

Clarissa Feltrin

**Desenvolvimento e aplicação de um sistema celular repórter para herpes simplex virus e padronização de uma PCR quantitativa para poliomavírus BK**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Thaís C. M. Sincero.

**Florianópolis**

**2014**

**Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.**

Feltrin, Clarissa

Desenvolvimento e aplicação de um sistema celular repórter para herpes simplex virus e padronização de uma PCR quantitativa para poliomavírus BK. / Clarissa Feltrin; orientadora, Thais Cristine Marques Sincero - Florianópolis, SC, 2014.

171 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Sistema repórter. 3. Herpes simplex virus. 4. Reação em cadeia da polimerase quantitativa. 5. Poliomavírus. I. Sincero, Thais Cristine Marques. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

Clarissa Feltrin

**Desenvolvimento e aplicação de um sistema celular repórter para herpes simplex vírus e padronização de uma PCR quantitativa para poliomavírus BK**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Biociências, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Florianópolis, \_\_\_\_\_ de março de 2014.

---

Prof. Dr. Marcelo Maraschin  
Coordenador do Curso

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Thaís Cristine Marques Sincero  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Cláudia Santos da Silva  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia Hermes Stoco  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Paulo César Peregrino  
Universidade Federal de Minas Gerais



*Dedico este trabalho a todas as  
pessoas com problemas de saúde, que  
alimentadas pela vontade de viver  
superam obstáculos diariamente.*



## AGRADECIMENTOS

A vida é movida por vontades, por desejos, por sonhos e é isso que nos estimula a dar o primeiro passo em busca de um objetivo. Os objetivos podem ser diferentes para cada um de nós, mas muitos dos caminhos até eles se cruzam, nos dando a oportunidade de não caminharmos sós. Talvez, a realização do sonho ou a conquista do objetivo não possua tamanha preciosidade como a do que é recebido dos que nos acompanham. Por isso, quero agradecer muito aos que estiveram ao meu lado durante esta trajetória e que contribuíram para o meu crescimento.

Agradeço aos que me auxiliaram no começo da iniciação científica e do mestrado, em especial à Jéssica Bertol, Caroline Rigotto, Annelise de Carvalho, Marina Rodrigues e Francielle Cardozo. Agradeço aos colegas e amigos, Carlos Quiroz, Naira Schneider, Gislaíne Fongaro, Izabella da Silva, Thiago Caon, Lucas Marostica, Vanessa Moresco e Jadel Kratz pelas contribuições, ideias e sugestões, que ajudaram a enriquecer este trabalho. Agradeço também, aos alunos de iniciação científica pela alegria que trazem para o nosso dia a dia e pela colaboração, principalmente à Maria Lidia Ribeiro, Lara Persich e Natália Damazo.

O meu agradecimento aos parceiros de outros laboratórios e instituições pela cooperação, empréstimo de equipamentos e reagente, por serem muito prestativos e atenciosos. Agradeço aos professores e alunos do Laboratório de Protozoologia, em especial à Ana Gruending, Débora Lückemeyer e Patrícia Stoco; ao Laboratório de Biologia Molecular e Micobactéria, principalmente à Lisléia Golfeto; aos funcionários do LAMEB, Denis Dall Agnolo, Vanessa Silva e Bibiana Sgorla; ao professor Eduardo Dalmarco do Laboratório de Imunologia Clínica e à professora Ana Franco da UFRGS. Agradeço ao HEMOSC e à Andrea Petry, pela boa vontade em separar as amostras utilizadas neste trabalho e a Renata de Oliveira e demais funcionários do Hospital Universitário da UFSC pela disponibilidade. Agradeço ao programa de pós-graduação e a CAPES pela bolsa concedida.

Minha gratidão aos professores da UFSC que de algum modo colaboraram com este trabalho, pelos ensinamentos, pelas dúvidas tiradas até mesmo pelos corredores e por cederem materiais e reagentes. Um agradecimento especial às professoras Cláudia Simões e Célia Barardi por me receberem no LVA de braços abertos e me tratarem com o mesmo carinho que tratam seus orientandos. Saibam que foi uma

alegria fazer parte do LVA como filha adotiva ou neta científica, como vocês mesmas dizem.

Agradeço a todos os colegas e amigos, sobretudo aos do LVA, por compartilharem não apenas os dias de trabalho, mas também momentos de descontração, cafés, sucos, cachorros-quentes ou até mesmo uma sopa instantânea nas noites de inverno na sala dos estudantes. Destes momentos tiramos o riso que nos alegra, a ideia que nos anima, o conselho que nos acalma e a amizade que nos fortalece. Muito obrigada também às pessoas que me apoiaram, incentivaram e fizeram orações, saibam que todos os “calma, vai dar certo!” foram muito importantes e renovavam minhas energias para que eu continuasse nos momentos de dificuldade.

Quero deixar um agradecimento mais do que especial à professora Thaís, minha orientadora. Serei eternamente grata por ter aberto as portas do mundo acadêmico para mim, agradeço por ter sido sempre tão compreensiva, paciente e gentil mesmo quando os resultados não saiam como esperado. Agradeço por todo o conhecimento que você generosamente me passou e por acreditar em mim e no meu trabalho. Tive o prazer de ser sua primeira orientanda e tenho certeza que os demais alunos que virão estarão em excelentes mãos.

Não poderia deixar de agradecer aos meus tios, Carmem e Waldy e à minha prima Hanna por me acolherem durante tantos anos na sua casa e me tratarem como filha e irmã. Saibam que as conversas, o apoio e o carinho foram fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui. Meu obrigada também aos demais familiares que torceram e transmitiram boas energias para que eu pudesse realizar este trabalho.

Agradeço aos meus amados pais, Maria Eliza e Luiz Antônio, por todos os valores que me passaram, pela educação que me deram, por me amarem e sempre me encorajarem a buscar meus sonhos. Saibam que vocês são a razão pela qual eu respiro e a força que me faz sempre seguir em frente. Amo muito vocês.

Por fim, agradeço a Deus e a todas as formas de energia que partem dele por me presentear diariamente com inúmeras graças, por me proteger e colocar pessoas tão especiais no meu caminho.

Finalizo essa fase da minha vida satisfeita com o que colhi durante a caminhada e com uma boa bagagem de conhecimentos não apenas científicos, mas de vida. Levarei para sempre com muito carinho esses ensinamentos para seguir em busca de novas jornadas.

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”*

*Albert Einstein.*



## RESUMO

Pacientes imunodeprimidos podem apresentar infecções virais com evolução rápida, sintomatologias atípicas graves e muitas vezes fatais, sendo fundamental um diagnóstico precoce para estabelecimento do tratamento efetivo, redução da toxicidade e da resistência aos antivirais. HSV-1, HSV-2 e poliomavírus BK são vírus de importância clínica para imunodeprimidos e podem levar a rejeição de órgãos em transplantados. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um sistema celular repórter, utilizando a proteína fluorescente GFP, para HSV-1 e 2 e implantar uma qPCR utilizando amostras clínicas de pacientes transplantados renais para detecção de poliomavírus BK. O sistema celular repórter foi construído através da transfecção de células Vero com o vetor pZsGreen1-1 ligado ao promotor ICP10 (F3R3 e F4R3) da RR1 do HSV-2. A regulação da expressão da GFP via ICP10 é dependente da infecção viral e acontece por meio da proteína viral transativadora VP16 e de fatores celulares Oct-1 e HCF-1. A efetividade do sistema foi avaliada por infecção viral e pela aplicação de antivirais (Aciclovir, ácido gálico, convalotoxina e extrato de *Uncaria sp.*) e candidatos antivirais inativos (Extrato de *Passiflora edulis* e derivados de cardenólídeos). O sistema repórter F4R3 ZsGreen1-1 expressou GFP em função da infecção por HSV-1 e 2, a qual foi detectada por microscopia de fluorescência e/ou citometria de fluxo. Em análise por citometria de fluxo, a fluorescência do sistema repórter correlacionou-se diretamente com os títulos virais (MOI de  $4,0 \times 10^{-3}$  a  $3,3 \times 10^{-4}$ , ou seja, 1 partícula viral a cada 250 a 3000 células), o sistema manteve a capacidade de expressão da GFP na presença de agentes sem propriedade antiviral e não expressou fluorescência quando tratado com antivirais. O sistema F4R3 ZsGreen1-1 mostrou-se um sistema funcional com possíveis aplicações para diagnóstico clínico, para elaboração de testes de resistência aos antivirais e para a pesquisa de novos medicamentos. A qPCR para poliomavírus BK foi implantada utilizando amostras de DNA cedidas pelo HEMOSC com iniciadores dirigidos para o antígeno T viral. O limite de detecção foi de 18 cópias genômicas/ reação com quantificações variando entre  $9,8 \times 10^5$  a  $6,7 \times 10^7$  cópias genômicas/ mL. A qPCR foi efetiva para análises de amostras clínicas e apresentou limite de detecção suficiente para avaliação de risco de nefropatia em transplantados renais.

**Palavras-chave:** Sistema celular repórter. Herpes simplex virus. qPCR. Poliomavírus BK.



## ABSTRACT

Immunosuppressed patients can present viral infections with fast evolution, severe atypical symptomatology and often fatal, being essential the early diagnosis for the establishment of effective treatments, reduction of toxicity and development of resistance to antiviral. HSV-1, HSV-2 and polyomavirus BK are virus of clinical importance for immunosuppressed and can lead to the rejection of transplanted organs. Therefore, the aim of this work was to develop a reporter cellular system, using the fluorescent protein GFP, for HSV-1 and 2, and deploy a qPCR using clinical samples from patients submitted to renal transplant, for the detection of polyomavirus BK. The reporter cellular system was constructed through the transfection of Vero cells with the vector pZsGreen1-1 connected to the promoter ICP10 (F3R3 and F4R3) of the RR1 of the HSV-2. The regulation of the expression of GFP via ICP10 is dependent of the viral infection and happens through the viral transactivating protein VP16, and the cellular factors Oct-1 and HCF-1. The effectivity of the system was evaluated by viral infection and through the application of antiviral (Acyclovir, gallic acid, convalotoxina and extract of *Uncaria sp.*) and inactive antiviral candidate (Extract of *Passiflora edulis* and derivatives cardenolide). The reporter system F4R3 ZsGreen1-1 expressed GFP as a function of the infection for HSV-1 and 2, which was detected by fluorescence microscopy and/or flow cytometry. In flow cytometry, the fluorescence of the reporter system was directly correlated with virus titers (MOI 4,0 x10<sup>-3</sup> to 3,3 x10<sup>-4</sup>, that is, 1 viral particle to each 250 to 3000 cells), the system maintained the ability to GFP expression in the presence of agents without antiviral property and no expressed fluorescence when treated with antivirals. The system F4R3 ZsGreen1-1 revealed a functional system with possible applications for clinical diagnosis, elaboration of tests of resistance to the antiviral and for new drugs research. The qPCR to polyomavirus BK was deployed using DNA samples provided by HEMOSC with primers directed to the viral antigen T. The limit of detection was 18 genome copies /reaction with quantification ranging between 9.8 x 10<sup>5</sup> to 6.7 x 10<sup>7</sup> genome copies /mL. The qPCR was effective for the analyses of clinical samples and presented enough sensitivity for risk evaluation of nephropathy in renal transplant.

**Keywords:** Cellular system reporter. Herpes simplex virus. qPCR. Polyomavirus BK.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura I. 1:</b> Ilustração esquemática da morfologia das partículas virais dos HSV .....	37
<b>Figura I. 2:</b> Ilustração esquemática da replicação viral dos HSV .....	40
<b>Figura I. 3:</b> Ilustração esquemática do estabelecimento da latência e reativação dos HSV nas células do sistema nervoso. ....	43
<b>Figura I. 4:</b> Ilustração esquemática da região promotora ICP10.....	62
<b>Figura I. 5:</b> Ilustração esquemática do vetor comercial pZsGreen1-1 (Clontech).....	63
<b>Figura I. 6:</b> Eletroforese dos produtos da PCR F3R3 e F4R3 em gel de agarose .....	74
<b>Figura I. 7:</b> Imagem ilustrativa de células transfectadas durante o processo de seleção com G418.....	75
<b>Figura I. 8:</b> Eletroforese em gel de agarose mostrando produtos de PCR obtido a partir de DNA plasmidial extraído de células transfectadas .....	76
<b>Figura I. 9:</b> Autofluorescência e morfologia celular apresentada por células ICP10 ZsGreen1-1 48 h após a preparação das placas ....	77
<b>Figura I. 10:</b> Imagem representativa de células autofluorescentes em cavidades com diferentes concentrações celulares 48 h após a preparação das placas .....	79
<b>Figura I. 11:</b> Disposição dos núcleos das células autofluorescentes F4R3 ZsGreen1-1 coradas com Hoechst .....	80
<b>Figura I. 12:</b> Células fluorescentes circundando o efeito citopático produzido pelo HSV-2.....	83
<b>Figura I. 13:</b> Fluorescência apresentada por células F4R3 ZsGreen1-1, não infectadas, em diversas concentrações celulares e em diferentes tempos .....	86
<b>Figura I. 14:</b> Avaliação da média da intensidade de fluorescência apresentada por células F4R3 ZsGreen1-1, não infectadas, em diversas concentrações celulares e em diferentes tempos por citometria de fluxo .....	87
<b>Figura I. 15:</b> Imagens por microscopia óptica - campo claro das células F4R3 ZsGreen1-1 em diferentes concentrações 24 h após a preparação das placas. ....	88
<b>Figura I. 16:</b> <i>Dot plot</i> ilustrando a área selecionada (-□-) para análise estatística dos grupos celulares avaliados. ....	89
<b>Figura I. 17:</b> <i>Dot plots</i> demonstrando a área selecionada para a construção dos histogramas.....	90

<b>Figura I. 18:</b> Avaliação, por citometria de fluxo, da média da intensidade de fluorescência após infecção das células Vero não transfectadas com HSV-2.....	93
<b>Figura I. 19:</b> Representação por histogramas (FITC x n° de eventos) dos resultados obtidos por citometria de fluxo para as células Vero não transfectadas e infectadas com HSV-2.....	94
<b>Figura I. 20:</b> Avaliação, por citometria de fluxo, da média da intensidade de fluorescência após infecção das células Vo (ZsGreen1-1) com HSV-2.....	95
<b>Figura I. 21:</b> Representação por histogramas (FITC x n° de eventos) dos resultados obtidos por citometria de fluxo para as células Vo (ZsGreen1-1) infectadas com HSV-2.....	96
<b>Figura I. 22:</b> Avaliação, por citometria de fluxo, da média da intensidade de fluorescência das células F3R3 – ZsGreen1-1 após infecção com HSV-2.....	98
<b>Figura I. 23:</b> Representação por histogramas (FITC x n° de eventos) dos resultados obtidos por citometria de fluxo para as células F3R3 ZsGreen1-1 infectadas com HSV-2 .....	99
<b>Figura I. 24:</b> Avaliação, por citometria de fluxo, da média de intensidade da fluorescência após infecção das células F4R3 – ZsGreen1-1 com HSV-2 .....	100
<b>Figura I. 25:</b> Representação por histogramas (FITC x n° de eventos) dos resultados obtidos por citometria de fluxo para as células F4R3 ZsGreen1-1 infectadas com HSV-2 .....	101
<b>Figura I. 26:</b> Avaliação, por citometria de fluxo, da média da intensidade de fluorescência após infecção das células F4R3 – ZsGreen1-1 com HSV-1 .....	105
<b>Figura I. 27:</b> Representação por histogramas (FITC x n° de eventos) dos resultados obtidos por citometria de fluxo para as células F4R3 ZsGreen1-1 infectadas com HSV-1 .....	106
<b>Figura I. 28:</b> Viabilidade das células F4R3 ZsGreen1-1 expostas por 48 e 2 h à diferentes amostras clínicas.....	110
<b>Figura I. 29:</b> Comportamento da média da intensidade de fluorescência em células F4R3 ZsGreen1-1 submetidas a diferentes tratamentos antivirais .....	114
<b>Figura I. 30:</b> Comportamento da média da intensidade de fluorescência em células F4R3 ZsGreen1-1 submetidas à diferentes tratamentos com compostos e extrato sem atividade antiviral .....	116

