes dolorosas. O estabelecimento de infecção persistente pode resultar em incapacidades físicas, exclusão social e sofrimento psicológico ao longo do tempo (BELSHE et al., 2012). Além disso, infecções graves e fatais podem ocorrer, particularmente, em recém-nascidos e em indivíduos imunocomprometidos (KIMBERLIM et al., 2001; YAHAV et al., 2009).

O aciclovir (ACV) tem sido utilizado como fármaco de escolha para a profilaxia e tratamento de infecções por HSV, por quase quatro décadas. No entanto, a resistência viral a este composto é uma realidade crescente. A prevalência particularmente elevada de resistência ao ACV tem sido relatada em doentes imunocomprometidos que são, profilicamente, tratados com a droga durante longos períodos (KIMBERLIM et al., 2001).

Um estudo realizado na Holanda analisou 542 cepas de HSV e demonstrou resistência ao ACV em apenas 0,27% dos pacientes imunocompetentes. Em contraste, a prevalência de vírus resistente ao ACV em pacientes imunocomprometidos foi de 7% e a maior frequência de resistentes (14,3%) foi observada em pacientes após transplante de células-tronco hematopoiéticas (STRÁNSKÁ et al., 2005). Como a resistência ao ACV é geralmente relacionada às mutações no gene *UL23* que codifica a timidina quinase (tk), a resistência cruzada em relação a outros análogos de

nucleosídeos dependentes da *tk*, como penciclovir e brivudina, não é incomum em casos de resistência aos análogos de nucleosídeos, fármacos que não dependem da *tk* viral possam ser administrados, tais como os inibidores da DNA polimerase viral (*DNA pol*), codificada pelo gene *ul30* (*DNA pol*), tais como o foscarnet e cidofovir, estes compostos medeiam frequentemente efeitos secundários tóxicos graves (SAUERBREI, 2010).

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Família *Herpesviridae*

O vírus herpes simplex (HSV), também chamado de herpes simplex humano, pertencente à família *Herpesviridae* que agrupa mais de 200 espécies identificadas, sendo oito destas descritas como patógenos humanos (PELLETT & ROIZMAN, 2007). Caracterizam-se por produzirem, principalmente, infecções dermo, linfo e neurotrópicas em humanos e animais. O HSV é o agente causador de erupções vesiculares na derme e mucosa, podendo causar doença generalizada nos órgãos internos e, em casos graves, o acometimento do sistema nervoso central (SKÖLDENBERG et al., 1984; WHITLEY & KIMBERLIN, 1998; ITZHAKI & WOSNIAK, 2006).

A família *Herpesviridae* é classificada em três subfamílias *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*, com base nas propriedades biológicas e nas sequências do DNA (PELLETT & ROIZMAN, 2007; ICTV, 2015).

Os membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* foram assim classificados por possuírem ciclo replicativo relativamente curto, propagação rápida em cultura de células e tendência a estabelecer infecção latente (mas não exclusivamente) em neurônios/gânglios sensoriais (BROOKS et al., 2000). Esta subfamília é representada pelos gêneros *Simplexvirus*, *Varicellovirus*, *Mardivirus* e *Iltovirus* (ICTV, 2015). Os dois primeiros gêneros acometem os mamíferos e os outros, aves (PELLETT & ROIZMAN, 2007).

Os representantes da subfamília *Betaherpesvirinae* apresentam ciclo replicativo longo, a evolução da infecção é lenta e as células

infectadas, frequentemente, fundem-se evoluindo para células gigantes (citomegalia). Estes podem se manter latentes em glândulas secretórias, células linforreticulares, rins e em outros tecidos. Esta subfamília é representada pelos gêneros *Cytomegalovirus*, *Muromegalovirus*, *Roseolovirus* e *Proboscivirus* (MIRANDA, 2002; PELLETT & ROIZMAN, 2007).

Os vírus pertencentes à subfamília Gammaherpesvirinae infectam células linfoides e linfócitos T e B, onde se tornam latentes (PELLETT & ROIZMAN, 2007), entretanto, alguns membros podem causar infecções líticas em células fibroblásticas e epitelióides. Estes vírus pertencem a dois gêneros, *Lymphocryptovirus* e *Rhadinovirus*.

Os herpesvírus possuem algumas características comum, tais como:

1) Todos sintetizam um grande conjunto de enzimas, tais como: timidina quinase, timidilato sintetase, dUTPase, ribonucleotídeo redutase (envolvidos no metabolismo de ácidos nucleicos), DNA polimerase, helicase e primase (responsável pela síntese de DNA) e quinases (processamento de proteínas) (PELLETT & ROIZMAN, 2007).

2) A organização do capsídeo e a síntese do DNA viral ocorrem no núcleo da célula hospedeira e o capsídeo é envelopado assim que passa pela membrana nuclear. A partir do momento que a partícula viral imatura passa do núcleo para o citoplasma esta recebe um envelope simples e o perde na sequência, para recebê-lo nova e definitivamente, assim que passar pela membrana citoplasmática (PELLETT & ROIZMAN, 2007).

3) A replicação do vírus é acompanhada pela destruição da célula infectada.

4) A capacidade de estabelecer infecção latente em seus hospedeiros naturais. Em estado de latência, o genoma viral permanece na forma de uma molécula circular fechada e somente um pequeno segmento do genoma viral é transcrito. A reativação do genoma, sob influência de fatores extrínseco e intrínseco, desencadeará a replicação completa e a recidiva da infecção (PELLETT & ROIZMAN, 2007).

2.2 Herpes simplex

O Herpes simplex vírus (HSV) (ICTV, 2015) foi o primeiro herpesvírus a ser descoberto, representados pelos sorotipos 1 e 2, e são os agentes mais extensivamente estudados, com destaque ao HSV-1 (PELLETT & ROIZMAN, 2007). O HSV tem sido usado como modelo em diversos estudos, como por exemplo, nas pesquisas relativas à terapia contra câncer, regulação e terapia gênica, dentre outros (MIRANDA, 2002).

2.2.1 Estrutura do HSV

O vírion do HSV possui diâmetro que varia entre 120 e 200 nm e é constituído de quatro componentes estruturais, o core contendo o DNA, o capsídeo icosaédrico, uma camada amorfa de proteínas denominada tegumento, que separa o capsídeo da camada mais externa e o envelope constituído por uma bicamada lipídica com glicoproteínas embutidas nela (Figuras 1 e 2) (GARNER, 2003; PELLETT & ROIZMAN, 2007).

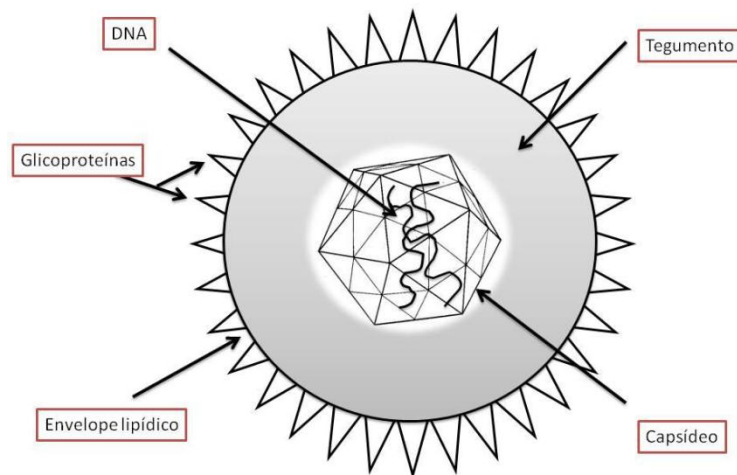


Figura 1 - Representação esquemática da estrutura dos herpes vírus humanos.
FONTE: Adaptado de CLEMENTS; BROWN, 1997



Figura 2 – Eletromicrografia de transmissão de três partículas de HSV
FONTE: Adaptado de BIENZ, 2005.

O envelope, conforme descrito, é constituído por uma bicamada lipídica que apresenta 12 glicoproteínas virais distintas, sendo as principais gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gL e gM. Além dessas proteínas, possui outras proteínas que não são glicosiladas (GONÇALVES, 2000; PELLETT & ROIZMAN, 2007).

O tegumento é composto por cerca de 20 proteínas, dentre estas, destacam-se a VP16 (ORFUL48), VP22 (UL49) e VP1-2 (UL36) (MIRANDA, 2002).