<b>Figura I. 31:</b> Comportamento da média da intensidade de fluorescência em células F4R3 ZsGreen1-1 submetidas ao tratamento com hidroxipuréia 0,2 mM.....	118
<b>Figura II. 1:</b> Imagem ilustrativa da estrutura viral dos poliomavírus.....	126
<b>Figura II. 2:</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% para os produtos de PCR AT132 obtidos com os iniciadores BKF e BKR..	143
<b>Figura II. 3:</b> Produto de PCR obtido com os iniciadores M13F e M13R. ....	144
<b>Figura II. 4:</b> Curva padrão obtida com DNA plasmidial extraído dos clones bacterianos recombinantes.....	145
<b>Figura II. 5:</b> Picos indicando a temperatura de <i>melting</i> obtida para os padrões de reação da qPCR.....	146
<b>Figura II. 6:</b> Picos resultantes da amplificação de AT132 a partir de amostras clínicas.....	146
<b>Figura II. 7:</b> Curva de <i>melting</i> resultante de qPCR de amostras clínicas.....	147



## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro I. 1:</b> Herpesvírus causadores de doenças em humanos .....	36
<b>Quadro I. 2:</b> Medicamentos utilizados para o tratamento das infecções causadas pelos HSV, mecanismo de ação e toxicidade.....	52
<b>Quadro I. 3:</b> Iniciadores dirigidos para a região ICP10 do gene da RR1 do HSV-2 .....	61
<b>Quadro I. 4:</b> Concentração dos reagentes utilizados nas PCRs .....	64
<b>Quadro I. 5:</b> Particularidades das reações de ligação (Vi e Vo) .....	66
<b>Quadro I. 6:</b> Antivirais testados no sistema repórter usando células F4R3 ZsGreen1-1 frente à infecção com HSV-2 .....	72
<b>Quadro I. 7:</b> Candidatos inativos testados no sistema repórter usando células F4R3 ZsGreen1-1 frente a infecção com HSV-2.....	73
<b>Quadro II. 1:</b> Sequências dos iniciadores BKF e BKR.....	137
<b>Quadro II. 2:</b> Sequência de iniciadores universais M13.....	138



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela I. 1:</b> Concentrações virais, em diferentes unidades, utilizadas para infecção celular. ....	91
<b>Tabela II. 1:</b> Dados da avaliação de amostras clínicas por qPCR com SYBR Green. ....	151



## LISTA DE ABREVIATURAS

°C: Graus Celsius  
ACV: Aciclovir  
Ag T: Antígeno T  
Ag t: Antígeno t  
AG: Ácido Gálico  
Aids: Síndrome da imunodeficiência adquirida  
AT132: Produto de PCR- Antígeno T do poliomavírus BK  
ATCC: *American Type Culture Collection*  
C16: β-metildigoxina  
C20: Epi-digitoxigenina 3α-OH  
C22: 21-O-malonil-desoxicorticosterona  
CC: Controle celular  
CC50: Concentração Citotóxica 50%  
CDS: *Coding Sequence*  
CI50: Concentração Inibitória 50%  
CMV: Citomegalovírus  
CNV: Convalotoxina  
CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono  
C<sub>q</sub>: *Quantification cycle*  
CV: Controle viral  
DEPC: Dietilpirocarbonato  
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
DMSO: Dimetilsulfóxido  
dNTP: Deoxinucleotídeos trifosfato  
E: *Early* - Genes ou proteínas precoces  
E2F: Fator de transcrição E2F  
EBV: Vírus Epstein-Barr  
EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético  
F3R3: Produto de PCR obtido com os iniciadores F3 + R3  
F4R3: Produto de PCR obtido com os iniciadores F4 + R3  
FACS: *Fluorescence Activated Cell Sorting*  
FDA: *Food and Drug Administration*  
FITC: Isotiocianato de fluoresceína  
FSC: *Forward Scatter*  
G418: Geneticin<sup>®</sup>  
gB: Glicoproteína B  
gC: Glicoproteína C  
gD: Glicoproteína D

GFP: *Green Fluorescent Protein*  
gH: Glicoproteína H  
gL: Glicoproteína L  
H1N1: Vírus influenza A subtipo H1N1  
H5N1: Vírus influenza A subtipo H5N1  
HCF-1: *Host Cell Factor -1*  
HEMOSC: Hemocentro de Santa Catarina  
HHV-6: *Human herpesvirus 6*  
HHV-7: *Human herpesvirus 7*  
HHV-8: *Human herpesvirus 8*  
HIV: *Human Immunodeficiency Virus*  
HSV: Herpes Simplex Virus  
HSV-1: Herpes Simplex Virus tipo 1/ *Human herpesvirus 1*  
HSV-2: Herpes Simplex Virus tipo 2/ *Human herpesvirus 2*  
HVEM: *Herpes Virus Entry Mediator*  
ICP10: *Infected Cell Protein 10*  
IE: *Immediate Early* - Genes ou proteínas imediatas  
IgG: Imunoglobulina G  
IgM: Imunoglobulina M  
INF: Interferon  
IRL: *Internal Repeat Long*  
IRS: *Internal Repeat Short*  
L: *Late*: Genes ou proteínas tardias  
LAT: *Latency Associated Transcripts*  
LB: Meio de cultura Luria-Bertani  
LMP: Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva  
LVA: Laboratório de Virologia Aplicada  
MEM: *Minimum Essential Medium Eagle*  
MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de magnésio  
MOI: *Multiplicity Of Infection*  
mRNA: Ácido ribonucléico mensageiro  
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazólio  
NGF: *Nerve Growth Factor*  
NK: *Natural Killer Cells*  
Oct-1: *Octamer binding protein-1*  
Oct-2: *Octamer binding protein-2*  
ORF: *Open Reading Frames*  
PASS: Extrato de *Passiflora edulis*  
pb: Pares de base  
PBS: *Phosphate Buffered Saline*  
PCR: *Polymerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia da Polimerase

qPCR: *Quantitative Polymerase Chain Reaction* - Reação em cadeia da polimerase quantitativa  
pH: Potencial hidrogeniônico  
PM: Padrão de peso molecular  
pRB: Proteína do Retinoblastoma  
PS: Solução contendo penicilina, estreptomicina  
PSA: Solução contendo penicilina, estreptomicina e anfotericina  
miRNA: Micro ácido ribonucléico  
RR1: Subunidade 1 da Ribonucleotídeo Redutase  
SFB: Soro Fetal Bovino  
Sp1: *Specificity Protein 1*  
SSC: *Side Scatter*  
TBE: Tampão Tris-Borato-EDTA  
Tm: Temperatura de *melting*  
TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral -  $\alpha$   
TRL: *Terminal Repeat Long*  
TRS: *Terminal Repeat Short*  
UFP/ml: Unidade Formadora de Placa por mililitro  
UFP: Unidade Formadora de Placa  
UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina  
UL: *Unique Long*  
UL38: Gene codificante de proteína de capsídeo  
UL39: Gene codificante da ribonucleotídeo redutase  
UNAIDS: *Joint United Nations Programme on HIV / AIDS*  
URF: Unidades Relativas de Fluorescência  
US: *Unique Short*  
UT7: Extrato de *Uncaria sp.*  
UV: Ultravioleta  
V: Volts  
Vero: Fibroblastos de rim de macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*)  
VHS: *Virion Host Shut-off*  
Vi: Vetor - inserto  
VIC: *VP16 - Induced complex forming domain*  
Vo: Vetor pZsGreen1-1 religado  
VP: *Viral protein*  
VZV: *Human herpesvirus 4*  
 $\alpha$ - TIF:  $\alpha$  - *Trans Inducing Factor*



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	29
<b>Capítulo I - DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE UM SISTEMA CELULAR REPÓRTER PARA HERPES SIMPLEX VIRUS</b>	
<b>I.1 HERPESVÍRUS</b> .....	35
I.1.1 Histórico .....	35
I.1.2 Classificação .....	35
I.1.3 Morfologia .....	36
I.1.4 Ciclo viral .....	38
I.1.5 Infecção .....	44
I.1.6 HSV X Imunodeprimidos .....	46
I.1.7 Diagnóstico .....	49
I.1.8 Tratamento, toxicidade e resistência.....	51
I.1.9 Sistema repórter, GFP e detecção .....	54
<b>I.2 OBJETIVOS</b> .....	58
I.2.1 Objetivo geral .....	58
I.2.2 Objetivos específicos .....	58
<b>I.3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	59
I.3.1 Células e cultura celular.....	59
I.3.2 Vírus e titulação viral.....	59
I.3.3 Construção do sistema repórter.....	60
I.3.4 Autofluorescência celular e análise de interferentes .....	68
I.3.5 Disposição dos núcleos em células autofluorescentes .....	68
I.3.6 Análise da fluorescência basal .....	69
I.3.7 Indução do sistema repórter através da infecção viral .....	69
I.3.8 Testes de viabilidade celular com amostras clínicas.....	70
I.3.9 Testes com antivirais e candidatos antivirais inativos .....	71
I.3.10 Indução do sistema repórter pela Hidroxiuréia .....	73
I.3.11 Análise estatística.....	73
<b>I.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	74
I.4.1 Construção do sistema repórter.....	74
I.4.2 Seleção das células transfectadas.....	74
I.4.3 Confirmação da transfecção por PCR e sequenciamento.....	75
I.4.4 Autofluorescência celular e análise de interferentes .....	76
I.4.5 Morfologia das células autofluorescentes .....	79
I.4.6 Indução do sistema repórter: avaliação por microscopia de fluorescência .....	82

I.4.7	Fluorescência celular: avaliação em leitor de fluorescência.....	84
I.4.8	Fluorescência celular: avaliação por citometria de fluxo.....	87
I.4.9	Indução do sistema repórter por HSV-2: avaliação por citometria de fluxo .....	88
I.4.10	Indução do sistema repórter por HSV-1: avaliação por citometria de fluxo .....	103
I.4.11	Testes de viabilidade celular com amostras clínicas.....	108
I.4.12	Testes com antivirais e candidatos antivirais inativos .....	111
I.4.13	Testes com hidroxiuréia.....	116
<b>I.5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>120</b>
<b>I.6</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>121</b>
<b>Capítulo II - IMPLANTAR UMA PCR QUANTITATIVA PARA POLIOMAVÍRUS BK</b>		
<b>II.1</b>	<b>POLIOMAVÍRUS</b> .....	<b>125</b>
II.1.1	Histórico .....	125
II.1.2	Classificação .....	125
II.1.3	Morfologia .....	125
II.1.4	Ciclo viral.....	126
II.1.5	Infecção .....	128
II.1.6	Poliomavírus X Imunodeprimidos .....	129
II.1.7	Diagnóstico .....	131
II.1.8	Tratamento .....	132
II.1.9	PCR em tempo real.....	132
<b>II.2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>135</b>
II.2.1	Objetivo geral.....	135
II.2.2	Objetivos específicos.....	135
<b>II.3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>136</b>
II.3.1	Amostras .....	136
II.3.2	Produção dos padrões.....	136
II.3.3	Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR).....	139
<b>II.4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>142</b>
II.4.1	Amostras .....	142
II.4.2	Produção do inserto.....	142
II.4.3	Transformação e seleção dos clones recombinantes .....	143
II.4.4	qPCR utilizando SYBR Green. ....	144
II.4.5	Análise das amostras clínicas .....	148
<b>II.5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>152</b>
<b>II.6</b>	<b>PERSPECTIVA</b> .....	<b>153</b>
<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....		<b>154</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....		<b>155</b>

## **INTRODUÇÃO**

Na primeira metade do século XIX, Jacob Henle formulou a hipótese de que existiriam agentes infecciosos, causadores de doenças específicas, tão diminutos que não poderiam ser visualizados com o uso de um microscópio de luz. Apoiados na hipótese de Henle vários estudiosos empenharam-se em desenvolver o conhecimento sobre estes pequenos e intrigantes agentes, atualmente conhecidos como vírus (LEVINE; ENQUIST, 2007). Os vírus são partículas infecciosas que necessitam de componentes celulares do seu hospedeiro para replicação. Estruturalmente, são compostos por ácido nucleico envolto por uma capa proteica denominada capsídeo. Alguns vírus ainda possuem um envelope formado por lipoproteínas, que envolve o nucleocapsídeo e contém glicoproteínas ou fosfolipídeos com atividade antigênica (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

Entre os estudiosos que ampliaram o saber na área da virologia, destacam-se Adolf Mayer, Dimitri Ivanovsky e Martinus Beijerinck, os quais realizaram importantes descobertas envolvendo o vírus do mosaico do tabaco. Estas descobertas foram determinantes para se desvendar as principais características dos vírus como sua propriedade infecciosa, a capacidade de transmissão de um organismo para outro, a impossibilidade de serem filtrados da mesma forma que as bactérias e sua marcante propriedade de replicação apenas em tecidos vivos (CANN, 2005; FLINT et al., 2000; LEVINE; ENQUIST, 2007; OLDSTONE, 2010). Posteriormente a estes estudos, Friedrich Loeffler e Paul Frosch observaram que um agente semelhante ao causador do mosaico do tabaco era responsável por doenças em animais, e em 1901 o primeiro vírus causador de doença em humanos foi identificado, o vírus da febre amarela (CANN, 2005; FLINT et al., 2000).

Embora as descobertas que impulsionaram o desenvolvimento da virologia tenham acontecido a partir do século XIX, nas civilizações egípcias e greco-romanas já havia registros da ocorrência de doenças virais (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008). Os vírus estão presentes há milênios e distribuídos no mundo todo, sendo as infecções virais as causas mais comuns de doenças humanas. Muitas destas enfermidades levaram a mudanças profundas no cenário mundial ao longo da história. Durante a guerra hispano-americana, por exemplo, e durante o período de construção do canal do Panamá, inúmeras pessoas morreram devido à febre amarela, que se espalhou ainda no século XV nas regiões tropicais

## Introdução 30

causando epidemias devastadoras (FLINT et al., 2000; OLDSTONE, 2010). A varíola (Smallpox) levou a óbito aproximadamente 300 milhões de pessoas no século XX e o sarampo, na década de 1960, deixou 400 mil mortos e mais de 2000 crianças com lesões cerebrais graves (OLDSTONE, 2010). A gripe espanhola, causada pelo vírus influenza, levou a morte em torno de 20 milhões de pessoas só entre 1918 e 1919, matando mais do que a própria primeira guerra mundial (FLINT et al., 2000).

Mesmo que algumas das enfermidades infecciosas, que assombraram o passado, tenham sido erradicadas e métodos preventivos e de tratamento eficazes tenham sido desenvolvidos, as pandemias e epidemias virais ainda preocupam o mundo todo. Recentemente, os vírus influenza A, subtipos H1N1 e H5N1, agentes etiológicos da gripe A (suína e aviária), estiveram em foco em virtude da letalidade de até 60% em humanos (ROTHBERG; HAESSLER; BROWN, 2008). Além de doenças tipicamente epidêmicas, como as causadas pelo vírus influenza, outras doenças estão continuamente surgindo, adotando um caráter mais agressivo ou sendo descobertas. Como exemplo, pode-se destacar a Aids (Síndrome da imunodeficiência adquirida) causada pelo HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), que em meados da década de 1980 passou a ganhar espaço na área médico - científica e com ela as doenças oportunistas, incluindo as virais (DAWOOD et al., 2009).

A associação entre as infecções oportunistas e os portadores do HIV/Aids acontece devido ao caráter imunodepressor desta enfermidade, que impede o sistema imunológico de atuar em defesa do paciente. Entretanto, o estado imunológico deficiente não é característica única de pacientes portadores do HIV/Aids, mas também de outros indivíduos como os transplantados, que por uso de imunomoduladores apresentam um sistema de defesa comprometido. O fortalecimento da prática dos transplantes e o contínuo aumento no número de procedimentos devem-se muito ao desenvolvimento dos medicamentos supressores imunológicos. Como exemplo, a ciclosporina desenvolvida na década de 70, que impactou significativamente na redução da mortalidade entre os transplantados. Conseqüentemente, nas últimas décadas o número de imunodeprimidos aumentou em função não só da Aids, mas também da imunomodulação farmacológica necessária para receptores de transplantes (ABTO, 2012; BOREL et al., 1976; MIES et al., 2005).

Os transplantados, além de estarem mais expostos a doenças oportunistas também são submetidos a procedimentos invasivos, que

ampliam as chances de aquisição de enfermidades infecciosas (CLAUSS et al., 2013). As infecções virais oportunistas mais comuns em pacientes imunodeprimidos são causadas por poliomavírus (JC e BK), vírus sincicial respiratório, herpesvírus, adenovírus, entre outros agentes (BERRINGTON et al., 2009; CHONG; KIM; CHO, 2010; CLARIDGE et al., 2012; RIZZA et al., 2011; WU et al., 2013; YAMAGUCHI et al., 2010). A alta prevalência conjunta dos diversos vírus tanto nos receptores como nos doadores de transplantados implica no aumento não apenas das chances de desenvolvimento de doenças, mas também na ocorrência de rejeição do enxerto por ação direta ou indireta dos vírus (ADAMS et al., 2003; SELIN et al., 2006).