O capsídeo é composto por 162 capsômeros e, de acordo com Roizman & Whitley (2007), tem uma camada mais externa, composta por quatro proteínas VP5 (UL19), VP26 (UL35), VP23 (UL18) e VP19C (UL38), além de duas intermediárias UL6 e VP24 (UL26); todas estão organizadas de uma maneira a formar poro para passagem do DNA ao exterior do vírion (MIRANDA, 2002).

O core contém um filamento linear de DNA fita-dupla (dsDNA) (MIRANDA, 2002; ROIZMAN & WHITLEY, 2007) cujo tamanho varia de 125 a 295 kb. A expressão do genoma pode dar origem a, aproximadamente, 70 a 200 proteínas (WHITE & FENNER, 1994; PELLETT & ROIZMAN, 2007).

2.2.2 Genoma do HSV

O dsDNA genômico está disposto, predominantemente, na forma linear, mas pode torna-se circular na ausência de síntese protéica, assim que adentra o núcleo da célula hospedeira (ROIZMAN & WHITLEY, 2007; KNIPE & CLIFFE, 2008). Uma característica do genoma do HSV é a capacidade de sofrer rearranjos, além de possuir sequências repetidas, terminais e internas (BROOKS et al., 2000). O seu sequenciamento estima um conteúdo de GC de 68,3% no genoma do HSV-1 (DOLAN et al., 1998; GONÇALVES, 2000; PELLETT & ROIZMAN, 2007).

É constituído de dois domínios, segmento L (longo) e segmento S (curto), ligados covalentemente entre si, formando isômeros lineares, IL

(inverso do componente L) e IS (inverso do componente S) (Figura 3) (BROOKS et al., 2000, PELLETT & ROIZMAN, 2007).



Figura 3 - Organização do genoma do HSV-1
FONTE: Adaptado de ITZHAKI; WOSNIAK, 2006.

2.2.2.1 Genes

Após sequenciamento, descobriram 77 genes distintos que codificam cerca de 70 a 200 proteínas. Dentre os transcritos, aparentemente, existem aqueles que não codificam proteínas, conhecidos como *latency-associated transcripts* - transcritos associados a latência (LAT) e estão associados ao mecanismo de latência do HSV (PELLETT & ROIZMAN, 2007).

Os genes do HSV são classificados em três grupos, como α ou precoce imediato (IE - *immediate early*), β ou precoce (E - *early*) e γ ou tardio (L - *late*) (MIRANDA, 2002; PELLETT & ROIZMAN, 2007).

A ativação e expressão dos genes β encontram-se sob o controle dos genes α . Os genes β codificam, principalmente, proteínas necessárias à síntese de DNA viral - expressão dos genes da *DNA polimerase* (*UL30*) e *tk* (*UL23*). Os genes γ , regulados pelas proteínas originárias dos genes α e β , codificam polipeptídeos estruturais (PELLETT & ROIZMAN, 2007).

2.2.3 Ciclo replicativo

O ciclo produtivo do HSV, envolve as etapas de a) entrada do vírus na célula; b) transporte da partícula para o núcleo; c) expressão das proteínas virais no citoplasma; d) transporte do material proteico recém-sintetizado para o núcleo; e) reunião dos componentes produzidos; f) liberação das partículas virais recém-formadas (KRUMMENACHER et al., 1998).

Conforme representado na figura 4, o vírus se liga à superfície celular por meio das gB e gC (a); após esta fase, há a interação da gD a um receptor celular específico (b); ocorre a fusão do vírus com a membrana celular deixando livres no citoplasma o tegumento e capsídeo viral (c); algumas proteínas do tegumento são responsáveis pelo bloqueio da síntese proteica celular (d); o núcleocapsídeo é transportado ao núcleo onde o capsídeo é digerido, liberando o DNA viral (que se torna circular), e se inicia a expressão dos genes α (e). A seguir é gerado uma síntese em cascata, com a expressão dos genes β (f) e γ (g); na última etapa as proteínas do capsídeo são montadas, o DNA do vírus é encapsidado (h) juntamente com o tegumento; a partícula viral imatura é transportada para o citoplasma e brota da membrana citoplasmática (i), adquirindo assim o seu derradeiro envelope ao ser liberado ao meio extracelular (KWONG & FRENKEL, 1987; HUTCHINSON & JOHNSON, 1995; TAL-SINGER et al., 1997; ITZHAKI & WOSNIAK, 2006).

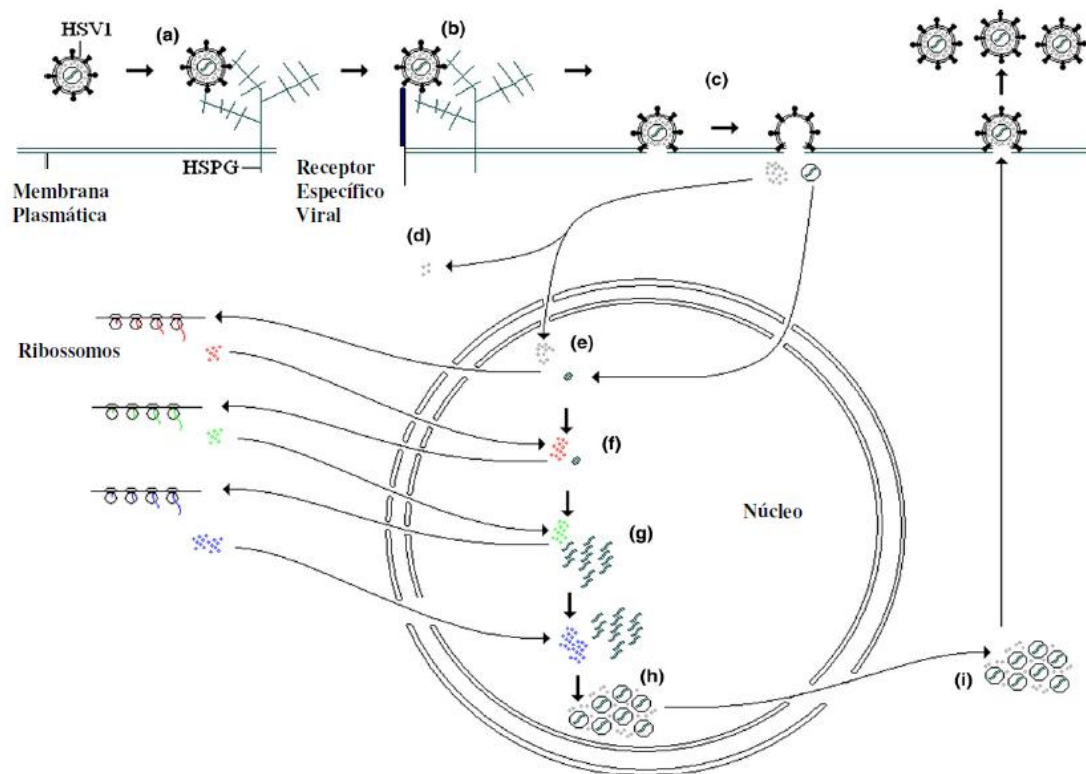


Figura 4 - Ciclo de replicação do HSV-1
FONTE: Adaptado de ITZHAKI; WOSNIAK, 2006

As partículas virais envelopadas podem emergir da célula por dois hipotéticos mecanismos - ocorre uma sucessão de brotamentos, a partícula viral é transportada através da membrana nuclear, passando pelo retículo endoplasmático e aparelho de Golgi e por fim à superfície celular; a outra hipótese consiste na passagem do capsídeo pela dupla membrana nuclear, adquirindo um envelope que é perdido quando da passagem pela membrana exterior do núcleo, produzindo capsídeos desnudos, os quais obterão seus envelopes no momento do brotamento pela membrana celular ou por estruturas citoplasmáticas (como aparelho de Golgi ou retículo endoplasmático) antes de serem transportados à superfície celular (HUTCHINSON & JOHNSON, 1995).

2.2.4 Patogenia da infecção

O HSV penetra no organismo pelo contato direto com secreções de doentes, através de solução de continuidade da derme ou mucosa e infecta as células epiteliais produzindo as lesões vesiculares. O vírus pode migrar, posteriormente, pelas terminações nervosas, no sentido retrógrado do estímulo nervoso e atingir os gânglios regionais, onde pode persistir em estado de latência (BROOKS et al., 2000; MIRANDA, 2002; BEAUMAN, 2005).

Em 1968, Nahmias e Dowdle demonstraram a presença de dois sorotipos distintos dentro do gênero *Simplexvirus*, com base nas diferenças imunológicas, epidemiológicas e clínicas, o HSV tipo 1 e tipo 2 (MIRANDA, 2002; PELLETT & ROIZMAN, 2007).

As manifestações clínicas da doença exibem diferentes graus de severidade em indivíduos normais e imunodeficientes (REEVES et al., 1981; WHITLEY & ROIZMAN, 1997). A Infecção causada pelo HSV pode apresentar-se de forma assintomática até sinais que variam de pequenos a alto potencial de complicação (retenção urinária, meningite, morbidade psicológica) (BROOKS et al., 2000; MIRANDA, 2002; BEAUMAN, 2005). O HSV-1 está frequentemente associado a lesões orofaciais e o seu local de replicação é a orofaríngea, mas também pode ser encontrado em lesões acima da cintura. Nestas condições a latência é estabelecida nos gânglios trigeminiais. Ao passo que, o HSV-2 está frequentemente ligado a infecções anogenitais, ou abaixo da cintura e a latência é estabelecida nos gânglios sacrais (FERREIRA & SOUSA,

2002), porém, tem sido demonstrado a ocorrência de cepas do HSV-1 causando lesões anogenitais (ENGELBERG et al., 2003).

2.3 Antivirais utilizados contra o HSV

Um dos maiores empecilhos à descoberta de novas substâncias antivirais é, basicamente, o efeito citotóxico que produzem. Esta dificuldade está relacionada à total dependência do vírus por sua célula hospedeira (SPINOSA et al., 2002).

Presume-se que o principal alvo no ciclo de replicação do HSV, no qual uma terapia antiviral pode ser desenvolvida com sucesso é durante a replicação do DNA viral. Assim, os principais antivirais utilizados são análogos de nucleosídeos. Estes análogos têm como alvo duas enzimas virais, a *tk* e a *DNA pol* e fazem uso das diferenças entre a replicação celular e viral para colocar em ação seus efeitos antivirais seletivos (COEN, 1996).

2.3.1 Aciclovir

O aciclovir (ACV) (acicloguanosina) é um inibidor potente e seletivo da replicação do DNA dos herpesvírus. Sua ação antiviral é mediada pelo ACV-trifosfato (ACV-TP) que inibe três etapas do ciclo replicativo, 1) inibe competitivamente a utilização da guanosina-trifosfato pela *DNA pol* viral; 2) determina o término do alongamento da fita de DNA nascente viral quando incorporado como substituto análogo da guanosina-monofosfato; 3) a DNA polimerase viral é inativada pela ligação ao ACV-TP, no molde do disparador do DNA (PAGE et al., 2004).

A alta seletividade do ACV na replicação viral em comparação à replicação do DNA celular ocorre devido a maior afinidade da *tk* viral em monofosforilar a ACV (cerca de 100 vezes maior do que a *tk* celular), além, evidentemente, da maior concentração de *tk* viral nas células infectadas (BRADY & BERNSTEIN, 2004; PAGE et al., 2004).

O aciclovir (ACV) é o fármaco de maior uso corrente nas infecções de HSV, seguida do penciclovir (PCV). Deve-se, entretanto, considerar que estes medicamentos são relativamente caros e muitos pacientes com recidivas podem não ter condições para arcar com o ônus de um tratamento longo (HAMMER & INOUE, 1997). Porém, o uso prolongado de ACV, tem demonstrado a seleção de cepas ACV resistentes, mutantes nos genes que codificam a *tk* e/ou a *DNA pol*. Em 95% dos casos de resistência é por conta de mutações na *tk*, levando ao bloqueio da síntese da enzima, síntese parcial ou ainda, síntese da proteína com especificidade alterada ao substrato, devido essas mutações serem localizadas em regiões conservadas do gene (LARDER et al., 1983; LARDER & DARBY, 1985; BESTMAN-SMITH et al., 2001; MORFIN & THOUVENOUT, 2003). A relativa alta frequência de mutações é possível uma vez que este gene não é essencial para a replicação viral, porém, facilita a reativação da latência, nos gânglios neurais (ROIZMAN & SEARS, 1996). O restante dos casos de resistência (5%) é conferida a mutações no gene *DNA pol* (LARDER & DARBY, 1985; KIMBERLIN et al., 2001).

Há uma baixa prevalência de cepas resistentes em pacientes imunocompetentes (cerca de 1%) (COLLINS & ELLIS, 1993), devido à resposta imune e, supostamente, ao baixo potencial patogênico das variantes

resistentes (COEN et al., 1989). Em contrapartida, nos pacientes imunocomprometidos (principalmente os transplantados de medula óssea) a prevalência de resistentes ao ACV varia entre 3,5% a 7,1% (BACON et al., 2003).

2.3.2 Penciclovir

O penciclovir (PCV) é um derivado sintético da guanina acíclica ou hidroxi-hidroximetil butil guanina. Possui mecanismo de ação similar ao do ACV. O penciclovir-TP é cerca de cem vezes menos potente do que o ACV, entretanto, atinge maior concentração plasmática e tem maior tempo de meia-vida. O PCV só está disponível em cremes para uso tópico, os dados sobre a segurança e eficácia em crianças com menos de 18 anos são insuficientes e, portanto, o seu uso em crianças não é recomendado. (BRUNNEMANN et al., 2016).

2.3.3 Cidofovir

O cidofovir (CDV) (monofosfato de citidina acíclica) é fosforilado pela *tk* celular em um metabólito biologicamente ativo e é dotado da capacidade de inibir seletivamente a replicação viral. Por não ser dependente da *tk* viral pode ser ativo contra as cepas deficientes em *tk*. A resistência ao cidofovir é rara e surge de mutações na *DNA pol* viral. Seu tempo de meia-vida é longo e, por isso, permite apenas poucas doses, porém apresenta elevada toxicidade. Pode ser usado topicamente ou por via intravenosa no tratamento

de HSV resistente ao ACV e ao foscarnet (BRADY & BERNSTEIN, 2004; CHILUKURI & ROSEN, 2003).

2.3.4 Foscarnet

O foscarnet (FOS) (ácido fosfonofórmico) é um fármaco análogo de pirofosfato usado no tratamento das infecções herpéticas (CHILUKURI & ROSEN, 2003) resistentes ao ACV, em pacientes imunocomprometidos. O FOS age diretamente inibindo a atividade da *DNA pol* ligando ao sítio ativo da enzima impedindo a síntese de DNA (BRADY & BERNSTEIN, 2004; KRAJEWSKI et al., 2006).

2.3.5 Brivudina

A brivudina (BVDU) (bromovinil-deoxiuridina) é um análogo anômalo de nucleosídeo, que após a sua fosforilação atua como competidor do trifosfato de desoxitimidina (dTTP). Sendo incorporado ao DNA viral nascente impede a continuidade de sua síntese. É disponível para uso tópico e oral no tratamento de infecções causadas pelo HSV-1 (CLERCQ, 2004; COEN & SCHAFFER, 2003).

2.4 Polimorfismo no genes *ul23* e *ul30*

Três mecanismos estão envolvidos na resistência do HSV aos antivirais seletivos: perda da atividade da *tk*; especificidade alterada da *tk* ao substrato; e atividade alterada da *DNA polimerase* viral (BESTMAN-SMITH & SCHMIT et al., 2001; MORFIN & THOUVENOT, 2003). A *DNA pol* viral é essencial para a replicação do HSV, contrariamente à *tk*, justificando a maior

probabilidade de se encontrar cepas resistente aos antivirais, devido à mutação no gene *ul23* do que no gene *ul30*. Enfatiza-se dessa forma, que, em torno de 95% da resistência ao ACV, por exemplo, é comumente causada por mutações do gene *ul23* da *tk*, sendo o restante (5%) devido à mutação no gene *ul30* da *DNA pol* viral (MORFIN & THOUVENOT, 2003).

A seleção de cepas de HSV resistentes aos antivirais pode ser atribuída ao desenvolvimento espontâneo de mutantes durante o processo de replicação viral. Estes acabam sendo selecionados pelo tratamento, bem como à falha do sistema imunológico em eliminá-los (SAUERBREI et al., 2010). Segundo Morfin & Thouvenot (2003), a prevalência de mutações de resistência ao ACV varia entre 0,3% a 1,0% em pacientes imunocompetentes, ratificando os dados, anteriormente, descritos (COLLINS & DARBY, 1991). Em contraste, em pacientes imunocomprometidos (BACON et al., 2003), essa frequência pode chegar a 7,1%, de acordo com Sauerbrei et al. (2010).