Embora os transplantados necessitem de maior atenção em relação às doenças oportunistas, o transplante de órgãos e tecidos, atualmente, é uma alternativa terapêutica relativamente segura e eficaz para o tratamento de diversas doenças, determinando a melhoria na qualidade e na perspectiva de vida dos pacientes (NOGARA et al., 2009). O número de transplantes vem aumentando no Brasil e a posição do país apresenta destaque nas estatísticas mundiais. Conforme o registro brasileiro de transplantes do ano de 2012, o Brasil ocupava o segundo lugar em número absoluto de transplantes renais e hepáticos, entre 31 países, perdendo apenas para os Estados Unidos e estando a frente de países como Alemanha, França e Espanha. Apenas em Santa Catarina o número de transplantes renais passou de 89 em 2005 para 245 em 2012 e o de fígado de 34 em 2005 para 112 no ano de 2012. Mesmo assim, até setembro de 2013 mais de 28000 pacientes encontravam-se na lista de espera por um transplante no Brasil (ABTO, 2012).

Outros indivíduos também podem estar em estado de imunodepressão como os em uso de corticoterapia, neonatos, neutropênicos crônicos, idosos, ou até mesmo pacientes sujeitos à imunodepressão fisiológica associada à gravidez e ao ciclo menstrual (LUPI; LAMY; SEMENOVITCH, 2010). Nos diversos grupos de maior risco as enfermidades virais possuem uma grande variabilidade clínica, atribuída a diversos fatores como os intrínsecos ao agente causal, ao ambiente e às diferenças imunológicas particulares do hospedeiro (CASANOVA; ABEL, 2013). A associação da atividade protetora e destrutiva do sistema imunológico é que responde pelos sinais e sintomas apresentados pelo paciente durante as infecções (OLDSTONE, 2010). Assim, os acometidos podem apresentar as mais diversas manifestações clínicas, sendo muitas delas graves como meningite

## Introdução 32

asséptica, encefalite ou meningoencefalite ou até mesmo manifestações fatais (MOHAN, 2010). As infecções progridem rapidamente em imunodeprimidos e é fundamental o diagnóstico precoce para auxiliar na orientação da terapia adequada minimizando interações medicamentosas e toxicidade (FISHMAN, 2013).

Como os imunodeprimidos, de forma geral, possuem maior risco de adquirir infecções virais, apresentar manifestações graves e os transplantes renais e hepáticos são os que despontam na lista dos transplantes no país (ABTO, 2012), neste trabalho serão abordados três vírus que participam do grupo de agentes que causam infecções agressivas nestes pacientes, o Herpes Simplex Virus 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) e o poliomavírus BK. Para melhor entendimento o trabalho foi dividido em dois capítulos. Para os vírus HSV-1 e 2 desenvolveu-se um sistema celular repórter que pode auxiliar no diagnóstico, escolha da terapia adequada e desenvolvimento de novos medicamentos (Capítulo I). Para o poliomavírus BK implantou-se uma qPCR (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*) utilizando amostras de material genético obtidas de sangue total de pacientes transplantados renais para possível aplicação na clínica (Capítulo II).

## **Capítulo I**

# **DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE UM SISTEMA CELULAR REPÓRTER PARA HERPES SIMPLEX VIRUS**



## I.1 HERPESVÍRUS

### I.1.1 Histórico

Nas tábuas sumérias de cerca de 3000 a.C e no Papiro de Ebers datado de 1500 a.C já eram documentadas lesões muito características de infecções provocadas pelos HSV. Hipócrates em 460 a.C descreveu as úlceras herpéticas causadas pelos HSV e denominou as lesões de herpes em alusão ao termo grego “herpein”, que significa rastejar/réptil, em associação as características destas lesões. Celsius e Galeno também descreveram algumas ulcerações sugestivamente causadas por herpesvírus, porém, o caráter infeccioso da herpes só foi comprovado em 1873 por Vidal.

A capacidade de reativação dos HSV foi descrita por Andrews e Carmichael em 1930 e as diferenças entre os HSV foram demonstradas por Nahmias e Dowdle em 1968. Estes estudos, entre outros, possibilitaram o conhecimento das características fenotípicas e posteriormente genotípicas, bem como o desenvolvimento de terapias antivirais para o HSV-1 e 2 disponíveis hoje para o tratamento das infecções herpéticas (FERREIRA, 2010; LEVINE; ENQUIST, 2007; SANTOS et al., 2008).

### I.1.2 Classificação

Os herpesvírus não infectam apenas humanos, mas outros mamíferos, aves, peixes, anfíbios e moluscos, podendo alguns infectar múltiplas espécies. Mais de 200 vírus são classificados como pertencentes à família *Herpesviridae*, contudo apenas oito são conhecidamente causadores de doenças em humanos (FERREIRA, 2010; LUPI et al., 2010; SANTOS et al., 2008). Os oito vírus que infectam humanos são: Herpes simplex virus 1 e 2, responsáveis basicamente por lesões labiais, orofaciais e genitais; o vírus da Varicela-Zoster, causador da catapora/varicela; o vírus Epstein-Barr, que provoca a mononucleose infecciosa, síndromes hematológicas e processos oncogênicos; o Citomegalovírus, que causa infecções mononucleose-like; os Herpesvírus 6 e 7, responsáveis pelo exantema súbito e o Herpesvírus 8, associado ao sarcoma de Kaposi (LUPI et al., 2010).

Os oito vírus da família *Herpesviridae* são classificados em subfamílias (*Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae*, *Gamaherpesvirinae*) com base na análise genética de uma glicoproteína conservada do envelope viral chamada glicoproteína H (gH) (SANTOS et al., 2008). A classificação em subfamílias pode ser observada no

## Capítulo I – Revisão bibliográfica 36

Quadro I. 1. Entre os vírus que acometem humanos será dado destaque para os HSV em função dos quais foi construído um sistema repórter discutido e detalhado no decorrer deste trabalho.

**Quadro I. 1:** Herpesvírus causadores de doenças em humanos.

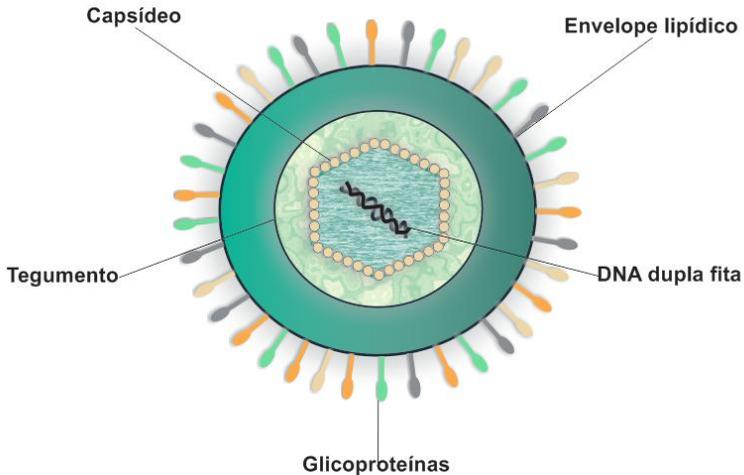
Nomenclatura	Sinônimos	Siglas	Subfamília
<i>Human herpesvirus 1</i>	Vírus herpes simples tipo 1	HHV-1 ou HSV-1	<i>Alphaherpesvirinae</i>
<i>Human herpesvirus 2</i>	Vírus herpes simples tipo 2	HHV-2 ou HSV-2	<i>Alphaherpesvirinae</i>
<i>Human herpesvirus 3</i>	Vírus da Varicela-Zoster	HHV-4 ou VZV	<i>Alphaherpesvirinae</i>
<i>Human herpesvirus 5</i>	Citomegalovírus	HHV-5 ou CMV	<i>Betaherpesvirinae</i>
<i>Human herpesvirus 6</i>	Roseolovírus ou vírus linfotrópico humano	HHV-6	<i>Betaherpesvirinae</i>
<i>Human herpesvirus 7</i>	Roseolovírus	HHV-7	<i>Betaherpesvirinae</i>
<i>Human herpesvirus 4</i>	Vírus Epstein-Barr	HHV-4 ou EBV	<i>Gamaherpesvirinae</i>
<i>Human herpesvirus 8</i>	Herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi	HHV-8	<i>Gamaherpesvirinae</i>

Fonte: Adaptado de ICTV; LUPI et al, 2010; 2012; MARKLE, 2013.

### I.1.3 Morfologia

As partículas virais do HSV-1 e 2 (Figura I. 1) têm forma esférica, com diâmetro variando aproximadamente entre 186 nm e 225 nm, incluindo as espículas do envelope viral. O capsídeo é icosaédrico formado por 162 capsômeros (150 hexaméricos e 12 pentaméricos) e composto por quatro proteínas virais (VP5, VP26, VP23 e VP19). O tegumento abriga em torno de 20 proteínas, entre elas proteínas importantes para o ciclo de replicação viral como a VP16 (*Viral protein 16*) e a VHS (*Virion Host Shut-off*). Envolvendo essa estrutura e o material genético há um envelope formado por camadas lipídicas contendo glicoproteínas como a gB, gC, gD e gE inseridas na superfície (LUPI et al., 2010; SANTOS et al., 2008).

**Figura I. 1:** Ilustração esquemática da morfologia das partículas virais dos HSV.



Fonte: A autora baseada em SANTOS et al., 2008.

Os HSV contém um DNA dupla fita linear com tamanho entre 150 e 153 Kpb. O genoma dos HSV -1 e 2 possui similaridade estrutural de 40%, enquanto as sequências das regiões codificantes possuem 83% de homologia. Essas características explicam a semelhança biológica entre os HSV bem como as reações imunológicas cruzadas dos sorotipos (SANTOS et al., 2008; WHO, 2013). O genoma dos HSV é dividido em duas seções “U” unidas covalentemente, denominadas UL (*Unique Long*) e US (*Unique Short*), cada uma flanqueada por sequências invertidas (TRL, IRL e IRS, TRS). A região UL codifica 56 proteínas diferentes, entre elas enzimas de replicação do DNA e proteínas estruturais (CANN, 2005; SANTOS et al., 2008).

O genoma viral possui aproximadamente 84 potenciais sequências de leitura aberta (*open reading frames* ou ORFs), as quais codificam em torno de 100 proteínas constituintes da estrutura viral como as pertencentes ao envelope, ao capsídeo, ao tegumento e a outras proteínas não estruturais. O maior número de proteínas em relação às ORFs deve-se a capacidade de alguns RNAs mensageiros (mRNAs) produzirem mais de uma proteína e às modificações pós-traducionais, como a autoclivagem proteica. Entre todas as proteínas, uma em

## Capítulo I – Revisão bibliográfica 38

particular possui grande importância para o estabelecimento da replicação viral. Essa proteína arranja o tegumento do vírion, juntamente com cerca de outras 19 proteínas, é conhecida como VP16,  $\alpha$  – TIF ( $\alpha$  – *trans-inducing factor*) ou  $V_{mw}$  65 e tem potencial de transativação de genes  $\alpha$ . A VP16 será discutida com maiores detalhes no item a seguir (SANTOS et al., 2008).

### I.1.4 Ciclo viral

#### - Replicação

Os vírus HSV são transmitidos por contato direto de indivíduo para indivíduo e infectam células como fibroblastos, células do tecido escamoso e mucoso, células polarizadas do epitélio cilíndrico, células gliais e terminações nervosas (ROIZMAN, BERNARD; KNIPE; WHITLEY, 2007; SANTOS et al., 2008).

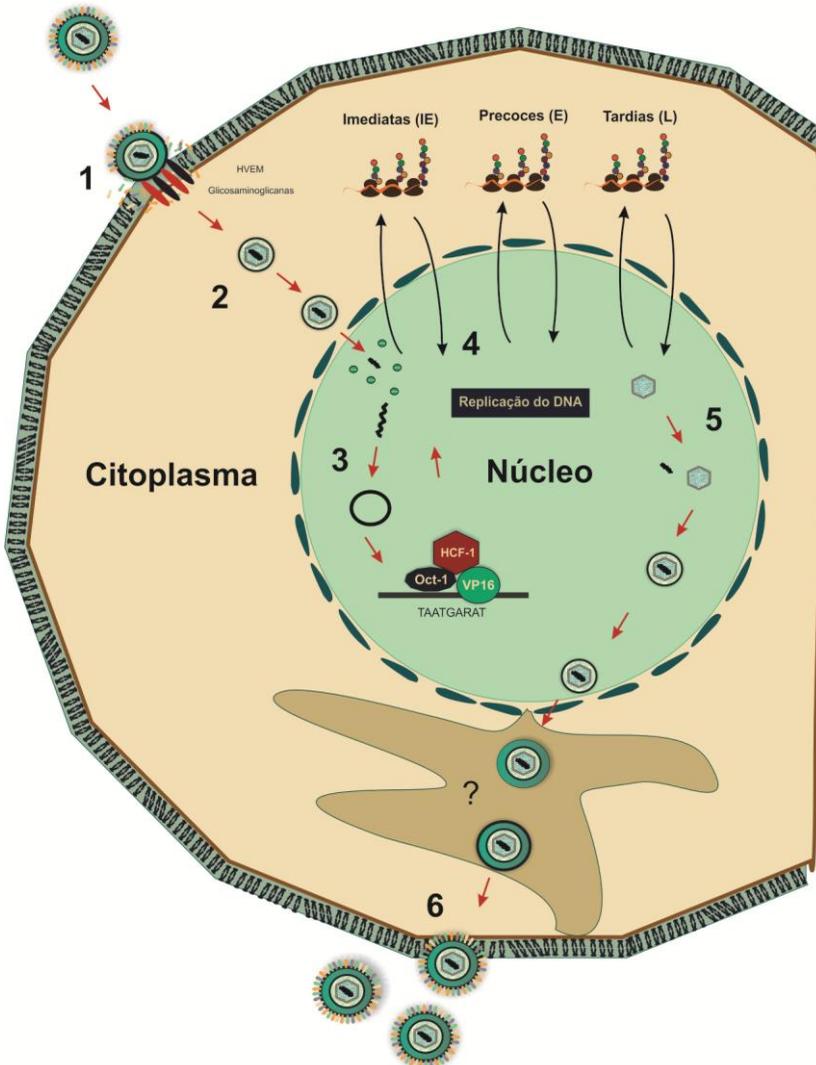
A entrada das partículas virais nas células pode ocorrer por dois mecanismos, endocitose ou fusão com a membrana celular. Para fusão com as células, as partículas virais precisam primeiramente adsorver na superfície celular do hospedeiro. A adsorção ocorre por influência mútua entre glicoproteínas virais e as glicosaminoglicanas celulares como o sulfato de heparana, sulfato de condroitina e sulfato de dermatana. As glicoproteínas do envelope viral gC e gB interagem com receptores de sulfato de heparana, logo a proteína gD forma uma ligação estável com os receptores HVEM (*Herpes Virus Entry Mediator*), nectinas e sulfato de heparana 3 - O - sulfatado ocorrendo uma alteração conformacional de gD, que possibilita a interação dos heterodímeros gH/gL resultando na penetração viral por fusão com a membrana celular (Figura I. 2/1) (ROIZMAN, B.; WHITLEY, 2013; SANTOS et al., 2008).

A fusão do envelope viral tem como consequência a liberação do capsídeo, que se dirige para o poro nuclear onde o DNA viral é internalizado no núcleo e sofre circularização. A proteína de tegumento VP16 se encaminha da mesma forma para o núcleo, levando a expressão de genes responsáveis pela produção das proteínas  $\alpha$ , as primeiras proteínas a serem sintetizadas no ciclo lítico em um processo organizado em três fases. A expressão das proteínas  $\alpha$  independe da síntese de novo, sendo produzidas a partir da ativação de genes denominados *Immediate early* (IE) ou imediatos. Por meio da regulação exercida pelas proteínas  $\alpha$  são produzidas as proteínas  $\beta$ , da segunda fase, via ativação de genes *Early* (E) ou precoces. Na última fase do ciclo são traduzidas proteínas responsáveis pela estruturação das novas partículas virais em consequência da ativação dos genes *Late* (L) ou tardios (Figura I. 2/2, 3

e 4) (FERREIRA, 2010; ROIZMAN, B.; WHITLEY, 2013; WHITLEY; KIMBERLIN; ROIZMAN, 1998).