Dentre as mutações no gene *ul23* que podem estar associadas à resistência ao ACV, metade delas são causadas por substituições de nucleotídeos. De acordo com Frobert et al. (2014) e Sauerbrei et al. (2010), tais alterações estão, em sua maioria, nos sítios ativos do gene e/ou em regiões gênicas conservadas e geram alterações de aminoácidos em sítios catalíticos da enzima *tk*. A outra metade são inserções ou deleções nas regiões homopoliméricas de C ou G, causando um frameshift e, por conseguinte, síntese de *tk* não funcional, caracterizando esses locais como *mutational hot spots*. Além dessas mutações, uma modificação no aminoácido 337 da *tk* tem sido encontrada em cepas de HSV (BESTMANSMITH; SCHMIT et al., 2001; MORFIN & THOUVENOT, 2003).

As mutações aparentemente associadas ao polimorfismo do gene *tk* encontram-se de preferência fora dos sítios ativos e das zonas conservadas deste gene, podendo ser encontradas em HSV sensíveis ou resistentes ao ACV (FROBERT et al., 2007).

Nos casos de mutações no gene *ul30*, de menor prevalência, comparativamente às do *tk*, qualquer alteração química ou estrutural nesta enzima iria acarretar na diminuição ou bloqueio na replicação viral, porém, o gene não está livre de mutações silenciosas.

De acordo com Frobert et al. (2007), esse elevado polimorfismo no genoma do HSV-1 pode estar associado à grande porcentagem de G+C.

3. Objetivos

Este projeto tem por objetivo geral, a avaliação de isolados clínicos frente aos antivirais de uso médico.

Para tanto, os objetivos específicos desse trabalho foram:

- Isolar e adaptar em cultura celular para aumento da carga viral e seleção de amostras do sorotipo 1;
- Avaliar a susceptibilidade frente aos antivirais de ação dependente da tk viral (aciclovir, penciclovir e brivudina) e dependentes de DNA pol (foscarnet e cidofovir) por meio do teste de redução de plaque;
- Avaliar a susceptibilidade frente aos antivirais de ação dependente da tk viral (aciclovir, penciclovir e brivudina) e dependentes de DNA pol (foscarnet e cidofovir) por meio de ensaio de MTT;
- Padronizar iniciadores a fim de possibilitar o sequenciamento e análise dos transcritos.

4. Referências

BACON, T.H.; LEVIN, M.J.; LEARY, J.J.; SARISKY, R.T.; SUTTON, D. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. **Clin. Microbiol. Rev.** 16: p. 114–128, 2003.

BEAUMAN, J. G. Genital herpes. **American Family Physician**, 72(8): p. 1527-1534, 1541-1542, 2005.

BESTMAN-SMITH, J.; SCHMIT, I.; PAPADOPOULOU, B.; BOIVIN, G. Highly reliable heterologous system for evaluating resistance of clinical herpes simplex virus isolates to nucleoside analogues. **J. Virol.** 75: p. 3105-3110, 2001.

BIENZ, K.A. General virology. In: KAYSER, F.H.; BIENZ, K.A.; ECKERT, J.; ZINKERNAGEL, R.M. (eds.) **Medical Microbiology**. Berlin: Georg Thieme Verlag, 2005.

BRADY, R. C.; BERNSTEIN, D. I. Treatment of herpes simplex virus infections. **Antiviral Research**; 61(2): p. 73-81, 2004.

BROOKS, GEO F.; BUTEL, JANTE S.; MORSE, STEPHEN A. JAWETZ, MELNICK & ADELBERG **Microbiologia Médica**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

CHILUKURI, S.; ROSEN, T. Management of acyclovir-resistant herpes simplex virus. **Dermatol. Clin.** 21: p. 311–320, 2003.

CLEMENTS, J. BARKLIE; BROWN, S. MOIRA. Herpesviruses. **Principles of Medical Biology**, 9B(24): p. 393-414, 1997.

CLERCQ, E. Antiviral drugs in current clinical use. **Journal of Clinical Virology**, 30: p. 115-133, 2004.

COEN, D.M. Antiviral drug resistance in Herpes simplex virus. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 394: p. 49–57, 1996.

COEN, D.M.; KOSZ-VNENCHAK, M.; JACOBSON, J.G.; LEIB, D.A.; BOGARD, C.L.; SCHAFFER, P.A.; TYLER, K.L.; KNIPE, D.M. Thymidine kinase-negative herpes simplex virus mutants establish latency in mouse trigeminal ganglia but do not reactivate. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, 86: p. 4736-4740, 1989.

COEN, D.M.; SCHAFFER, P.A. Antiherpesvirus Drugs: A Promising Spectrum of New Drugs and Drug Targets. **Nature Reviews - Drug Discovery**. 2: p. 278-288, 2003.

COLLINS, P.; DARBY, G. Laboratory studies of herpes simplex virus strains resistant to acyclovir. **Rev. Med. Virol.** 1: p. 19-28, 1991.

COLLINS, P.; ELLIS, M.N. Sensitivity monitoring of clinical isolates of herpes simplex virus to acyclovir. **J. Med. Virol.** 1: p. 58-66, 1993.

DOLAN, AIDAN; JAMIESON, FIONA E.; CUNNINGHAM, CHARLES; BARNETT, BARBARA C.; MCGEOCH, DUNCAN J.. The genome sequence of herpes simplex virus type 2. **Journal of Virology**, 72(3): p. 2010-2021, 1998.

ENGELBERG, R.; CARRELL, D.; KRANTZ, E.; COREY, L.; WALD, A. Natural history of genital herpes simplex virus type 1 infection. **Sexually Transmitted Disease** 30(2): p. 174-177, 2003.

FERREIRA, W.; SOUSA, J. **Microbiologia**. Vol. III. Lisboa : Lidel, 2002.

FROBERT, E.; BURREL, S.; DUCASTELLE-LEPRETRE, S.; BILLAUD, G.; ADER, F.; CASALEGNO, J. S.; NAVE, V.; BOUTOLLEAU, D.; MICHALLET, M.; LINA, B.; MORFIN, F. Resistance of herpes simplex viruses to acyclovir: an update from a ten-year survey in France. **Antiviral Res.** 111: p. 36–41. 2014.

GARNER, J. A. Herpes simplex virion entry into and intracellular transport within mammalian cells. **Adv. Drug. Deliv. Rev.** 55(11): p. 1497-1513, 2003.

GONÇALVES, A. Propriedades gerais dos herpesvírus. In: LUPI, O; SILVA, Â. G. da; PEREIRA, A. C. **Herpes clínica, diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000.

HAMMER, S.M.; INOUE, R.T. Antiviral agents. In: RICHMAN, D.D.; WHITLEY, R.J.; HAYDEN JR., F.G. (EDS.) **Clin. Virol.**, Churchill Livingstone, New York, p. 186–201, 1997.

HUTCHINSON, L.; JOHNSON, D.C. Herpes simplex virus glycoprotein K promotes egress of virus particles. **J. Virol.**, 69: p. 5401–5413, 1995.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses – **Virus Taxonomy List 2015**. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> . Acesso em: 10 dez. 2016.

ITZHAKI, R.F.; WOSNIAK, M.A. Herpes simplex virus type 1, apolipoprotein E, and cholesterol: A dangerous liaison in Alzheimer's disease and other disorders. **Prog. Lipid. Res.** 45: p. 73-90, 2006.

KIMBERLIN, D.W.; CHIN-YU, L.; JACOBS, R.F.; et al. Natural history of neonatal herpes simplex virus infections in the acyclovir era. **Pediatrics** 108(1): p. 223-229, 2001.

KRAJEWSKI K., ZHANG Y., PARRISH D., DESCHAMPS J., ROLLER P. P., PATHAK V. K., New HIV-1 reverse transcriptase inhibitors based on a tricyclic benzothiophene scaffold: Synthesis, resolution, and inhibitors activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 16: p. 3034-3038, 2006

KRUMMENACHER, C.; NICOLA, A.V.; WHITBECK, J.C.; LOU, H.; HOU, W.; LAMBRIS, J.D. Herpes simplex virus glycoprotein D can bind to poliovirus receptor related protein 1 or herpesvirus entry mediator, two structurally unrelated mediators of virus entry. **J. Virol.**, 72: p. 7064–7074, 1998.

KWONG, A.D.; FRENKEL, N. Herpes simplex virus-infected cells contain a function (s) that destabilizes both host and viral mRNAs. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 84: p. 1926–1930, 1987.

LARDER, B.A.; CHENG, Y.C.; DARBY, G. Characterization of abnormal thymidine kinases induced by drug-resistant strains of herpes simplex virus type 1. **J. Gen. Virol.** 64: p. 523-532, 1983.