Os genes IE codificam mRNA para cinco proteínas  $\alpha$  transativadoras reguladoras da transcrição viral. Os genes E codificam um conjunto de proteínas composto majoritariamente de proteínas não estruturais reguladoras, que agem no metabolismo do DNA viral e por algumas proteínas estruturais menores. Os genes L, por fim, geram proteínas estruturais que irão constituir as novas partículas virais (CANN, 2005).

Figura I. 2: Ilustração esquemática da replicação viral dos HSV.



Fonte: A autora baseada em ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007.

Assim, a ativação da transcrição dos genes IE é um fator determinante para o desenvolvimento do ciclo viral lítico e a proteína de tegumento VP16 é fundamental na indução dos eventos da replicação

viral subsequentes. A deleção de vários domínios de ativação na proteína VP16 mostrou que mutações específicas diminuem consideravelmente a eficiência de infecção do HSV-1 em modelo murino, o que fortalece a importância da participação da proteína VP16 na replicação viral (TAL-SINGER et al., 1999).

A VP16 é incorporada ao tegumento no final do ciclo de replicação, durante a montagem das novas partículas virais. Quando liberada nas células do hospedeiro a VP16 forma com fatores celulares um complexo denominado “complexo induzido por VP16” (VIC). O VIC regula a indução dos genes IE, responsáveis pelo primeiro passo do desenvolvimento do ciclo lítico como já descrito. A formação do complexo se dá com dois fatores celulares HCF-1 (*Host Cell Factor*) e Oct-1 (*octamer binding protein-1*). O HCF-1 é um fator abundante em células humanas, ligado à cromatina celular e que atua em vias da proliferação, da progressão do ciclo e da diferenciação celular (DELEHOZEE et al., 2005; WYSOCKA; HERR, 2003). O fator Oct-1 é um fator de transcrição bastante versátil, possuindo diferentes papéis na regulação da transcrição celular por sua capacidade de ligação ao DNA e sua habilidade de associação com coreguladores. Primeiramente a VP16 liga-se ao HCF-1, depois ao Oct-1 e à região regulatória do genoma viral proporcionando a ativação transcricional dos genes IE por conter na região C-terminal um potente domínio de ativação. Essas proteínas celulares tem a função de auxiliar na estabilização da VP16 para o reconhecimento do sítio TAATGARAT do genoma viral, presente em todas as regiões promotoras nas quais o VIC atua (WHITLEY et al., 1998; WILSON; MOHR, 2012; WYSOCKA; HERR, 2003).

Após este procedimento sequencial de transcrição e expressão proteica finamente regulado e efetuado pela RNA polimerase II, ocorre a montagem e liberação das novas partículas virais das células (Figura I. 2/5 e 6). A saída das partículas do citoplasma não é bem compreendida, mas são discutidos alguns modelos explicativos. Um dos modelos sugere que os nucleocapsídeos recebem um envoltório primário na membrana nuclear interna e perdem o envelope na membrana externa. A partir deste processo recebem um envoltório em membranas citoplasmáticas e são transportados por vesículas para a liberação no espaço extracelular. Um segundo modelo afirma que o nucleocapsídeo é envolto na membrana nuclear interna, forma uma vesícula com a membrana nuclear externa e é carregado para a membrana plasmática de onde é liberado. Um terceiro modelo sugere ainda que o nucleocapsídeo sai dos núcleos através dos seus poros, ganha um envoltório por

## Capítulo I – Revisão bibliográfica 42

geminção em vesículas citoplasmáticas e é transportado para a membrana para liberação (ROIZMAN, BERNARD et al., 2007).

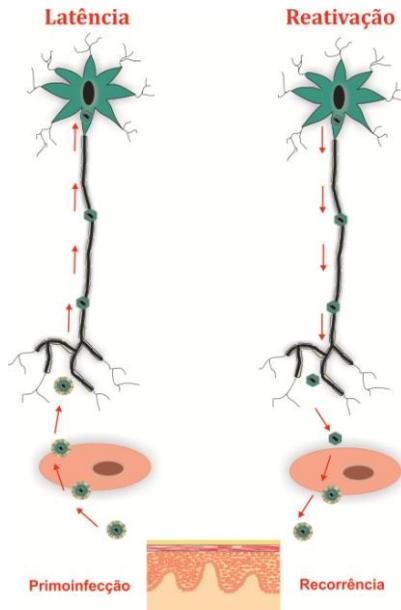
Todo esse complexo processo de replicação, que acontece desde a adsorção dos vírus nas células até a sua liberação, ocorre em um período de tempo relativamente curto, em torno de 18 horas após infecção das células em um ciclo lítico (WHITLEY et al., 1998).

### **- Latência**

Ao entrar no ciclo lítico, os vírus comprometem a estrutura celular levando as células à morte, porém ao estabelecer latência os vírus podem residir silenciosamente no organismo do hospedeiro por longos períodos. A escolha de ingresso em um ciclo lítico ou o estabelecimento da latência é realizada por um conjunto de interações entre o vírus e as células, nas quais também estão envolvidos a proteína viral VP16 e os fatores celulares Oct-1 e HCF-1. A escolha das duas contrastantes estratégias de infecção acarretam diferentes programas de expressão com objetivos opostos (WILSON; MOHR, 2012; WYSOCKA; HERR, 2003). As vias, no entanto, podem atuar concomitantemente em um mesmo hospedeiro, pois o vírus pode permanecer latente em algumas células e proliferando ativamente em outras, até mesmo na ausência de sintomatologia (SANTOS et al., 2008).

O estabelecimento da latência ocorre logo após a infecção primária nos gânglios sensoriais do hospedeiro. Os HSV possuem tropismo por queratinócitos e neurônios, sendo os queratinócitos células permissivas e os neurônios pouco permissivos à replicação viral. Favorecido pela baixa permissividade dos neurônios, estas células são os sítios escolhidos pelos HSV para a firmação de latência. Os gânglios sacrais e trigeminais são os principais locais de latência, mas outros gânglios paravertebrais podem servir de epicentro (Figura I. 3) (KRISTIE; LIANG; VOGEL, 2010; LUPI et al., 2010).

**Figura I. 3:** Ilustração esquemática do estabelecimento da latência e reativação dos HSV nas células do sistema nervoso.



**Fonte:** A autora baseada em ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2006.

A latência consiste na permanência do vírus em um estado não replicativo nas células, com presença de genoma viral e ausência de infecção produtiva. Durante esse período, apenas uma parte do genoma permanece sendo transcrito sob o comando do promotor do LAT (*Latency Associated Transcripts*). A fração codificante do LAT fica nas regiões invertidas TRL e IRL do genoma viral e sua ação durante a latência não é muito bem compreendida, parecendo estar mais interligada à reativação viral e ação antiapoptótica nos neurônios do que à latência. Possivelmente, a latência pode resultar de uma regulação negativa da expressão dos genes IE com envolvimento do LAT e de miRNAs supressores (CLEMENTS; BROWN, 1997; EGAN et al., 2013; LUPI et al., 2010; NICOLL; PROENCA; EFSTATHIOU, 2012).

Existem algumas hipóteses sobre o porquê os vírus estabelecem latência nas células nervosas. A latência nos neurônios poderia estar associada ao fato do HCF-1 se acumular no citoplasma celular e ser transportado para o núcleo apenas em situações de estresse (KOLB;

## Capítulo I – Revisão bibliográfica 44

KRISTIE, 2008). Poderia estar ligada também ao transporte do capsídeo para o núcleo sem a proteína VP16, pois assim a indução dos genes IE não ocorreria e conseqüentemente não haveria produção das proteínas  $\beta$  e  $\gamma$  para prosseguir a infecção lítica. O silenciamento do genoma neste caso aconteceria em alguns dias exceto para o LAT e alguns miRNAs (ROIZMAN, B.; WHITLEY, 2013).

Para a reativação dos vírus, obviamente seria necessária a existência de algum gatilho que induzisse a expressão dos genes  $\alpha$ , visto que na hipótese apresentada as proteínas desencadeadoras do processo (VP16 e HCF-1) não estariam disponíveis nos neurônios. Nesse caso, algumas proteínas celulares poderiam efetuar a etapa inicial da expressão gênica. Em estudos *in vitro* a proteína NGF (*Nerve Growth Factor*), por exemplo, quando bloqueada, influencia a expressão dos genes do processo replicativo dos HSV e também as concentrações do LAT e dos miRNAs. Na ausência de NGF, que acontece em situações como lesões em nervos, os genes virais passam a ser expressos de forma caótica, sem a expressão sequencial particular da replicação viral dos HSV, havendo depleção nas quantidades do LAT e dos miRNAs (ROIZMAN, B.; WHITLEY, 2013). Essa associação com NGF poderia ser explicada pela presença de uma proteína correlata à Oct-1 nos neurônios, a Oct-2 (*Octamer binding protein-2*). A Oct-2 tem atividade inibitória da transcrição dos genes IE, impedindo a reativação viral. Os neurônios nos quais predominam a presença de Oct-2 têm como característica a dependência do fator de crescimento neural (NGF). A redução do NGF leva a um predomínio da proteína Oct-1 em relação à Oct-2, nos neurônios dependentes, o que poderia atuar como uma via alternativa de regulação e de desencadeamento da reativação dos HSV (LUPI et al., 2010).

A reativação dos vírus latentes, em termos não moleculares, pode acontecer por estresse físico ou emocional, febre, danos teciduais, imunodepressão ou exposição aos raios ultravioletas. A exposição aos raios ultravioletas reduz a resposta linfocitária à quimiotaxia, afeta o número e a função de células dendríticas e, por isso, favorece a reativação. A interrupção da latência gera a recorrência da replicação viral com o aparecimento das lesões líticas ou apresentações clínicas atípicas (KRISTIE et al., 2010; LUPI et al., 2010; PATEL et al., 2011; WHITLEY et al., 1998).

### **I.1.5 Infecção**

As infecções causadas pelos herpesvírus têm por característica serem infecções pandêmicas e crônicas. Os HSV afetam populações de

regiões urbanas até as regiões mais remotas em todo o mundo, sendo os humanos seus únicos reservatórios (GUPTA; WARREN; WALD, 2007; LUPI et al., 2010). A primoinfecção sintomática acontece em cerca de 10 a 30% dos casos e normalmente é benigna, ocorrendo quadros de febre, mialgia, cefaléia e o aparecimento das lesões características da herpes como máculas eritematosas evoluindo para vesículas agrupadas no sítio anatômico da inoculação (face ou região genital). A primoinfecção maligna acontece em pacientes imunodeprimidos, nos quais as manifestações são mais graves e duradouras, podendo surgir sintomatologia sistêmica (LUPI et al., 2010; PATEL et al., 2011; WHO, 2013).

A infecção primária pelo HSV-1 ocorre normalmente na infância ou adolescência e a transmissão se dá pelo contato e pela saliva. A transmissão não é efetuada somente em casos de lesões visíveis com derramamento viral, mas também quando há derramamento viral em infecções subclínicas. As lesões causadas pelo HSV-1 se formam tipicamente na face, mais especificamente em torno dos lábios (PATEL et al., 2011).

A primoinfecção pelo HSV-2 acontece majoritariamente a partir do início da vida sexual, sendo esta a doença sexualmente transmissível mais comum e a principal causa mundial de úlceras genitais obtidas sexualmente (GUPTA et al., 2007; LUPI et al., 2010). A infecção pelo HSV-2 gera lesões vesiculares ou necrotizantes na região genital como do cervix, vagina, vulva e região peniana (HERTZ et al., 2010; MOHAN, 2010). O herpes genital pode também ser causado pelo HSV-1, porém a taxa de recorrência é comumente menor nessas situações, quando comparada com as infecções causadas pelo HSV-2. Da mesma forma, o HSV-2 pode causar herpes labial, com reativação menos frequente do que quando causada pelo HSV-1 (LUPI et al., 2010; PATEL et al., 2011).

Próximo de 70 a 90% das pessoas com infecção sintomática pelo HSV-2 e de 20 a 50% dos indivíduos com infecção sintomática pelo HSV-1 apresentará recorrência ainda no primeiro ano pós-infecção, sendo essa recorrência relativamente frequente, em especial nos imunodeprimidos (WHO, 2013).

Em países economicamente desenvolvidos 20% dos adolescentes já foram infectados com o HSV-1 e de 60 a 80% dos adultos até 50 anos já entraram em contato com o vírus. Em países em desenvolvimento, no entanto, 50% dos indivíduos que atingiram a maioridade e 90 a 100% dos indivíduos de meia idade já foram infectados com o HSV-1. Conforme um estudo do CDC (*Centers for Disease Control and*

## Capítulo I – Revisão bibliográfica 46

*Prevention*), com norte-americanos de 14 a 49 anos, a soroprevalência para HSV-2 foi de 16,2 %. Dos pacientes com soroprevalência positiva 81,1% nunca haviam recebido diagnóstico de infecção. Entretanto, essas porcentagens podem ser muito mais altas, chegando de 60 a 90% para o HSV-2 em pacientes HIV/Aids (CDC, 2010; ROIZMAN, B.; WHITLEY, 2013; WHO, 2013).

### I.1.6 HSV X Imunodeprimidos

As infecções por HSV não possuem um comportamento benigno, ao contrário do que normalmente é inferido. A aparente benignidade esta muito mais associada à capacidade imunológica do hospedeiro do que a ausência de patogenicidade dos vírus. Por esse motivo, pacientes imunodeprimidos exibem, não raramente, infecções mais prevalentes, mais graves e com desenvolvimento de sintomatologias atípicas (GUPTA et al., 2007; LUPI et al., 2010). A variabilidade sintomática acontece também em função de uma característica particular dos vírus, a de produzir diferentes doenças no mesmo hospedeiro (MOHAN, 2010).

Anticorpos específicos para os HSV, células mononucleares e linfócitos atuam na remissão da herpes, mas não impedem as recorrências (LUPI et al., 2010). O sistema imunológico lança mão de várias estratégias para reprimir a infecção viral, como revisado por Egan e colaboradores (2013). A infecção pelos vírus HSV-1, por exemplo, leva a liberação de INF (interferon), ativador do sistema imunológico inato. Os macrófagos ativados secretam mais INF e também citocinas, enquanto os neutrófilos e células NK (*Natural killer*) induzem a apoptose e fagocitose de células infectadas a fim de controlar o espalhamento viral. As células dendríticas, por sua vez, secretam citocinas inflamatórias e apresentam antígenos para as células do sistema adaptativo, composto por linfócitos B e T (CD4+ e CD8+). Os linfócitos CD8+ induzem a apoptose nas células infectadas por liberação de grânulos contendo granzimas, perforinas e granulisinas ou via sinalização de receptores de morte, sendo fundamentais no controle da infecção viral (EGAN et al., 2013).

O sistema imunológico também auxilia na manutenção da latência viral, inibindo a expressão de proteínas da primeira fase do ciclo de replicação viral. A expressão de genes da fase inicial em neurônios parece ser detectada pelas células CD8+ fazendo com que seja liberado INF  $\gamma$  e granzimas B, que tem potencial ação repressora, não deixando os vírus replicarem. Desequilíbrio no mecanismo de supressão exercido pelas células CD8+ contribui para a reativação viral, por isso a imunossupressão esta tão associada à reativação de infecções causadas

pelos HSV (EGAN et al., 2013; FREEMAN et al., 2007). Além da reativação, imunodeprimidos podem ser infectados pelo HSV no próprio ambiente hospitalar, durante procedimentos clínicos como transfusão de hemoderivados, por exemplo, por recebimento de um enxerto de doador infectado, ou por infecções comunitárias (FISHMAN, 2013).

São descritos na literatura sinais e sintomas variáveis decorrentes de infecções por HSV em imunodeprimidos, como alterações neurológicas, febre, lesões cutâneas, mialgia, síndrome séptica (hipotensão e taquicardia), dispneia, falência respiratória, falência hepática e apresentações clínicas diversas como ceratoconjuntivite, encefalite, meningite, hepatite, pneumonia e infecções com envolvimento de órgãos viscerais entre outras (BERRINGTON et al., 2009; CHAILLON et al., 2012; CHONG et al., 2010; CLARIDGE et al., 2012; MOLTON; SPELMAN, 2012; YAMAGUCHI et al., 2010). Alguns dos grupos em maior risco de apresentar estas manifestações atípicas são os de pacientes HIV/Aids, neonatos, gestantes, idosos, pacientes com neoplasias e transplantados.