LARDER, B.A.; DARBY, G. Selection and characterisation of acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 mutants inducing altered DNA polymerase activities. **Virology.** 146: p. 262-271, 1985.

MIRANDA, M. M. F. S. Viroses Dermatópicas. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à Virologia Humana**, 1ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 75-85, 2002.

MORFIN, F.; THOUVENOUT, D. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. **J. Clin. Virol.** 26, p. 29-37, 2003.

PAGE, C.; CURTIS, M.; SUTTER, M.; WALKER, M.; HOFFMAN, B. **Farmacologia Integrada**, 2ª edição, , São Paulo: Editora Manole, p. 91-109, 2004.

PELLETT, P.E.; ROIZMAN, B. The Family Herpesviridae: a Brief Introduction. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M (eds.). **Fields Virology**, 5th. 2007. Vol II. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, p. 2479-1499, 2007.

SPINOSA, H.S., GÓRNIK, S.L., BERNARDI, M.M. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária, , 3ª edição, **Editora Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, p. 438-440, 2002. .

TAL-SINGER, R.; LASNER, T. M.; PODRZUCKI, W.; SKOKOTAS, A.; LEARY, J. J.; BERGER, S. L.; FRASER, N. W.; Gene expression during reactivation of herpes simplex virus type 1 from latency in the peripheral nervous system is different from that during lytic infection of tissue cultures. **J. Vir.** 71(7): p. 5268–5276, 1997.

WHITE, D.O.; FENNER, F.J. **Medical Virology**. 4th. ed., San Diego: Academic, 1994.

5. Artigo para publicação

Caracterização de isolados clínicos de herpes simplex e resistência aos antivirais.

Resumo

As infecções herpéticas são tratadas com antiviral análogo de nucleosídeo, sendo geralmente de escolha o aciclovir (ACV). O uso prolongado deste antiviral possibilita a seleção de cepas resistentes. Este trabalho teve o intuito de isolar, adaptar e sorotipar 26 amostras virais clínicas, a partir de lesões herpéticas. As cepas de herpes simplex-1 foram avaliadas frente aos antivirais comerciais, por meio dos testes de redução de MTT e redução de plaque, utilizando concentrações inibitórias 50% (CI₅₀) dos antivirais, comparativamente às cepas padrões. Foram identificadas 4 cepas resistentes a pelo menos um antiviral, sendo que 3 apresentaram resistência cruzada aos análogos de nucleosídeos dependentes da ação da timidina quinase viral, expressão do gene *ul23*. Nenhum isolado apresentou resistência aos antivirais de ação na DNA polimerase viral, codificada pelo gene *ul30*.

Palavras chaves: Herpes simplex, Antivirais, Resistencia

Introdução

O vírus herpes simplex (HSV) é um dos patógenos de grande importância na saúde pública e estima-se que cerca de 85% da população sejam portadoras do agente (WUTZLER et al., 2000; YEUNG-YUE et al., 2002) sem que haja, necessariamente, a manifestação da doença. Pode ocorrer doenças mais graves culminando com morte, tais como na doença generalizada do recém nato e o acometimento do sistema nervoso central (SKÖLDENBERG et al., 1984; ROYZMAN & WHITLEY, 2007). Em pacientes imunocomprometidos a infecção é também considerada de alto risco (COREY et al., 2004; KUO et al., 2001).

O tratamento de escolha nestas infecções consiste na utilização do aciclovir (ACV), análogo de nucleosídeo que inibe a síntese do DNA viral (SAIJO et al., 2002). Entretanto, o seu uso prolongado, principalmente em pacientes imunocomprometidos leva a seleção de cepas resistentes à droga. Similarmente, pode ocorrer também com relação a outros análogos de nucleosídeos, tais como, penciclovir e brivudina. Como alternativa, é utilizado antivirais de ação na DNA polimerase viral, o foscarnet e cidofovir, porém estes apresentam efeitos colaterais.

As mutações no gene *ul23* são responsáveis por 95% dos casos de resistência ao ACV, ocasionando desde a supressão ou diminuição da síntese da timidina quinase (*tk*) até a alteração na especificidade ao substrato, devido essas mutações ocorrerem em regiões conservadas do gene (LARDER et al., 1983; LARDER & DARBY, 1985; BESTMAN-SMITH et al., 2001; MORFIN & THOUVENOUT, 2003). A alta frequência é devido a este gene não ser essencial para a replicação viral. O restante dos casos de resistência (5%) é conferido a mutações no gene *ul30*, que codifica a DNA polimerase viral, essencial para a replicação viral (LARDER & DARBY, 1985).

No presente trabalho foram avaliadas 26 amostras clínicas de herpes simplex, sendo adaptadas e isolado conforme o sorotipo, e submetidas a teste frente aos antivirais aciclovir, penciclovir, brivudina, foscarnet e cidofovir em ensaios de redução de plaque e ensaio de MTT. Também foram efetuados a padronização de iniciadores específicos a fim do sequenciamento dos transcritos.

Materiais e Métodos

Amostras clínicas.

Foram coletados 26 materiais de lesões vesiculares de regiões corpórea (Tabela 1), sendo a maioria de pacientes do Hospital de Clínicas e internos do Hospital Universitário do Norte do Paraná/UEL, sob a autorização nº 225/09 PF, do Comitê de Ética em pesquisa Humana da UEL. A coleta foi feita com swab e os materiais mantidos, sob refrigeração, em tubos apropriados com meio de cultura, contendo antibióticos (estreptomicina, penicilina e fungizona). Os sobrenadantes foram inoculados em culturas de células Hep-2 (carcinoma de laringe humana) estabelecidas em tubos, para isolamento e adaptação das amostras virais, avaliadas pelo desenvolvimento do efeito citopático.

Tabela 1. Identificação do local das lesões coletadas.

Local das lesões	Amostras
Labial	1 - 5, 7 - 9, 11, 18 - 24 e 26
Genital	6 e 16
Perianal	10 e 15
Perna	12
Glúteo	17
Mucosa oral	25
Costas	13
Ocular	14

Duas cepas padrões de HSV-1 foram utilizada como controle, KOS e AR-29, respectivamente sensível e resistente ao ACV, cedidas pela professora T.U.Nakamura, do Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá.

Cultura de Células.

Cultura de célula Vero (célula epitelial de rim de macaco verde africano) foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM),(Gibco/ Invitrogen, EUA) acrescido de 3% de soro fetal bovino (Gibco/ Invitrogen, EUA), adicionado de 100 µg/ml de estreptomicina (Sigma Chem. Co., EUA), 100 UI/ml de penicilina (Sigma Chem. Co., EUA) e 2,5 µg/ml de fungizona (Meizler Biopharma S/A, BR). As culturas foram mantidas em estufa a 37° C ou quando necessário em ambiente com tensão de 5% de CO₂ e após a formação da monocamada em aproximadamente 48h, submetidas a subcultivos.

Tipagem dos isolados.

Culturas de células estabelecidas em garrafas de 150 ml foram infectadas com as cepas adaptadas e após o desenvolvimento do efeito citoplástico (ECP), as células foram lisadas através de três ciclos consecutivos de congelamento e descongelamento. A extração do DNA foi realizada com o kit Qiagen. Em 200 µl do lisado da cultura, adicionou-se 20 µl de protease K e 200 µl de tampão de lise, seguido de agitação por 15 seg e incubação a 56°C por 10 min. Em seguida, foi adicionado 200 µl de etanol PA e mantido sob agitação por 15 seg e a solução transferida para o tubo com filtro, seguido de centrifugação a 6.000xg por 1 min. Ao filtro, adicionou-se 500 µl de tampão de lavagem 1, seguido de idêntico ciclo de centrifugação. Ao filtro foi adicionado 500 µl de tampão de lavagem 2, seguido de centrifugação nas mesmas condições e, finalmente, ao filtro adicionou-se 50 µl de tampão de eluição. O

material foi incubado à temperatura ambiente (15–25°C) por 1 min. Em seguida submetido à mesma centrifugação e o sedimento de DNA estocado a -20° C.

O teste de PCR foi realizado para a análise dos produtos dos genes *icp4* e *ul52* para caracterização do HSV-1 (TAL-SINGER et al., 1997; SU et al., 2008) e *ul28* para o HSV-2 (MARKOULATOS et al., 2001) (Tabela 2).

Tabela 2. Genes avaliados, primers e produtos da PCR para tipagem dos isolados de HSV.