O número de indivíduos atualmente infectados pelo HIV é relativamente alto. Conforme dados da UNAIDS (*Joint United Nations Programme on HIV / AIDS*), em 2012 eram 35,3 milhões de pessoas vivendo com o vírus e 1,6 milhões de mortos em consequência da Aids no mesmo ano (DAWOOD et al., 2009; UNAIDS, 2012). Por ambos os vírus, HIV e HSV, serem causadores de doenças sexualmente transmissíveis, a coinfeção não é incomum. Além da debilidade imunológica dos indivíduos HIV/Aids proporcionar a reativação dos HSV, pacientes soronegativos com pré - infecções pelo HSV-2 tem risco reforçado de aquisição do HIV. Isso acontece porque algumas ulcerações causadas pelo HSV-2, às vezes microscópicas, fornecem uma porta de entrada para o HIV (CDC, 2010; WHO, 2013; YUDIN; KAUL, 2008). O HSV-2 pode também potencializar o processo de deterioração imunológica em portadores do HIV funcionando não apenas como uma doença definidora da Aids, mas também agravando o estado geral do paciente e influenciando na taxa de replicação do HIV por ativação dos linfócitos e disponibilização de células para infecção (LUPI et al., 2010; WHO, 2013).

Os neonatos compõem outro grupo em risco de desenvolvimentos de infecções fatais causadas pelos HSV. (KNEZEVIC et al., 2007). Conforme um estudo inglês, com 989 pacientes durante um período de vinte anos, a infecção disseminada por HSV no período neonatal foi a causa de morte em 90% dos casos das infecções por este vírus. Nessa mesma pesquisa as infecções por HSV foram identificadas como o

## Capítulo I – Revisão bibliográfica 48

motivo de óbito mais comum no período neonatal, respondendo por 40% do total de mortes por infecções virais e podendo apresentar-se muito precocemente e levando a sequelas neurológicas graves nos recém-nascidos (WILLIAMS, E. J. et al., 2013). Normalmente, a transmissão das infecções herpéticas para os recém-nascidos se dá durante o parto, mas pode ser transmitida de uma criança para outra nos berçários, pelos profissionais da saúde, pelos familiares com infecções assintomáticas e por via placentária. Muitas vezes a infecção não é percebida nas gestantes, o que favorece a transmissão para os bebês. Cerca de 50% dos casos de herpes neonatal ocorrem em mulheres com ausência de sintomatologia de herpes genital durante o parto, sendo maior o risco de transmissão para o neonato nas gestantes que se infectam no último trimestre de gravidez (LUPI et al., 2010). Os HSV não são nocivos apenas para os recém-nascidos, como já exposto, mas também para as gestantes, pois casos de hepatite fulminante causada por HSV estão descritos na literatura em grávidas (THURMAN et al., 2010).

Idosos e pacientes com neoplasias também são indivíduos que podem apresentar manifestações atípicas causadas por infecções pelos HSV. (CHAILLON et al., 2012; SEVILLA et al., 2004). Em pacientes com neoplasias, além da condição imunológica proporcionada por alguns cânceres, certas medicações quimioterápicas antitumorais tem atividade imunossupressora, como exemplo, os citostáticos empregados no tratamento de neoplasias de linhagens hematopoiéticas (LORENZI, 2006; LUPI et al., 2010; YAMAGUCHI et al., 2010).

Por fim, destaca-se o grupo dos transplantados que podem desenvolver complicações como a encefalite herpética. A encefalite é uma das manifestações clínicas que expõem os enfermos a um alto risco de morte (AMENÁBAR et al., 2006). Encefalite por HSV não é incomum em transplantados, sendo uma complicação grave que resulta em mortalidade em torno de 70% dos casos quando não tratada. A encefalite pode também deixar sequelas graves como deficiência motora, crises convulsivas, alterações cognitivas e de memória (HERTZ et al., 2010).

As infecções virais em transplantados exercem um efeito direto sobre o enxerto e/ou efeitos indiretos resultantes das alterações imunológicas apresentadas pelo hospedeiro em consequência da infecção, podendo resultar na rejeição de órgãos. A associação entre rejeição de enxertos e infecções virais é explicada pela possibilidade de haver reações imunológicas cruzadas que envolvem as células T. Quando uma célula T CD8+ específica para um vírus reage de forma

cruzada com alo-antígenos é desencadeada a ativação dos linfócitos T CD8+ contra o alo-antígeno, o que induz a rejeição do órgão transplantado. Se há reação cruzada de linfócitos que reconhecem antígenos virais contra um tecido alogênico, uma infecção viral pode proporcionar a ativação de linfócitos contra o tecido/órgão enxertado. Essa ativação de células T CD8+ alo-específica também favorece a rejeição ou distúrbios de função e manutenção do enxerto (ADAMS et al., 2003; BREHM et al., 2010; SELIN et al., 2006).

Da mesma forma que os pacientes imunodeprimidos, pacientes imunocompetentes também podem sofrer infecções virais que evoluem para doenças graves e fatais. Em um estudo com indivíduos com viremia para HSV, 60% dos imunodeprimidos analisados morreram durante o início da hospitalização, mas o mesmo ocorreu com 33% dos pacientes imunocompetentes (BERRINGTON et al., 2009). Assim, a importância das infecções por HSV não se restringe aos imunodeprimidos, mas se estende também aos pacientes imunocompetentes, que podem, por motivos variados, apresentar infecções mais graves e até fatais.

### **I.1.7 Diagnóstico**

As apresentações atípicas resultantes de infecções pelo HSV muitas vezes confundem o diagnóstico clínico, que busca apoio em análises laboratoriais para a tomada de decisões e escolha do tratamento. Muitos pacientes, no entanto, acabam perdendo a vida em consequência de um diagnóstico incorreto ou tardio (CLARIDGE et al., 2012; RIZZA et al., 2011). Assim, destaca-se a importância de um diagnóstico correto e precoce, possível apenas com a disponibilização de metodologias ou combinações de metodologias laboratoriais que cubram da melhor forma possível os vieses das técnicas de análises clínicas.

O diagnóstico em imunodeprimidos é mais delicado do que para pacientes imunocompetentes, pois muitas técnicas não são efetivas para esse grupo de indivíduos. A sorologia nem sempre é eficiente, pois os imunodeprimidos não possuem uma resposta imunológica convencional. Enfermos com infecção primária, mesmo com apresentação de lesões podem ter sorologia negativa e, quando positiva, esta não é suficiente para determinar o local da infecção (HERTZ et al., 2010). As infecções recorrentes, mesmo em imunocompetentes, muitas vezes não causam aumento significativo na concentração de anticorpos, o que impede o diagnóstico sorológico. A baixa quantidade de anticorpos no líquido limita o uso da sorologia também para diagnosticar as encefalites (DOMINGUES et al., 2000; FRISCH; GUO, 2013).

## Capítulo I – Revisão bibliográfica 50

Gestantes, fisiologicamente sob imunodepressão, quando infectadas no terceiro trimestre podem ter sorologia negativa até o momento do parto, expondo o neonato ao risco de infecção mais facilmente. Quanto aos neonatos, é difícil saber se os anticorpos IgG encontrados são da mãe ou do bebê. Assim, apenas anticorpos IgM podem ser considerados. O diagnóstico tardio em recém-nascidos aumenta o risco de mortalidade e de sequelas, mesmo quando o indivíduo é tratado. As infecções por HSV nestes pacientes, não raramente, são confundidas com sepse bacteriana e quando realizado o diagnóstico correto, já há complicações graves e irreversíveis com acometimento de múltiplos órgãos (LUPI et al., 2010).

Limitações são apresentadas por outras técnicas como as citológicas. O esfregaço de Tzank, por exemplo, possui baixa sensibilidade e especificidade com pouco valor nas lesões ulceradas e não vesiculares, com a desvantagem de não diferenciar VZV e HSV. Para a interpretação de resultados de citologia, ainda, é indispensável a análise por uma equipe treinada (FRISCH; GUO, 2013; HERTZ et al., 2010; WHO, 2013).

Os testes de imunofluorescência, que aplicam anticorpos monoclonais e microscopia no ultravioleta (UV) não são vantajosos, pois possuem baixa sensibilidade como a apresentada pela imunofluorescência direta, que é de apenas 60% quando comparada ao isolamento viral. A imunofluorescência é uma metodologia de execução demorada, trabalhosa e não é facilmente padronizada (CAVINESS et al., 2010; WHO, 2013).

O padrão-ouro para diagnóstico dos HSV é a cultura de células, que apresenta alta especificidade (aproximadamente 100%) e excelente sensibilidade dependendo do tipo de material utilizado. A sensibilidade chega a 95% para espécime obtido de úlceras, acima de 90% para lesões e de 70 a 80% para *swabs*. A desvantagem é o tempo de análise que pode chegar a 7 dias com as técnicas convencionais (HERTZ et al., 2010; WHO, 2013). Por isso, para driblar a questão do tempo, técnicas de biologia molecular como a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) são muito utilizadas. As desvantagens dessa técnica, quando utilizado DNA viral, está no fato de a detecção de um genoma viral aleatório não apontar necessariamente o agente da sintomatologia, além de a presença do genoma viral não indicar existência de vírus com capacidade de infecção. Outra preocupação com o uso da PCR são as contaminações durante as análises, que podem gerar resultados falso-positivos (SANTOS et al., 2008; SINGH et al., 2005; WHO, 2013).

Algumas outras metodologias são utilizadas para diagnóstico das infecções por HSV, mas muitas vezes há necessidade do uso de mais de uma técnica além de exames de imagem e avaliação clínica detalhada para efetiva comprovação dos agentes responsáveis pelos sinais e sintomas clínicos.

### **I.1.8 Tratamento, toxicidade e resistência**

Os medicamentos mais utilizados no tratamento das infecções herpéticas por HSV são o aciclovir, o valaciclovir, o penciclovir, o ganciclovir, o cidofovir e o foscarnet. O mecanismo de ação e a toxicidade apresentada por estes medicamentos podem ser visualizados no quadro I. 2 (CDC, 2010; EVANS; KUDESIA; MCKENDRICK, 2013; LUPI et al., 2010; RANG et al., 2007).

**Quadro I. 2:** Medicamentos utilizados para o tratamento das infecções causadas pelos HSV, mecanismo de ação e toxicidade.

Medicamento	Mecanismo de ação	Toxicidade	Referências
<b>Aciclovir</b>	Inibição da DNA polimerase.	Em altas doses pode causar nefrotoxicidade e encefalopatia.	(EVANS et al., 2013; RANG et al., 2007; STRASFELD; CHOU, 2010)
<b>Valaciclovir</b>	Pró-fármaco do aciclovir - Inibidor da DNA polimerase.	Microangiopatia trombótica em imunocomprometidos e efeito mielossupressor, especialmente neutropênico.	(CLERCQ, 2008; MOFENSON et al., 2009; STRASFELD; CHOU, 2010; VIGIL; CHEMALY, 2010)
<b>Penciclovir/ fanciclovir</b>	Potente inibidor da DNA polimerase.	Náuseas, diarreia, urticária e alucinações. Alguns estudos com animais demonstraram atividade tumorigênica e alterações de fertilidade e, em estudos <i>in vitro</i> , foi relatada propriedade mutagênica.	(BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; EVANS et al., 2013; LUPI et al., 2010)
<b>Ganciclovir</b>	Inibidor competitivo da DNA polimerase e incorporado na cadeia de DNA viral resultando no seu término.	Possui importante toxicidade para a medula óssea e tem potencial carcinogênico.	(EVANS et al., 2013; RANG et al., 2007)

<b>Cidofovir</b>	Inibidor competitivo da incorporação de nucleotídeos pela DNA polimerase.	Toxicidade para o trato gastrointestinal, rins e causador de irritações tóxicas e neutropenia.	(CLERCQ, 2008; EVANS et al., 2013; FRISCH; GUO, 2013; STRASFELD; CHOU, 2010)
<b>Foscarnet</b>	Inibidor da DNA polimerase, sendo efetivo na destruição de vírus sem timidina cinase.	Anormalidades eletrolíticas e nefrotoxicidade.	(BRUNTON et al., 2012; EVANS et al., 2013; MOFENSON et al., 2009; RANG et al., 2007; STRASFELD; CHOU, 2010)

## Capítulo I – Revisão bibliográfica 54

Além da toxicidade apresentada pelos fármacos com atividade anti-HSV existe o inconveniente da resistência aos antivirais. A resistência é incrementada pelo uso da terapia profilática para minimizar o risco de infecções oportunistas (WU et al., 2013). O uso profilático não favorece apenas o surgimento da resistência entre os HSV, mas também entre outros vírus, o que resulta na redução do arsenal farmacológico para o tratamento das infecções virais.

A resistência ao aciclovir é documentada na literatura principalmente em pacientes imunodeprimidos. Assim como para o aciclovir, os demais fármacos antivirais comumente utilizados estão sujeitos à resistência. Até mesmo o foscarnet, que é efetivo contra vírus com resistência em decorrência de mutações relacionadas à timidina cinase, pode ser inútil em situações em que há mutações na DNA polimerase (ANDREI et al., 2007; BRUNTON et al., 2012; SINGH et al., 2005). A resistência pode ocorrer para vários medicamentos ao mesmo tempo, pois em um único paciente podem ser encontradas várias subpopulações virais com diferentes tipos de resistência (ANDREI et al., 2013).

Atualmente, todos os medicamentos licenciados para o tratamento de infecções herpéticas por HSV possuem um único alvo, que é a DNA polimerase. Entretanto, é fundamental perceber que um número considerável de outros mecanismos podem ser alvos interessantes de novos antivirais, e que a evolução no desenvolvimento de medicamentos, menos tóxicos e com baixa resistência cruzada, na área da virologia, é de suma importância frente ao panorama do fortalecimento das infecções virais oportunistas (CAON et al., 2014; STRASFELD; CHOU, 2010).

Conhecendo-se as dificuldades de tratamento, métodos de imunização seriam interessantes para prevenir as infecções causadas pelos HSV. Vacinas utilizando vírus mortos, glicoproteínas antigênicas e vacinas gênicas foram pesquisadas ou permanecem em estudo e desenvolvimento, porém resultados controversos, durabilidade curta, custo e vacinas ainda em fases iniciais de testes são empecilhos atualmente para a disponibilização de um método de imunização funcional (LUPI et al., 2010).

### **I.1.9 Sistema repórter, GFP e detecção**

Um sistema repórter permite o estudo e monitoramento de processos celulares através da inserção de sequências genômicas específicas em células. Estas sequências codificam proteínas facilmente mensuráveis que tem expressão controlada por sinalização celular

(GRIMM, 2004; IRO et al., 2009). As proteínas repórteres podem ser enzimas como a cloranfenicol acetil transferase, luciferase,  $\beta$ -galactosidase ou proteínas fluorescentes como a *Green Fluorescent Protein (GFP)*, *Cyan Fluorescent Protein*, *Yellow Fluorescent Protein* e *Enhanced Green Fluorescent Protein*, de acordo com a escolha para a montagem do sistema (HANSON; HENDERSON; JONES, 1994; KUNG et al., 2000; LU et al., 2011; SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Os sistemas repórteres possuem diversas aplicações, servindo para estudos da atividade de promotores, de mediadores de transcrição, de processamento de mRNA, monitoramento de transfecção, interações proteicas e localização celular de proteínas (CHUDAKOV et al., 2010; HANSON et al., 1994; SCHENBORN; GROSKREUTZ, 1999). A sinalização do sistema repórter pode ser realizada diretamente por expressão de fluorescência, por exemplo, ou de forma indireta, produzindo mRNA mensurado por outras técnicas moleculares, ou produzindo atividade enzimática, que com adição de substrato possibilita a avaliação e quantificação da expressão proteica (SCHENBORN; GROSKREUTZ, 1999).

Os genes repórteres são integrados a um vetor e dispostos de forma a apresentarem expressão comandada por sítios reguladores. A introdução dos vetores nas células eucarióticas é efetuada por um procedimento denominado de transfecção. A transfecção pode ser executada por eletroporação, por transportadores virais, por microinjeção, por biobalística, por métodos bioquímicos com complexos catiônicos ou coprecipitação e com uso de lipofectamina (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Os sistemas podem ser temporários ou estavelmente mantidos nas células. Uma transfecção estável ocorre quando o material genético inserido permanece por um período longo de tempo ocorrendo replicação do material episomal ou da sequência de DNA integrada ao genoma celular (GRIMM, 2004).