Genes	Sequência 5' → 3'	Produto do PCR (pb)
<i>icp4</i>	ACTGTCGGTCACGGTCCC GGCGGGAAGTTGTGGACTGG	138
<i>ul52</i>	CATCGAAACCCACTTTCCCGAACA GCTGTCGCATTTGGCGGCAA	240
<i>ul28</i>	GTACAGACCTTCGGAGG CGCTTCATCATGGGC	227

As concentrações dos reagentes foram adaptadas para a reação de 20 µl. Utilizou-se tampão a 0,2 mM; 0,5 pmol de cada primer senso e anti-senso; MgCl₂ a 1,5 mM; dNTP a 0,2 mM; Taq pol a 2,5U; 50 ng de DNA da amostra e água ultrapura q.s.p 20 µl. A amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 min (*icp4*); 30 seg (*ul52* e *ul28*), pareamento a 60°C por 1 min (*icp4*); 55°C por 30 seg (*ul52*) e 60°C por 40 seg (*ul28*), extensão a 72°C por 2 min (*icp4*); 1 min (*ul52*) e 50 seg (*ul28*), extensão final a 72°C por 7 min e resfriamento a 4°C até ser estocado a -20°C. Os replicons foram resolvidos em gel de poliacrilamida a 12% com revelação argêntica (AgNO₃ a 0.011M).

Os antivirais utilizados foram: Zynvir (aciclovir sódico)(ACV) (Novafarma Ind. Farmac., BR), bromovinildesoxiuridina (BVDU), penciclovir (PCV) e cidofovir (CDV) (Sigma Chem. Co., EUA), e foscarnet (fosfonoformato) (FOS) (Hospira, EUA).

Títulação viral por Dose infecciosa em cultura de células 50% (TCID₅₀)

Culturas de células com 80-90% de confluência, estabelecidas em microplacas de 96 poços (Nunc, Dinamarca), foram inoculadas em sextuplicata com 100 µl/poço de cada isolado, diluído ao décimo (10^{-3} à 10^{-7}) em meio DMEM. Seguiu-se pela incubação das culturas a 37°C em ambiente de 5% de CO₂ e avaliação diária durante cinco dias seguintes, com base no efeito citopático viral, para a determinação do título viral. Título este, definido como a maior diluição do vírus capaz de causar 50% de efeito citopático nas culturas celulares, de acordo com Reed & Muench (1938) (DAELEMANS, 2011).

Avaliação fenotípica da suscetibilidade dos isolados de HSV aos antivirais pelo ensaio de MTT (SAUERBREI et al., 2010, com modificações).

Cada isolado de HSV, após conhecido o seu título viral, foi avaliada frente aos antivirais, para a determinação da concentração inibitória 50% (CI₅₀). Todos os antivirais foram diluídos a 1 mg/ml, sendo que o ACV, PCV e CDV foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), o BVDU diluído em tampão fosfato-salina, pH 7.3 e o FOS em água ultrapura (MAYO, 1982; LEARY et al., 2002). Para os testes, o ACV, BVDU, PCV e CDV foram utilizados nas concentrações de 0,25 µg/ml a 8 µg/ml e o FOS de 2 µg/ml a 128

$\mu\text{g/ml}$, todas diluições em DMEM (MORFIN & THOUVENOUT, 2003; SAUERBREI et al., 2010).

Os sistemas foram mantidos a 37°C em ambiente de 5% de CO_2 por 5 dias, após o qual o meio sobrenadante foi substituído por $10\mu\text{l}$ de reagente de MTT (brometo de dimetil-tiazolil-difeniltetrazólio) (Amresco, EUA), seguido de incubação nas mesmas condições, por 2h e, finalmente, pela adição de $90\mu\text{l}$ do agente solubilizador. As leituras espectrofotométricas, em 570 e 690 nm, foram realizadas após 15 min. A porcentagem de inibição viral (%IV) foi calculado através do Software GraphPad Prism v.7.03. O CI_{50} foi estabelecido como a concentração do antiviral capaz de inibir o efeito citopático em 50% em relação ao controle.

As cepas foram consideradas resistentes ao antiviral, seguindo como base os trabalhos de de la Iglesia et al., 1998 e Schubert et al., 2014, quando as CI_{50} foram maiores que: a) $2.5\mu\text{g/ml}$ ($11.1\mu\text{M}$) no caso de ACV; b) $1.0\mu\text{g/ml}$ ($4.4\mu\text{M}$) para o BVDU; c) $1.5\mu\text{g/ml}$ ($6.0\mu\text{M}$) para o PCV; d) $4.0\mu\text{g/ml}$ ($14.8\mu\text{M}$) para o CDV e e) $\geq 100\mu\text{g/ml}$ ($\geq 330\mu\text{M}$) para o FOS (de la IGLESIA et al., 1998; SCHUBERT et al., 2014).

Ensaio de redução de plaque

Cultura de células estabelecidas em placas de 24 poços (TPP, Suíça) foram submetidas à inoculação com $100\mu\text{l}$ dos isolados virais (titulado) tratados com $200\mu\text{l}$ da diluição previamente definida dos antivirais, em triplicata. Após incubação a 37°C em ambiente de 5% de CO_2 , as culturas de células foram reconstituídas com agarose nutriente e mantidas durante cinco dias. As culturas foram fixadas com formaldeído, coradas com cristal violeta e

os plaques aferidos. A porcentagem de inibição viral (%IV) foi determinada pela fórmula: %IV = [1 - (PFU com tratamento/PFU sem tratamento)] x 100, onde PFU significa Unidade Formadora de Plaque.

Padronização de primers para o sequenciamento dos produtos dos genes *ul23* e *ul30*

Foi necessário uma padronização de PCR convencional, a fim de tornar mais eficiente e ter um maior rendimento dos produtos para futuramente ter um sequenciamento dessas sequências. Os genes por serem muito extensos, foram subdivididos em 2 segmentos para o *ul23* e 5 segmentos para o *ul30* (Tabela 3)

Tabela 3. Genes avaliados, primers e produto da PCR para fins de sequenciamento.

Gene	Função	Sequência 5' → 3'	Produto da PCR (pb)
<i>ul23</i>	tk1	TTTTATTCTGTCCTTTTATTGCCGTCA	701
	tkR1	CATCGCCGCCCTCCTGTGCTACCC	
<i>ul23</i>	tk2	ACGATGTTTGTGCCGGGCAAGGTC	716
	tkR2	CGAGCGACCCTGCAGCGACCCGCT	
<i>ul30</i>	pol1	ATCCGCCAGACAAACAAGGCCCTT	1041
	polR1	CCCCACCCTCGTACTTCTTGATGG	
<i>ul30</i>	pol2	GTCCGAAGCGGGCGTGTGCTGTCG	1033
	polR2	GGCCGTCGTAGATGGTGCGGGTG	
<i>ul30</i>	pol3	CCATCTGGAGCTCTCGGCCGTCGC	1157
	polR3	GCTAAAACAGCAGGTCGACCAGGG	
<i>ul30</i>	pol4	AGATGCTCATCAAGGGCGTGGATC	1043
	pol4a	GTAAGATGCTCATCAAGGGCGTGGATC	
<i>ul30</i>	polR4/a	GGCTCATAGACCGGATGCTCAC	1046

A reação foi realizada para o volume de 20 µl, com as seguintes condições: tampão a 0,2 mM; primer senso e anti-senso a 0,2 pmol

de cada; MgCl₂ a 1,5 mM; dNTP a 0,2 mM; Taq a 2,5U; água ultrapura q.s.p. 20 µl. A amplificação foi realizada nas seguintes etapas: desnaturação inicial a 94°C por 4 min., 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 min., pareamento a 55,5°C (tk1), 58°C (tk2), 62°C (pol 1), 63°C (pol 2), 63°C (pol 3), 61°C (pol 4), 61°C (pol 5), por 1 min.; extensão a 72°C por 2 min., extensão final a 72°C por 7 min. e resfriamento a 4°C até ser estocado no freezer -20°C. Os replicons foram resolvidos em gel de poliacrilamida a 12% com impregnação argêntica (AgNO₃ a 0.011M).

Resultados e Discussão

Tipagem dos isolados

Dos 26 isolados, 20 (76%) foram identificados como HSV-1, pela amplificação com os primers para *icp4* e *ul52*, 3 (12%) como HSV-2 (*ul28*) e 3 (12%) não amplificaram com nenhum dos primers. (Tabela 4)

Todos os isolados provenientes de lesões da região orofacial foram identificados como sendo do tipo 1, duas das três cepas identificadas como tipo 2 eram da região abaixo da cintura, ratificando dados de Ferreira & Sousa (2002). Três isolados não apresentaram resultados conclusivos, não desenvolvendo efeito citopático na etapa de adaptação em cultura de células e nem amplificadas em PCR.