Entre as proteínas repórteres a GFP é a cromoproteína mais utilizada em pesquisas biológicas, biomédicas e biotecnológicas. Descoberta em organismos marinhos luminescentes (*Aequorea victoria*) e isolada pela primeira vez na década de 60 por Osamu Shimomura, produz luminosidade verde fluorescente quando exposta à luz ultravioleta sem a necessidade de adição de substratos ou cofatores. A descoberta desta proteína e seu desenvolvimento rendeu o prêmio Nobel em química, no ano de 2008, a Osamu Shimomura pela descoberta, a Martin Chalfie pela utilização como marcador biológico e incorporação da GFP em organismos vivos (*Caenorhabditis elegans* e *Escherichia*

## Capítulo I – Revisão bibliográfica 56

*coli*) e a Roger Tsien pela sua aplicação em biotecnologia e biomedicina (CHUDAKOV et al., 2010; NOBELPRIZE, 2014).

A GFP é uma proteína formada por uma cadeia monomérica de 238 aminoácidos, que enovelada dispõe de uma conformação denominada barril- $\beta$ . Protegido no centro do “barril” está o fluoróforo constituído pelos aminoácidos das posições 65 (Ser), 66 (Tyr) e 67 (Gly). Para a expressão da fluorescência, a GFP necessita de um processo de maturação, que ocorre por modificações pós-traducionais. Essas modificações consistem em um dobramento na molécula, seguido de uma ciclização da proteína nas posições 65 e 67, uma desidratação e uma oxidação. A GFP não carece de cofatores e substratos, porém necessita de oxigênio para a etapa de maturação, fator que limita sua utilização em células anaeróbicas (CHUDAKOV et al., 2010; TSIEN, 1998).

A diversidade de proteínas fluorescentes utilizadas hoje se deve ao trabalho de Roger Tsien, que modificou o fluoróforo da GFP e obteve vários mutantes com diferentes propriedades espectrais e consequentemente coloração da luz emitida modificada. Atualmente, as proteínas fluorescentes com diferentes colorações são uma ferramenta útil para a produção de proteínas quiméricas com ampla gama de aplicações em biologia molecular (CHUDAKOV et al., 2010; KAUFFMAN; ADLOFF, 2009).

A característica de fluorescência da GFP, e de outras proteínas e substâncias, é atribuída aos seus fluoróforos. Fluoróforos são moléculas com propriedade de absorverem a luz em um comprimento de onda e emití-la em um comprimento de onda diferente. Isso acontece porque alguns elétrons em torno do núcleo atômico podem ser excitados pela luz passando para um estado maior de energia, porém a atração magnética nuclear faz com que o elétron retorne ao estado mais baixo de energia e para isso há necessidade de liberação da energia absorvida. Essa energia é desprendida na forma de luz, mas como parte é convertida em calor durante o processo, a luz é emitida em um comprimento de onda maior, resultando no aparecimento de uma cor diferente em relação à luz absorvida (OVERTON, 2006; SHAPIRO, 2003).

A propriedade dos fluoróforos é utilizada para marcação celular e pode ser aproveitada para realizar análises com leitores de fluorescência ou para análises por citometria de fluxo, por exemplo. Os fluoróforos podem ser usados para marcação direta, quando possuem afinidade por estruturas celulares como o DNA; usados conjugados aos anticorpos, para marcar células e partículas até mesmo como alguns vírus, e para a

construção de sistemas repórteres, como comentado (LORET; EL BILALI; LIPPE, 2012; SHAPIRO, 2003).

A citometria de fluxo possui algumas vantagens em relação aos leitores de fluorescência por permitir análises multiparamétricas simultâneas de células individuais, gerando dados como tamanho celular, complexidade e referentes às marcações. Dois parâmetros principais são determinados pelos citômetros através da medida de dispersão da luz. Quando a dispersão é medida em ângulo reto em direção ao feixe de luz do laser é gerada a chamada dispersão lateral - SSC (*Side Scatter*), que se correlaciona à complexidade celular. Quando a dispersão da luz é medida em ângulos pequenos de 1 a 10°, em relação ao alvo de cruzamento do feixe de luz na célula, é gerada a dispersão para frente – FSC (*Forward Scatter*), que se correlaciona com o tamanho celular (SHAPIRO, 2003).

Para análise das informações geradas pela citometria de fluxo, janelas eletrônicas são construídas pelo *software*, que organiza as características celulares em diagramas e permite a avaliação geral ou individualizada das populações celulares de interesse. As análises baseadas em populações podem aferir um grande número de eventos em um período curto de tempo, sendo os dados gerados expressos em *dot plots* ou histogramas. O *dot plot* é um diagrama bidimensional, assim correlaciona dois parâmetros por célula ou partícula, e o histograma é um diagrama unidirecional, que representa o número de eventos em um canal de detecção (SHAPIRO, 2003; SHARPE, 2006).

Neste trabalho, a proteína GFP derivada de *Zoanthus sp.* foi empregada para a construção de um sistema repórter para HSV e avaliada por leitor de fluorescência e por citometria de fluxo. Os sistemas repórteres são metodologias inovadoras, normalmente sensíveis e específicas. O sistema aqui proposto permitiria a rápida detecção *in vitro* de infecções causadas pelos HSV de forma menos subjetiva do que pelas técnicas utilizadas atualmente. Por empregar a proteína GFP, seria possível automatizar as leituras aumentando o número de análises no tempo. Além disso, o sistema repórter pode ter diversas aplicações na pesquisa e na clínica, como para desenvolvimento de novos medicamentos, análises de resistência aos antivirais e utilização para diagnóstico de infecções em pacientes imunodeprimidos, para os quais as técnicas disponíveis hoje nem sempre são efetivas. Os detalhes da utilização deste sistema, da construção, da detecção e das aplicações serão discutidos no decorrer do trabalho.

## **I.2 OBJETIVOS**

### **I.2.1 Objetivo geral**

Desenvolver um sistema celular repórter para detecção, análise de resistência aos antivirais e pesquisa de novos medicamentos para Herpes Simplex Vírus 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2).

### **I.2.2 Objetivos específicos**

- Amplificar por PCR a região promotora da enzima viral ribonucleotídeo redutase (RR1);
- Clonar a região promotora amplificada em vetores codificantes da GFP;
- Efetuar a transfecção de células Vero (permissivas aos HSV-1 e 2) com os vetores repórteres;
- Selecionar os clones celulares recombinantes;
- Padronizar os ensaios de detecção viral por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo;
- Avaliar a viabilidade das células transfectadas quando expostas a amostras clínicas;
- Padronizar os ensaios para estudo de resistência aos antivirais e pesquisa de novos medicamentos.

## I.3 MATERIAIS E MÉTODOS

### I.3.1 Células e cultura celular

Foram utilizadas células Vero (ATCC: CCL 81 e Instituto Adolfo Lutz/SP), fibroblastos de rim de macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*) permissivos *in vitro* aos vírus do HSV-1 e HSV-2 (PEREIRA, 2008). Para cultura e manutenção, as células foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera umedecida, sendo estas condições referenciadas neste trabalho como “condições padrão de incubação”. A dissociação celular foi realizada pelo método químico, utilizando tripsina 2,5 g/L (Cultilab), para subcultura, manutenção das células e utilização nos ensaios.

Os meios MEM - *Minimum Essential Medium Eagle* (Cultilab) ou DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, com e sem vermelho de fenol (Cultilab), acrescido de 0,22% de bicarbonato de sódio para a sustentação do pH (7,2 -7,4) e de 5 a 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco) foram empregados nos ensaios e para a cultura celular. Conforme necessário, 1% de PSA (10000 U de penicilina G, 10000 µg de estreptomicina 25 µg de anfotericina B) ou 1% de PS (10000 U de penicilina G, 10000 µg de estreptomicina) foi adicionado aos meios de cultura para evitar contaminações fúngicas e/ou bacterianas. Durante a etapa de seleção e para manter as células transfectadas foi utilizado Geneticin® (G418) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) nas concentrações de 0,8 mg/mL e 0,2 mg/mL.

### I.3.2 Vírus e titulação viral

As suspensões virais estoque do HSV-1, estirpe KOS (Faculdade de Farmácia, Universidade de Rennes, França) e do HSV-2, estirpe 333 (Departamento de Virologia Clínica, Universidade de Göteborg, Suécia) foram produzidas em garrafas de 180 cm<sup>2</sup> contendo células Vero. Suspensões virais (1 mL) do estoque do LVA foram inoculadas nas garrafas, homogeneizadas e incubadas em condições padrão por 1 hora para infecção. Finalizada a incubação, as suspensões foram substituídas por 10 mL de MEM + PSA 1% e as garrafas incubadas até o desenvolvimento do efeito citopático visualizado em microscópio Olympus IX71. Formado o efeito citopático homogêneo, de 27 a 54 h após a infecção (1,5 a 3 ciclos de replicação viral), as garrafas foram submetidas a três ciclos de congelamento (-80°C) e descongelamento (37°C) para rompimento celular e liberação das partículas virais. A suspensão resultante foi transferida para um tubo de 50 mL,

## Capítulo I – Materiais e métodos 60

centrifugada por 10 min a 4500 x g em centrífuga refrigerada a 4°C e o sobrenadante contendo as partículas virais fracionado em microtubos estéreis de 0,5 mL, armazenados a – 80°C até a utilização.

A titulação viral foi efetuada por ensaios de placa de lise, em placas de 24 cavidades contendo 2,5 x 10<sup>5</sup> células/ cavidade, infectadas em triplicata com 400 µL de suspensão viral nas diluições de 10<sup>-3</sup> a 10<sup>-10</sup> (BURLESON; CHAMBERS; WIEDBRAUK, 1992; MADIGAN et al., 2010). Após 1 hora de infecção nas condições padrão, as placas foram lavadas 3 x com 300 µL de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e incubadas nas condições padrão com 500 µL de MEM 2 x + 1% de PSA e carboximetilcelulose 1,5% na proporção 1:1. Formado o efeito citopático (após 48 h para o HSV-2 e 72 h para o HSV-1), as cavidades foram lavadas 3 x com 300 µL de PBS e foi adicionada a solução de preto de naftaleno 0,1% (200 µL/cavidade). As placas foram colocadas em agitador mecânico à temperatura de 37°C por 20 min e posteriormente realizada a contagem de focos, com auxílio de uma lupa, para a determinação dos títulos virais.

Os títulos virais em Unidades Formadoras de Placa por mililitro (UFP/mL) foram calculados através da fórmula:

$$\text{Título viral (UFP/mL)} = \frac{\text{MF} \times \text{RD}}{\text{V}}$$

MF = Média do número de focos contados na maior diluição viral;

RD = Recíproca da maior diluição do vírus em que foi realizada a contagem de placas;

V = Volume da diluição da suspensão viral adicionada em cada cavidade em mL.

### I.3.3 Construção do sistema repórter

#### I.3.3.1 Iniciadores

Com base em dados da literatura e no banco de dados GenBank foram desenhados iniciadores específicos para o promotor ICP10 (*infected cell protein 10*) do gene da RR1 do HSV-2 (WYMER et al., 1989) com os *softwares* PrimerSelect – *version* 7.0.0 e BioEdit Sequence Alignment Editor – *version* 7.1.3.0. Dois pares de iniciadores foram desenhados, F3 + R3 e F4 + R3, conforme disposto no quadro I.3. Nas extremidades 5' dos iniciadores foram adicionados sítios de restrição para as enzimas EcoRI e BamHI, para formação de extremidades coesivas proporcionando a clonagem sítio dirigida. Os iniciadores foram sintetizados e adquiridos das empresas IDT (*Integrated DNA Technologies*) e Invitrogen. Iniciadores FK e RK,

descritos na literatura, também foram testados, mas não resultaram em um sistema repórter funcional e não serão discutidos neste trabalho (KUNG, 2005).

**Quadro I. 3:** Iniciadores dirigidos para a região ICP10 do gene da RR1 do HSV-2.

Nomenclatura	Sequências dos iniciadores	Localização - Genoma do HSV-2 (GenBank: NC_001798.1)
<b>F3 (Senso)</b>	5'- <u>GGGAATTC</u> GGCCTG CGCGTGATCGTCTAT -3'	86449 – 86469
<b>F4 (Senso)</b>	5'- <u>GCGAATTC</u> AGCCAA GTCACGAACCCCCAG -3'	86228 – 86248
<b>R3 (Antisenso)</b>	5'- ACGGATCCCTCCC GGTTCCTGTCGT -3'	87077 – 87095

As regiões sublinhadas representam os sítios de restrição para as enzimas EcoRI (GAATTC) ou BamHI (GGATCC).

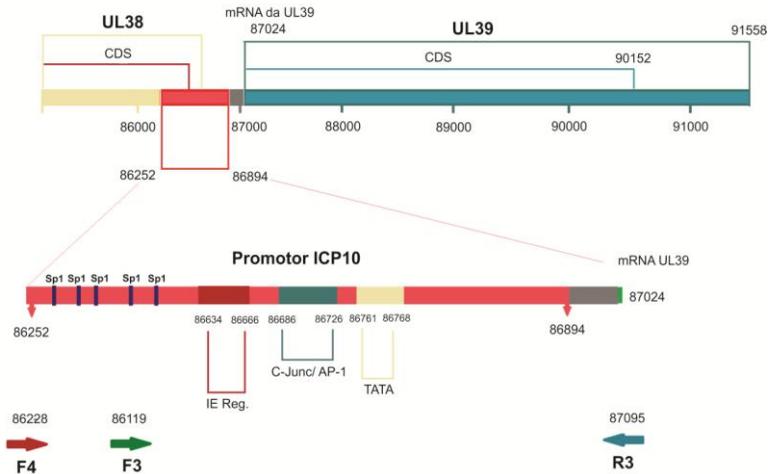
A RR1 é uma enzima responsável pela produção de desoxirribonucleotídeos a partir de ribonucleotídeos, para a replicação viral. Os fragmentos correspondentes à região ICP10 da RR1 foram escolhidos para regular a expressão da GFP no sistema repórter por o gene da RR1 viral ser transcrito no início do processo de replicação (genes IE). Assim, a regulação do sistema via ICP10 proporcionaria a expressão da GFP precocemente e, devido a esse promotor ser ativado pela proteína VP16, o sistema seria seletivamente induzido na presença de replicação viral (WHITLEY et al., 1998; WILSON; MOHR, 2012; WYMER et al., 1989; WYSOCKA; HERR, 2003).

A localização do promotor da RR1 no genoma viral do HSV-2 inicia-se em aproximadamente 544 pb acima do sítio de iniciação do mRNA da RR1 (região 86.252) até 105 pb abaixo deste sítio de iniciação (região 86.894). Interno à região promotora encontram-se o sítio TAATGARAT, 2 elementos de ligação AP-1 e 5 possíveis sítios de ligação para Sp1 (Figura I. 4) (WYMER et al., 1989). O fragmento resultante da combinação dos iniciadores F3 e R3 recobre parte da região promotora não incluindo a fração inicial (86.252 – 86.449), que contém 3 dos 5 sítios de ligação para Sp1, porém recobrendo todo o final da porção do promotor ICP10 acrescido de 201 pb posteriores ao final da região promotora. O fragmento resultante da combinação dos iniciadores F4 e R3 recobre todo o promotor ICP10, estendendo-se 24

# Capítulo I – Materiais e métodos 62

pb anteriormente ao início, e 201 pb posteriores ao final da região promotora da RR1 do HSV-2 (GenBank: NC\_001798.1).

**Figura I. 4:** Ilustração esquemática da região promotora ICP10. Indicação de sítios de regulação e da disposição dos iniciadores F3, F4 e R3 em relação à região ICP10.



**Fonte:** A autora baseada em GenBank e WYMER et al, 1989.

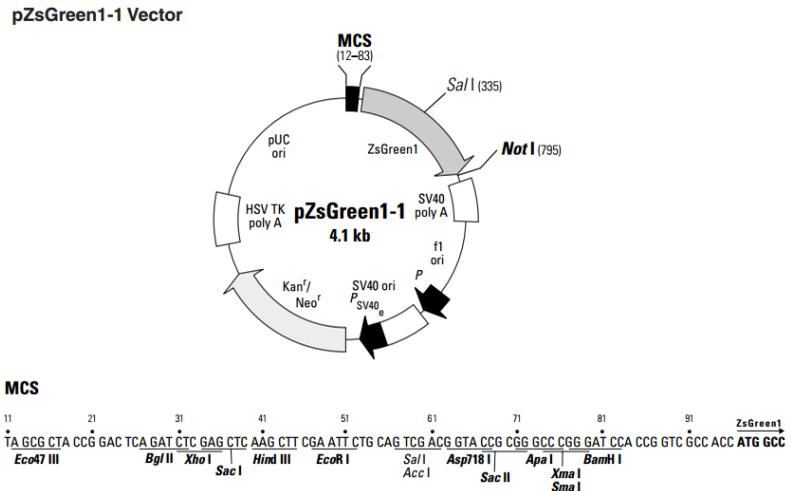
**Legenda:** UL39 - Gene codificante da ribonucleotídeo redutase; UL38 - Gene codificante de uma proteína do capsídeo; CDS - *Coding sequence*; IE Reg. - *Immediate - early regulation region*; C-Jun/AP-1 - Região reguladora; Sp1 - *Specificity protein 1*.

## I.3.3.2 Vetor

Vetores Vi (F3R3 ZsGreen1-1 e F4R3 ZsGreen1-1) foram produzidos pela inserção da região promotora ICP10 (F3R3 ou F4R3) no sítio múltiplo de clonagem do vetor comercial pZsGreen1-1 (Clontech), que antecede o gene codificador da proteína GFP derivada de *Zoanthus sp.* O pZsGreen1-1 é desprovido de região promotora reguladora da transcrição da GFP, possui origens de replicação SV40 e pUC e um cassete para (Neo<sup>r</sup>), que confere resistência à neomicina/kanamicina (Figura I. 5). Os vetores Vo (ZsGreen-1-1), sem inserção de promotor para a GFP, serviram para a produção das células controle.

O vetor pDD-ZsGreen1 Reporter (Clontech) também foi testado ligado aos insertos obtidos com as combinações de iniciadores FK + RK, F3 + R3 e F4 + R3. O pDD-ZsGreen1 possui estrutura semelhante ao pZsGreen1-1, porém contém um domínio de desestabilização DD, que gera a rápida degradação da GFP pelos proteossomos, exceto quando realizada a blindagem com Shield1 (50µM – 1000µM). Devido a problemas de estabilização da fluorescência com o Shield1 os ensaios com esse vetor não foram continuados e não serão descritos neste trabalho.

**Figura I. 5:** Ilustração esquemática do vetor comercial pZsGreen1-1 (Clontech).



Fonte: [http://www.clontech.com/US/Products/Fluorescent\\_Proteins\\_and\\_Reporter/Fluorescent\\_Proteins\\_by\\_Name/ZsGreen1\\_Fluorescent\\_Protein](http://www.clontech.com/US/Products/Fluorescent_Proteins_and_Reporter/Fluorescent_Proteins_by_Name/ZsGreen1_Fluorescent_Protein)

### I.3.3.3 Extração e amplificação do DNA

A extração e purificação do DNA viral foi realizada com o kit QIAamp<sup>®</sup> MinElute<sup>®</sup> Virus Spin (Qiagen), seguindo instruções do fabricante, a partir de 200 µL da suspensão viral estoque do HSV-2, preparada conforme o item I.3.2. O material genético obtido foi armazenado em alíquotas a -20 °C até o momento da utilização.

A PCR foi realizada com a enzima GoTaq<sup>®</sup> Flexi DNA polymerase (Promega) nas concentrações e volumes expostos no quadro

## Capítulo I – Materiais e métodos 64

I. 4. As ciclagens foram efetuadas em termociclador Techne (Flexigene) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 min seguidos por 30 a 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min; hibridização a 62,7°C (F3R3) ou 64,9° (F4R3) por 1 min; extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C de 5 a 10min. A padronização das reações de amplificação foi estabelecida após testes com diferentes concentrações de iniciadores, temperaturas de anelamento, condições de ciclagem e concentrações de MgCl<sub>2</sub>.

**Quadro I. 4:** Concentração dos reagentes utilizados nas PCRs.

Reagentes	Concentração inicial	Reação com F3 e R3	Reação com F4 e R3
H <sub>2</sub> O DEPC	25 µL qsp	25 µL qsp	25 µL qsp
Tampão 5 x (pH 8,5 e sem magnésio)	5 x	1 x	1 x
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,5 mM	1,5 mM
dNTP	2 mM	0,2 mM	0,2 mM
Iniciador Senso	10 µM	1,0 µM	0,3 µM
Iniciador Antissenso	10 µM	1,0 µM	0,3 µM
Taq Polimerase	5 U/µL	1U	1 U
DNA molde (HSV-2)	-	70 a 90 ng	70 a 90 ng

**Legenda:** qsp. - Quantidade suficiente para; dNTP – Desoxinucleotídeos trifosfato; DEPC – Dietilpirocarbonato.

Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 1% preparado em tampão TBE 1 x (Tris-Borato-EDTA) e a corrida eletroforética realizada entre 70 e 90 Volts (V) em tampão TBE 1 x. A cada cavidade do gel foram aplicados 5 a 10µL de amostra acrescida de 20% de Loading dye Blue/Orange 6 x (Promega) e 2% de GelRed 20 x (Biotium). O padrão molecular 100 pb DNA Ladder (Promega) foi usado como referência nos géis para identificação das bandas dos produtos com tamanhos de 663 pb (F3R3) e 867pb (F4R3). Os géis foram analisados no fotodocumentador MiniBIS Pro associado ao *software* Gel Capture Version 6.6 (DNR Bio - Imaging Systems). A

purificação dos produtos de PCR foi efetuada com o kit RTP<sup>®</sup> DNA/RNA Virus Mini Kit (Invitex), seguindo o protocolo do fabricante.

### **I.3.3.4 Digestão enzimática dos vetores e insertos**

A escolha das enzimas de restrição considerou a disposição dos sítios de restrição no sítio múltiplo de clonagem do vetor ZsGreen1-1 e as digestões que comprometeriam a integridade do inserto após análise pelo sistema *online* NEBCutter V2.0 (New England BioLabs<sup>®</sup> Inc.). As digestões tanto dos produtos de PCR como do vetor ocorreram conforme recomendações do fabricante com as enzimas de restrição EcoRI (12 U/ $\mu$ L) e BamHI (10 U/ $\mu$ L) (Promega).

#### **- Digestão dos produtos de PCR**

As enzimas EcoRI e BamHI foram aplicadas nas concentrações de 8,5 U para o inserto F3R3 e 8,0 U para o inserto F4R3 por reação de 20 $\mu$ L, sendo digerido em cada reação aproximadamente 1,5  $\mu$ g dos produtos de PCR quantificados em NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Life Science). O tampão de reação utilizado foi o MULTI – CORE<sup>™</sup> 10 x, que proporciona atividade enzimática de 100% para a enzima EcoRI e entre 75 e 100% para a enzima BamHI. A reação foi mantida por 4 h a 37°C em banho seco Thermomixer<sup>®</sup> comfort (Eppendorf) e ao final da digestão as enzimas foram inativadas a 65°C por 15 min em banho seco.

#### **- Digestão dos vetores**

A digestão do vetor pZsGreen1-1 ocorreu com as mesmas enzimas e nas mesmas condições utilizadas para os produtos de PCR (EcoRI e BamHI). Para cada reação de 20  $\mu$ L foi utilizado 1  $\mu$ g do vetor pZsGreen1-1 (concentração 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ L) e 5 U de cada enzima de restrição por reação.

### **I.3.3.5 Ligação dos fragmentos**

A ligação dos insertos F3R3 e F4R3 ao vetor pZsGreen1-1 e a religação do vetor controle ZsGreen1-1 foi efetuada com a enzima T4 DNA Ligase (5 U/ $\mu$ L) (Fermentas) e com o tampão que acompanha o kit em reação de 20  $\mu$ L. Para a ligação foram utilizados 100 ng do vetor pZsGreen1-1 digerido, com ou sem inserto digerido, na proporção 2 : 1 conforme dados do quadro I. 5. A reação foi realizada a temperatura de 22°C em banho seco durante 4 h e posteriormente a enzima T4 DNA Ligase foi inativada a 65°C em banho seco por 10 min.

**Quadro I. 5:** Particularidades das reações de ligação (Vi e Vo).

	Vi - F3R3	Vi - F4R3	Vo
<b>Peso molecular do vetor (pZsGreen1-1)</b>	4,1 kb	4,1 kb	4,1 kb
<b>Tamanho do inserto</b>	663 pb	867 pb	-
<b>Proporção inserto x vetor/ peso molecular</b>	2 : 1	2 : 1	-
<b>Quantidade do produto de PCR</b>	1236 ng / 100 ng do vetor	946 ng/ 100 ng do vetor	-
<b>T4 DNA ligase</b>	6 U	5 U	2,5 U

O volume final das reações de ligação vetor - inserto (Vi) e vetor religado (Vo) necessitaram reajuste para a transfecção celular. O ajuste foi efetuado por evaporação do excesso de conteúdo líquido das reações em banho seco com temperaturas variando de 42 a 56°C em incubação entre de 14 a 16 h até que cada microtubo, contendo Vo ou Vi, atingisse aproximadamente 10 µL.

### 1.3.3.6 Transfecção celular

Placas de 24 cavidades contendo  $6,64 \times 10^4$  células/ cavidade em 750 µL de DMEM + 10% de SFB foram preparadas 24 h antes da transfecção e incubadas nas condições padrão para confluência final de 50 a 80%. A transfecção celular foi realizada pelo método da lipofectamina com o kit Xfect™ Transfection Reagent (Clontech). Posteriormente a lavagem das cavidades com 300 µL de PBS e adição de 400 µL de DMEM + 10% de SFB fresco foi aplicado 25 µL de solução complexa de nanopartículas, contendo Vi ou Vo, sob uma leve agitação. Para a transfecção as placas foram incubadas nas condições padrão por 4 h com subsequente remoção da mistura de meio de cultura e nanopartículas e adição de meio de manutenção (DMEM + 10% SFB). As células foram incubadas por mais 44 h antes de se dar início à seleção dos clones com G418.

### 1.3.3.7 Seleção dos clones e criopreservação

A seleção dos clones ocorreu com G418 após 48 h de incubação das células transfectadas. O G418 foi diluído a 100 mg/mL em água milli Q, filtrado em filtros descartáveis de 0,22 µm e as alíquotas diluídas (100 a 200 µL) armazenadas a - 20°C até o momento da

utilização. A seleção dos clones Vo e Vi (F3R3 ZsGreen1-1 ou F4R3 ZsGreen1-1) foi realizada com 0,8 mg/mL de G418 adicionado ao meio de cultura. As células permaneceram em seleção por 15 dias, sendo a monocamada celular periodicamente lavada com 300 µL de PBS para retirada das células mortas com posterior adição de 500 µL de DMEM fresco + 10% de SFB acrescido de G418. Durante todo período de seleção as células foram mantidas em estufa nas condições padrão.

Os clones selecionados foram propagados em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> contendo aproximadamente 15 mL de meio DMEM + 10% de SFB + 1% de PSA e 0,2 mg/mL de G418. A criopreservação foi realizada após tripsinização das células, adição de 10 mL de DMEM + 10% de SFB + 1% de PSA e centrifugação das células em tubos de 15 mL, a 405 x g por 5 min, em centrífuga refrigerada a 4°C. O sedimento resultante foi ressuspenso em 1800 µL de SFB gelado com 10% de DMSO (Dimethyl sulfoxide - Vetec™ 99,9%) e a suspensão celular dispensada em criotubos de 2 mL. Os criotubos foram distribuídos em um *Mr. Frosty Freezing Container*<sup>®</sup> e mantidos à - 20 °C de 15 a 30 min, posteriormente de 12 a 24 h à temperatura de - 80°C e finalmente armazenados em nitrogênio líquido até utilização.

### **I.3.3.8 PCR e sequenciamento dos insertos**

Células transfectadas dissociadas das garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> com 1 mL de tripsina 2,5 g/L foram centrifugadas em tubos de 15 mL a 405 x g em centrífuga refrigerada a 4°C por 5 min. O sobrenadante foi aspirado e o sedimento armazenado a - 80°C até o momento da extração do DNA plasmidial por lise alcalina seguindo o descrito por Sambrook e Russel (2001) com algumas modificações.

Com o DNA plasmidial extraído das células foi efetuada uma PCR conforme descrito no item I.3.3.3 para a confirmação da presença dos fragmentos de interesse. O produto de PCR das células F3R3 ZsGreen1-1 foi submetido ao sequenciamento e o das células F4R3 ZsGreen1-1 foi sequenciado após extração a partir do gel de agarose 1% com o kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen).

O sequenciamento foi gentilmente efetuado pela doutoranda Ana Paula Gruending no Laboratório de Protozoologia – UFSC utilizando os iniciadores F4, F3 e R3 nas combinações adequadas e nas seguintes condições de PCR: pré-incubação a 96°C por 60 seg, 35 ciclos com desnaturação a 96°C por 1 seg, anelamento a 50°C por 5 seg com rampa de alteração da temperatura de 1°C/seg ou 30%, e extensão a 60°C por 4 min. Posteriormente os produtos marcados foram precipitados utilizando etanol/EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético),

## Capítulo I – Materiais e métodos 68

ressuspensos em 10  $\mu\text{L}$  de formamida e eletroinjetados no equipamento *Hitachi 3500 Genetic Analyzer* (AB Applied Biosystems®). A reação foi preparada com o Kit BigDye® Terminator (AB Applied Biosystems®), seguindo instruções do fabricante.

### **I.3.4 Autofluorescência celular e análise de interferentes**

#### **I.3.4.1 Presença e ausência de SFB**

Células ICP10 ZsGreen1-1 nas concentrações celulares de 0,5 x 10<sup>5</sup>, 0,8 x 10<sup>5</sup> e 1,0 x 10<sup>5</sup> células/mL foram mantidas em placas de 24 cavidades com 750  $\mu\text{L}$  MEM + 0,2 mg/mL de G418 na ausência ou presença de 10% de SFB. Depois de 24 h de incubação sob condições padrão, as células foram lavadas com 300  $\mu\text{L}$  de PBS e adicionados 400  $\mu\text{L}$  de DMEM sem vermelho de fenol (Cultilab) + 0,2 mg/mL de G418, suplementado ou não com 10% de SFB para observação do comportamento da autofluorescência. A análise foi realizada por microscopia de fluorescência 48 e 72 h após a preparação da placa (Ver item I.3.7.1).

#### **I.3.4.2 Concentração do SFB**

Para avaliação do efeito de diferentes concentrações de SFB sobre a autofluorescência, placas de 24 cavidades contendo células ICP10 ZsGreen1-1 (0,8 x 10<sup>5</sup> células/mL) em 750  $\mu\text{L}$  de MEM + PSA 1% e 0,2 mg/mL de G418 foram submetidas a diferentes concentrações de SFB (0,5%; 2%; 5%; 10%; 20% e 50%). Passadas 24 h da preparação das placas, as células foram lavadas com 300  $\mu\text{L}$  de PBS e o meio substituído por 400  $\mu\text{L}$  de DMEM sem vermelho de fenol com 0,2 mg/mL de G418. A análise foi realizada por microscopia de fluorescência 48 e 72 h após a preparação das placas (Ver item I.3.7.1).

#### **I.3.5 Disposição dos núcleos em células autofluorescentes**

Lâminas para cultura celular contendo células F4R3 ZsGreen1-1 (5 x 10<sup>4</sup> células/ cavidade) foram preparadas em meio DMEM + 10% SFB e 0,2 mg/mL de G418. Após 24 h de incubação nas condições padrão, as cavidades foram lavadas 2 x com 250  $\mu\text{L}$  de PBS, fixadas com 250  $\mu\text{L}$  de paraformaldeído 4% por 30 min a 4°C e lavadas novamente com PBS por 10 min. A permeabilização foi realizada com 250  $\mu\text{L}$  de Triton - X 100 em PBS 0,1% por 30 min a 37°C em agitador mecânico a 60 rpm, e após, adicionados 100 $\mu\text{L}$  de Hoechst 32258 (Invitrogen) por cavidade para incubação por 40 min em agitador

mecânico a 60 rpm. O Hoechst foi removido e a lâmina lavada 2 x com PBS para montagem e análise em microscópio de fluorescência Nikon 80i Eclipse com sistema de captura de imagem. Os comprimentos de onda empregados foram: para GFP, excitação 493 nm e emissão 505 nm e para Hoechst excitação 330 - 380 nm e emissão 440 nm.