Tabela 4. Local das coletas e tipagem das amostras por meio de PCR.

Amostras	<i>icp4</i>*	<i>ul28</i>*	<i>ul52</i>*
AR29	+	-	+
KOS	+	-	+
1	+	-	+
2	+	-	+
3	+	-	+
4	+	-	+
5	+	-	+
6	-	+	-
7	+	-	+
8	+	-	+
9	+	-	+
10	-	-	-
11	+	-	+
12	+	-	+
13	-	+	-
14	+	-	+
15	-	-	-
16	-	-	-
17	-	+	-
18	+	-	+
19	+	-	+
20	+	-	+
21	+	-	+
22	+	-	+
23	+	-	+
24	+	-	+
25	+	-	+
26	+	-	+

* Primers para os genes *icp4* e *ul52* específicos para o HSV-1 e o *ul52* específico para HSV-2.

Avaliação fenotípica por ensaio de redução do MTT

Foram avaliados apenas os 20 isolados identificados como HSV-1, dos quais 16 (80%) foram demonstrados como sendo sensíveis ao

ACV ($CI_{50} < 0,25-0,6 \mu\text{g/ml}$); 17 (85%) sensíveis ao PCV ($CI_{50} < 0,25-0,7 \mu\text{g/ml}$) e 17 (85%) sensíveis ao BVDU ($CI_{50} < 0,25-0,7 \mu\text{g/ml}$). Todos os 20 isolados foram sensíveis ao CDV e FOS (CDV: $CI_{50} < 0,25-0,6 \mu\text{g/ml}$; FOS: $CI_{50} 15,6-44,5 \mu\text{g/ml}$) (Tabela 5). Quatro isolados apresentaram pelo menos um valor de CI_{50} maior que o pré-estabelecido, para um dos antivirais testados (de la IGLESIA et al., 1998; SCHUBERT et al., 2014).

A resistência cruzada entre os análogos de nucleosídeos ACV, PCV e BVDU em 3 isolados (01, 05 e 14) é sugerida devido à similaridade dos mecanismos de ação desses antivirais (SAUERBREI et al., 2010). Em contraposição, cepas resistentes ao ACV, mas sensível ao PCV deve-se à *tk* viral alterada, mas ainda funcional (isolado 08), possivelmente pela diminuição na eficiência de fosforilação (CHIOU et al., 1995; BOYD et al., 1993).

A sensibilidade de todos isolados ao FOS e CDV deve-se ao fato destes possuírem alvo específico distinto aos análogos de nucleosídeos, ou seja a inibição da DNA polimerase viral. Assim, ambas podem ser substitutas no controle de cepas resistentes, principalmente ao ACV, evento comum em pacientes imunocomprometidos (SAFRIN et al., 1991). A emergência de resistência ao CDV *in vivo* é considerado um evento muito raro (WYLES et al., 2005).

Collins & Ellis (1993) citaram que apenas 1% dos pacientes imunocompetentes infectados por HSV-1 apresentaram cepas resistentes ao ACV, em nosso trabalho detectamos em 15% dos isolados. O percentual elevado, provavelmente, seja em decorrência do universo menor de pacientes por nós analisado. Por outro lado, em nossa amostragem não foi possível definir o perfil de competência imunológica dos pacientes. Aproximadamente

25% do pacientes de nossa avaliação eram internados, dentre os quais, pelo menos três HIV soropositivos. Há de se considerar também o aspecto temporal das avaliações, com maior acesso ao ACV devido a popularização da droga nas últimas três décadas e o seu uso indiscriminado, fator de emergência de resistência; além da diferença de prevalência geográfica das avaliações.

Tabela 5. Concentração inibitória (CI₅₀) dos antivirais pelo ensaio de MTT

Amostras	ACV¹	PCV²	BVDU³	FOS	CDV
AR29	>8	>8	>8	32,1	0,3
KOS	<0,25	<0,25	<0,25	27,9	<0,25
1	6,7	5,5	6,2	38,3	<0,25
2	0,3	<0,25	0,4	43,2	<0,25
3	<0,25	<0,25	<0,25	22,1	0,3
4	<0,25	<0,25	0,3	26,3	0,5
5	5,3	4,7	3,9	18,9	0,3
6	<0,25	0,4	<0,25	24,5	0,4
7	0,6	0,5	0,4	34,8	<0,25
8	4,2	0,7	0,3	36,1	<0,25
9	<0,25	<0,25	<0,25	41	<0,25
11	<0,25	0,3	<0,25	36,5	0,5
12	<0,25	<0,25	<0,25	41,5	<0,25
14	4,9	3,2	3,4	44,5	<0,25
18	<0,25	<0,25	<0,25	15,6	<0,25
19	<0,25	0,3	0,4	22,3	<0,25
20	0,3	0,5	0,4	24,5	0,3
21	<0,25	<0,25	<0,25	28,1	0,5
22	<0,25	0,3	0,3	30,4	<0,25
23	0,4	0,6	0,7	29,3	<0,25
24	<0,25	0,3	0,3	42,8	0,3
25	0,3	<0,25	<0,25	28,6	0,6

As cepas indicadas em negrito/italico apresentaram CI₅₀ maior que o padrão de sensibilidade estabelecido por: de la IGLESIA et al., 1998; SCHUBERT et al., 2014.

¹CI₅₀> 2,5µg/ml (ACV); ²CI₅₀>1,5µg/ml (PCV); ³CI₅₀>1,0µg/ml (BVDU)

Avaliação por ensaio de Redução de Plaque

O ensaio de redução de plaque foi realizado para confirmar as cepas definidas como resistentes pelo ensaio de MTT (Tabela 6). Reafirma que a cepa padrão resistente ao ACV (AR29) demonstrou uma CI_{50} maior que a concentração máxima testada. Da mesma forma, demonstrou que a cepa sensível ao ACV (KOS) teve a CI_{50} menor do que a concentração mínima utilizada. A resistência cruzada entre os análogos de nucleosídeos (ACV, PCV e BVDU) foi detectada nas cepas 1, 5 e 14.

Nenhuma cepa apresentou CI_{50} maior que os valores pré estabelecidos para o FOS e CDV, em ambos os ensaios.

Tabela 6. Concentração Inibitória (CI_{50}) dos antivirais pelo ensaio de redução de plaque.

Amostra	ACV¹	PCV²	BVDU³	FOS	CDV
AR29	>8	>8	>8	27,2	0,4
KOS	<0,25	<0,25	<0,25	25,3	0,3
1	6,2	5,3	6,7	35,3	<0,25
5	3,5	3,1	3,5	33,4	<0,25
8	5,6	0,5	0,3	40,6	<0,25
14	3,9	3,7	3,6	37,8	<0,25

Os valores em itálico/negrito representam as CI_{50} maiores do que o padrão de sensibilidade estabelecido por de la IGLESIA et al., 1998; SCHUBERT et al., 2014, para as respectivas cepas.

¹ $CI_{50} > 2,5\mu\text{g/ml}$ (ACV); ² $CI_{50} > 1,5\mu\text{g/ml}$ (PCV); ³ $CI_{50} > 1,0\mu\text{g/ml}$ (BVDU)

A ativação do ACV requer a presença de *tk* para convertê-lo à forma ativada, trifosforilada. A *tk* viral converte a droga em ACV-monofosfato, ao adicionar um radical fosfato ao grupo 5'-OH do ACV. A afinidade da *tk* viral ao ACV é, aproximadamente, cem vezes maior do que a da *tk* celular. O ACV-monofosfato é um substrato para a *tk* celular que o converte em ACV- trifosfato,

é reconhecido pela DNA polimerase viral e incorporado ao DNA viral nascente. Como o ACV não dispõe do grupo 3'-OH livre, a síntese do DNA é finalizada incompleta (ELION, 1986; EVANS et al. 1998). O mecanismo do penciclovir é semelhante ao do ACV (KLEYMANN, 2003)

A BVDU é mono e difosforilada pela *tk* viral e trifosforilada pela quinase celular sendo este um análogo do substrato natural, a desoxitimidina-trifosfato (timidina) na ação da DNA polimerase viral. É incorporada na cadeia nascente de DNA viral conferindo-a instabilidade e afetando a sua funcionalidade, resultando na inibição da síntese do DNA viral (CLERQ, 1986; GUIMARÃES et al., 2006). As mutações que ocorrem no gene *tk* viral levam à diminuição ou ao bloqueio da atividade da enzima e à resistência ao antiviral

O CDV e o FOS não dependem da *tk* viral e em nosso estudo os 20 isolados foram sensíveis a estes antivirais, indicando baixo nível de polimorfismo no gene responsável pela expressão da DNA pol viral. Estudos apontam que em 95% dos casos de resistência as mutações ocorrem no gene *ul23* (MORFIN & THOUVENOT, 2003; BESTMAN-SMITH et al., 2001) e nos 5% restantes, a mutação ocorre no gene *ul30* (LARDER & DARBY, 1985).

Saubrei et al. (2010) avaliaram 20 cepas de HSV-1 frente aos mesmos antivirais (ACV, PCV ou BVDU), destes, 12 apresentaram resistência a pelo menos um antiviral de ação dependente de *tk* viral com alteração genotípica no gene *ul23*, porém, sem nenhuma alteração no gene *ul30*.

Frobert et al. (2014) estudaram pacientes receptores de células tronco e identificaram 6 cepas de HSV resistentes ao ACV, porém, sensíveis ao FOS, não sendo identificado nenhuma mutação relacionada ao gene *ul30*, após sequenciamento.

Portanto, os nossos resultados demonstraram que todos os isolados que apresentaram pelo menos um CI_{50} maior que os preestabelecidos na literatura, foram resistentes aos antivirais dependentes da tk viral. Ratificando a ocorrência maior de polimorfismo do gene *uI23*. Em contrapartida, nenhuma cepa apresentou resistência aos antivirais de ação associada à DNA pol, confirmando o conceito de baixa incidência de mutações no gene *uI30*, por ser essencial para a replicação do vírus.

Conclusão

Em conclusão, os resultados obtidos no presente estudo levaram às seguintes conclusões: a) Ratificaram importantes informações correntes relativas à natureza da resistência do HSV aos antivirais, relevantes à preocupação médica, quanto à emergência de resistência. O desenvolvimento de antivirais seletivos, até então, inimagináveis no controle das infecções virais, foi um significativo feito, em contrapartida, condições favoráveis à seleção de mutantes resistentes têm sido criadas. Efeito indesejável que decorre, principal e paradoxalmente, à popularização destes medicamentos, pelo uso indiscriminado dos mesmos; b) Demonstraram também a relevância do diagnóstico laboratorial, importante para definir a etiologia da infecção e ditame na minimização da pressão mutagênica; c) Da importância dos trabalhos desta natureza no entendimento e controle das infecções herpéticas.

Referencias Bibliográficas

BESTMAN-SMITH, J.; SCHMIT, I.; PAPADOPOULOU, B.; BOIVIN, G. Highly reliable heterologous system for evaluating resistance of clinical herpes simplex virus isolates to nucleoside analogues. **J. Virol.** 75, 3105-3110, 2001.

BOYD, M.R.; SAFRIN, S.; KERN, E.R. Penciclovir: A review of its spectrum of activity, selectivity, and cross-resistance pattern. **Antiviral Chem Chemother.** 4(1): p. 3-11, 1993.

CHIOU, H.C.; KUMURA, K.; HU, A.; KERNS, K.M.; COEN, D.M. Penciclovir-resistance mutations in the herpes simplex virus DNA polymerase gene. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy.** 6: p. 281-288, 1995.

COREY, L.; WALD, A.; PATEL, R.; et al. Once-daily valacyclovir to reduce the risk of transmission of genital herpes. **N. Engl. J. Med.** 350: p. 11-20, 2004.

DAELEMANS D, PAUWELS R, DE CLERCQ E, PANNECOUQUE C. A time-of-drug addiction approach to target identification of antiviral compounds. **Nat Protoc.** 6: p. 925-933, 2011.

de la IGLESIA, P.; MELON, S.; LOPEZ, B.; RODRIGUEZ, M.; BLANCO, M. I.; MELLADO, P.; de ONA, M. Rapid screening tests for determining in vitro susceptibility of herpes simplex virus clinical isolates. **J. Clin. Microbiol.** 36: p. 2389-2391, 1998.

ELION, G. History, mechanisms of action, spectrum and selectivity of nucleoside analogs. In: Mills, J. e Corey, L. (Ed.). *Antiviral Chemotherapy: New Directions for Clinical Application and Research.* New York, **Elsevier Science Publishing**, p. 118-137, 1986.

EVANS, J.; LOCK, K.; LEVINE, B.; CHAMPNESS, J.; SANDERSON, M.; SUMMERS, W.; MCLEISH, P.; BUCHAN, A. Herpesviral thymidine Kinases: laxity and resistance, **J. Gen. Virol.** 79: p. 2083-2092, 1998.

FROBERT, E.; THOUVENOT, D.; LINA, B.; et al. Genotyping diagnosis of acyclovir resistant herpes simplex virus. **J. Pathol. Biol.** 55(10): p. 504-511, 2007.

GUIMARÃES, S.; MOURA, D.; SILVA, P. **Terapêutica Medicamentosa e Suas Bases Farmacológicas.** 5ª edição. Porto, Porto Editora, 2006.

KLEYMANN, G. Novel Agents and Strategies to Treat Herpes Simplex Virus Infections, *Expert Investigation Drugs*, 12: p. 165-183, 2003.

KUO, Y.C.; CHEN, C.C.; TSAI, W.J.; HO, Y.H. Regulation of herpes simplex virus type 1 replication in Vero cells by *Psychotria serpens*: relationship to gene expression, DNA replication, and protein synthesis. **Antiviral Res.** 51: p. 95-109, 2001.

LARDER, B.A.; CHENG, Y.C.; DARBY, G. Characterization of abnormal thymidine kinases induced by drug-resistant strains of herpes simplex virus type 1. **J. Gen. Virol.** 64: p. 523-532, 1983.

LARDER, B.A.; DARBY, G. Selection and characterisation of acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 mutants inducing altered DNA polymerase activities. **Virology.** 146: p. 262-271, 1985

LEARY, J. J.; WITTROCK, R.; SARISKY, R. T.; WEINBERG, A.; LEVIN, M.J. Susceptibilities of herpes simplex viruses to penciclovir and acyclovir in eight cell lines, **Antimicrob Agents Chemother.** 46: p. 762-768, 2002

MAYO, D.R. Differentiation of herpes simplex virus type 1 and 2 by sensitivity to (E)-5-(2-boromovinyl)-2'-deoxyuridine. **J. Clin. Microbiol.** 15: p. 733-736, 1982.

MORFIN, F.; THOUVENOUT, D. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. **J. Clin. Virol.** 26, p. 29-37, 2003.

REED, L.J. & MUENCH, H. A simple method for estimating fifty percent endpoints. **Am. J. Hyg.** 27: p. 493-497, 1938.

ROYZMAN, B.; WHITLEY, R. J. The Nine Ages of Herpes Simplex Virus. **Herpes;** 8(1): p. 23-27, 2007.

SAFRIN, S.; ASHLEY, R.; HOULIHAN, C.; CUSICK, P.S.; MILLS, J. Clinical and serological features of herpes simplex virus infection in patients with AIDS. **AIDS.** 5: p. 1107-1110, 1991.

SAUERBREI, A.; DEINHARDT, S.; ZELL, R.; WUTZLER, P. Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant clinical isolates of herpes simplex virus. **Antiviral Research;** 86: p. 246-52, 2010.

SCHUBERT, A.; GENTNER, E.;BOHN, K.; SCHWARZ, M.; MERTENS, T.; SAUERBREI, A. Single nucleotide polymorphisms of thymidine kinase and DNA polymerase genes in clinical herpes simplex virus type 1 isolates associated with different resistance phenotypes. **Antiviral Research,** 107: p. 16-22, 2014.

SKÖLDENBERG, BIRGIT. et al. Acyclovir versus vidarabine in herpes simplex encephalitis. **The Lancet,** 324: p. 707-711, 1984.

YEUNG-YUE, K.A.; BRENTJENS, M.H.; LEE, P.C.; TYRING, S.K. Herpes simplex viruses 1 and 2. **Dermatol. Clin.** 20: p. 249-266, 2002.

WUTZLER, P.; DOERR, H.W.; FARBER, I.; et al. Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in selected German populations—relevance for the incidence of genital herpes, **J. Med. Virol.** 61: p. 201-207, 2000.

WYLES, D.L.; PATEL, A.; MADINGER, N.; BESSESEN, M.; KRAUSE, P.R.; WEINBERG, A. Development of herpes simplex virus disease in patients who are receiving cidofovir. **Clin. Infect. Dis.** 41: p. 676–680, 2005.