### **I.3.6 Análise da fluorescência basal**

#### **I.3.6.1 Fluorescência basal em leitor de fluorescência**

Placas de 24 cavidades com células F4R3 ZsGreen1-1 em diferentes concentrações ( $0,5 \times 10^5$ ,  $0,8 \times 10^5$ ,  $1,28 \times 10^5$ ,  $2,04 \times 10^5$ ,  $3,26 \times 10^5$  e  $5,21 \times 10^5$  células/mL) foram preparadas em 750  $\mu$ L/cavidade de DMEM + 10% de SFB, 1% de PSA e 0,2 mg/mL de G418. Leituras de fluorescência (Excitação: 493 nm e emissão 505 nm) foram executadas periodicamente entre 6 e 72 h após a preparação da placa incubada nos intervalos das leituras em condições padrão. Em 6 h foi efetuada também a análise do espectrograma de fluorescência com excitação em 493 nm e leituras de emissão de 300 a 800 nm em intervalos de 10 nm. As leituras foram efetuadas no leitor SoftMax<sup>®</sup> Pro - Molecular Devices e os dados analisados com o *software* GraphPad Prism 5.

#### **I.3.6.2 Fluorescência basal por citometria de fluxo**

Placas de 24 cavidades com células F4R3 ZsGreen1-1 em diferentes concentrações ( $0,5 \times 10^5$ ,  $0,8 \times 10^5$ ,  $1,28 \times 10^5$ ,  $2,04 \times 10^5$ ,  $3,26 \times 10^5$  e  $5,21 \times 10^5$  células/mL) foram preparadas em 750  $\mu$ L/cavidade de DMEM + 10% de SFB, 1% de PSA e 0,2 mg/mL de G418. As placas foram incubadas nas condições padrões e leituras de fluorescência foram executadas em 6, 48 e 72 h após preparação das células para submissão à citometria de fluxo com aquisição de 30000 eventos por análise (Ver item I.3.7.2).

### **I.3.7 Indução do sistema repórter através da infecção viral**

Placas de 24 cavidades com  $0,8 \times 10^5$  células/mL foram preparadas em 750  $\mu$ L/cavidade de DMEM + 10% de SFB, 24 h antes da infecção viral. Cavidades com células Vero, Vo, F3R3 ZsGreen1-1 e F4R3 ZsGreen1-1 foram lavadas com PBS (300  $\mu$ L) e infectadas com 400  $\mu$ L de suspensão viral de HSV-1 e/ou 2, em diferentes concentrações, preparadas em DMEM gelado (4°C). As placas foram homogeneizadas e incubadas por 1 hora nas condições padrão. Após, foram lavadas com 300  $\mu$ L de PBS para adição de 400  $\mu$ L de DMEM +

## Capítulo I – Materiais e métodos 70

0,2 mg/mL de G418 e incubadas novamente até o momento da análise por microscopia ou citometria de fluxo (Ver itens I.3.7.1 e I.3.7.2). As células infectadas com HSV-2 foram avaliadas em 24, 32 e 48 h após infecção, e as infectadas com HSV-1 avaliadas em 48 e 72 h após a infecção. Como controles, foram utilizadas células não infectadas. Para redução do fotobloqueamento, em alguns ensaios, foram adicionados 16  $\mu$ M de rutina às cavidades contendo meio DMEM ou PBS. A rutina foi aplicada 48 h após infecção com HSV-2 para incubação por 30 min a 30°C anteriormente à microscopia.

### **I.3.7.1 Avaliação da fluorescência por microscopia**

As placas foram mantidas protegidas da luz até o momento da leitura em microscópio Olympus IX71 com fluorescência adaptada e sistema de captura de imagem Cell<sup>^</sup>P Olympus.

### **I.3.7.2 Avaliação da fluorescência por citometria de fluxo**

As células foram dissociadas das cavidades com 70  $\mu$ L de tripsina (2,5 g/L), suspensas em DMEM + 5% de SFB, homogeneizadas por pipetagem e centrifugadas a 1125 x g por 5 min a 4°C em tubos de citometria de fluxo. O sobrenadante foi retirado, as células ressuspensas em 250  $\mu$ L de PBS + EDTA 5 mM, homogeneizadas e mantidas em banho de gelo em geladeira a 4°C de 30 a 45 min até a realização da citometria de fluxo no Citômetro de Fluxo BD FACSCanto™ II - Laser azul (488 nm). Os resultados foram analisados e tratados através do programa *Flowing Software* versão 2.5.0 e GraphPad Prism 5. Os dados obtidos a partir das regiões selecionadas (*gates*) serviram como base para a construção dos gráficos de porcentagem de indução, utilizando a fluorescência média das amostras corrigida pela fluorescência média dos controles celulares, e dos histogramas ilustrativos.

### **I.3.8 Testes de viabilidade celular com amostras clínicas**

A viabilidade das células F4R3 ZsGreen1-1 expostas por 2 ou 48 h às amostras clínicas foi avaliada por ensaios colorimétricos com MTT (sal de tetrazólio) (BERTOL, 2011; FREITAS, 2001; MOSMANN, 1983; SILVA, I. T. D., 2009). Placas de 96 cavidades, com aproximadamente 8000 células em 100  $\mu$ L de DMEM + 10% de SFB, 1% de PS e 0,2 mg/mL de G418, foram preparadas 24 h antes da aplicação das amostras clínicas (soro, plasma ou líquido). O sangue foi coletado no dia da realização dos testes utilizando o sistema a vácuo (Vacutainer®), centrifugado a 2205 x g por 5 min em centrífuga

refrigerada a 4°C e o soro e o plasma transferidos para microtubos armazenados a 4°C até utilização. As amostras de líquido foram cedidas pelo Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU-UFSC) e mantidas em geladeira até aplicação nos ensaios. A utilização das amostras clínicas foi aprovada pelo comitê de ética conforme disposto na Plataforma Brasil (Nº CAAE: 03659213.0.0000.0121).

Após 2 h de incubação das células F4R3 ZsGreen1-1 nas condições padrão com 100µL de amostras clínicas, o primeiro grupo de células em análise foi lavado 2 x com 200 µL de PBS para adição de 200 µL de DMEM fresco. O segundo grupo não foi lavado com PBS e as amostras foram deixadas nas cavidades, sendo apenas adicionados 100 µL de DMEM. Os dois grupos celulares foram incubados por mais 46 h para posterior remoção do sobrenadante das cavidades e aplicação de 50 µL de MTT a 1 mg/mL diluído em DMEM com nova incubação nas condições padrão por mais 4 h. Após remoção do MTT, foram adicionados às cavidades 100 µL de DMSO, as placas agitadas até dissolução dos cristais e realizada as leituras de absorbância a 540 nm em leitor SoftMax<sup>®</sup> Pro -Molecular Devices. Como controles foram utilizadas células sem adição de amostras clínicas (controle celular) e cavidades sem células (branco). Os dados obtidos foram analisados no *software* GraphPad Prism 5.

### **I.3.9 Testes com antivirais e candidatos antivirais inativos**

Todos os antivirais e candidatos a antivirais inativos testados foram diluídos em solução de DMSO (Dimethyl sulfoxide – Merck > 99%) e armazenados a -20°C até o momento do uso. As diluições secundárias para uso imediato foram efetuadas em meio DMEM e a concentração de DMSO mantida abaixo de 1% para aplicação nas células.

Células F4R3 ZsGreen1-1 expostas ao HSV-2 foram tratadas com aciclovir (ACV), ácido gálico (AG), convalotoxina (CNV) e o extrato de *Uncaria sp.* (UT7), todos com atividade antiviral comprovada, e com os candidatos a antivirais inativos β-metil-digoxina (C16), Epi-digitoxigenina 3α-OH (C20) , 21-O-malonil-desoxicorticosterona (C22) e o extrato de *Passiflora edulis*, (BERTOL, 2011; CARVALHO, 2011; SILVA, 2009; LUPI; LAMY; SEMENOVITCH, 2010; KRATZ et al, 2008; CAON et al, 2014).

#### **I.3.9.1 Tratamento**

Placas contendo  $0,8 \times 10^5$  células/mL (750 µL/cavidade) de células F4R3 ZsGreen1-1 em meio DMEM + 10 % de SFB e 0,2

## Capítulo I – Materiais e métodos 72

mg/mL de G418 foram preparadas 24 h antes de serem infectadas com 450 UFP/mL de HSV-2. As cavidades foram lavadas com 300 µL de PBS e alíquotas de 2 mL da suspensão viral de HSV-2 foram preparadas e aplicadas nas cavidades acrescidas dos antivirais AG, UT7 e CNV ou sem os demais agentes de tratamento para infecção nas condições padrão por 1 hora (Quadro I. 6). Passado o tempo de infecção, a monocamada celular foi lavada com 300 µL de PBS e adicionado 400 µL de DMEM contendo 0,2 mg/mL de G418 e os antivirais ou candidatos inativos. As placas foram novamente incubadas nas condições padrão por 48 h até leitura por citometria de fluxo para avaliação da expressão da GFP (Ver item I.3.7.2). As concentrações dos agentes utilizadas estão no quadro I. 6 e no quadro I. 7.

Como controles celulares foram usadas cavidades contendo células que não receberam suspensão viral; como controle viral foram utilizadas cavidades contendo células que receberam suspensão viral, mas não foram tratadas com os antivirais ou candidatos inativos e como controles dos antivirais e dos candidatos inativos foram selecionadas cavidades contendo células que não receberam suspensão viral durante o período de infecção e que receberam os agentes de tratamento.

**Quadro I. 6:** Antivirais testados no sistema repórter usando células F4R3 ZsGreen1-1 frente à infecção com HSV-2.

Antiviral/ Fase do tratamento	Classe/ Sigla	CC50	CI50	[ ] usada	Referências
<b>Aciclovir</b> *(Incubação)	Fármaco/ ACV	> 1000 µg/mL	1,18 µg/mL	5 µg/mL	SILVA, 2009
<b>Ácido Gálico</b> *(Infecção e incubação)	Composto/ AG	> 1000 µM**	33,56 µM	10 µM	KRATZ et al, 2008
<b>Uncaria sp.</b> *(Infecção e incubação)	Extrato/ UT7	515 µg/mL	0,13 µg/mL	2 µg/mL	CAON, 2014
<b>Convalotoxina</b> *(Infecção e incubação)	Composto/ CNV	202 µM	0,02 µM***	0,05 µM	BERTOL, 2011; CARVALHO, 2011

**Legenda:** \* Fases dos ensaios em que os antivirais foram adicionados; \*\*Valor determinado em células GMK AH1; \*\*\* Valor obtido para o HSV-1; CC50: Concentração citotóxica 50%; CI50: Concentração inibitória 50%.

**Quadro I. 7:** Candidatos inativos testados no sistema repórter usando células F4R3 ZsGreen1-1 frente a infecção com HSV-2.

Candidatos inativos/ Fase do tratamento	Classe/ Sigla	CC50	[ ] usada	Referências
<b><i>Passiflora edulis</i> em acetato de etila</b> *(Incubação)	Extrato/ PASS	> 1000 mg/mL	500 mg/mL	SILVA, 2009
<b><math>\beta</math>-metildigoxina</b> *(Incubação)	Composto/ C16	34,70 $\mu$ M	0,05 nM	BERTOL,2011
<b>Epi-digitoxigenina 3<math>\alpha</math>-OH</b> *(Incubação)	Composto/ C20	> 65,00 $\mu$ M	0,05 nM	BERTOL,2011
<b>21-O-malonil-desoxicorticosterona</b> *(Incubação)	Composto/ C22	> 62,50 $\mu$ M	0,50 nM	BERTOL,2011

**Legenda:** \* Fase dos ensaios em que os candidatos inativos foram adicionados; CC50: Concentração citotóxica.

### I.3.10 Indução do sistema repórter pela Hidroxiuréia

Placas de 24 cavidades contendo  $0,8 \times 10^5$  células/mL (750  $\mu$ L/cavidade) de células F4R3 ZsGreen1-1 foram preparadas 24 h anteriores ao tratamento com hidroxiuréia. À monocamada celular foi adicionado DMEM acrescido de 0,2 mM de hidroxiuréia e de 0,2 mg/mL de G418. Ao controle celular foi adicionado apenas meio DMEM com 0,2 mg/mL de G418. As placas foram incubadas nas condições padrão por 48 h até a realização da citometria de fluxo para avaliar a expressão de GFP em função da indução química utilizando hidroxiuréia (Ver item I.3.7.2).

### I.3.11 Análise estatística

A análise estatística foi efetuada através do *software* GraphPad Prism 5.

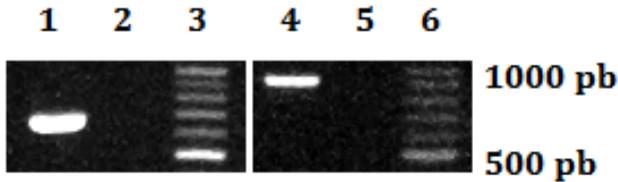
ANOVA de dois fatores (*Two-way*) e pós-teste de Bonferroni foram utilizados para todas as análises exceto para as de viabilidade celular com as amostras clínicas e ensaios com hidroxiuréia, nas quais foram utilizados ANOVA de um fator (*One-way*) com pós-teste de Dunnett.

## I.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### I.4.1 Construção do sistema repórter

A presença dos amplicons, F3R3 (663 pb) e F4R3 (867 pb), foi confirmada por eletroforese em gel de agarose, nos quais se observou bandas de DNA com os tamanhos moleculares esperados, quando comparadas com o padrão de peso molecular (100 pb). Ambos os produtos foram expressos como bandas de grande intensidade e isentas de ampliações inespecíficas visíveis (Figura I. 6).

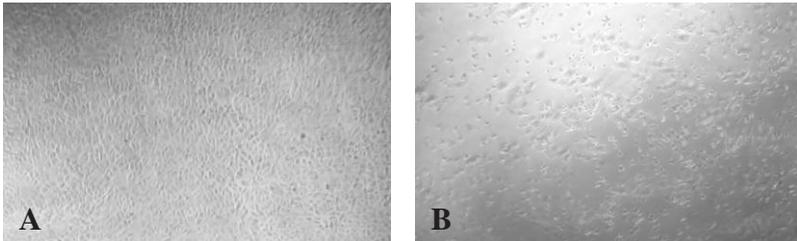
**Figura I. 6:** Eletroforese dos produtos da PCR F3R3 e F4R3 em gel de agarose. Produtos obtidos com os iniciadores F3 + R3 - 663 pb (Coluna1) e F4 + R3 - 867 pb (Coluna 4), controles negativos (Colunas 2 e 5) e padrões de peso molecular - 100pb ( Colunas 3 e 6).



### I.4.2 Seleção das células transfectadas

As células submetidas à seleção com 0,8 mg/mL de G418 apresentaram, entre o terceiro e quinto dia de tratamento, morte celular maciça das células não transfectadas. Através da microscopia, foi constatado o desprendimento celular da monocamada e a presença de células arredondadas, características típicas de morte celular (Figura I. 7). Ao final da segunda semana de tratamento houve redução no número de células mortas até o cessamento do desprendimento celular da monocamada indicando a seleção dos clones recombinantes.

**Figura I. 7:** Imagem ilustrativa de células transfectadas durante o processo de seleção com G418 (4 x). (A) Células do controle celular em monocamada. (B) Células desprendidas da monocamada celular indicando morte celular devido à aplicação de G418. Imagem do início da segunda semana de seleção com G418.



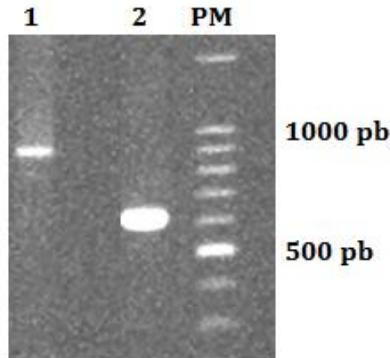
O G418 é comumente utilizado para a seleção de células eucarióticas estavelmente transfectadas. Este aminoglicosídeo, semelhante à gentamicina, neomicina e kanamicina, atua por inibição da síntese proteica celular aparentemente por ligação aos ribossomos, porém o mecanismo exato de ação ainda não foi elucidado. Dessa forma, a morte das células não resistentes acontece em consequência da interrupção da síntese proteica (BAR-NUN; SHNEYOUR; BECKMANN, 1983; RANG et al., 2007; SAMBROOK; RUSSELL, 2001; TOBE et al., 2013; ZANETTI; GOMES; HAN, 2013).

As células que receberam os vetores pela fusão do lipossoma, composto pelo DNA e por lipídeos catiônicos, com a membrana plasmática no momento da transfecção são resistentes ao G418, pois o vetor pZsGreen1-1 possui um gene de resistência que permite a sobrevivência das células transfectadas mesmo na presença deste aminoglicosídeo (FELGNER et al., 1987; GRIMM, 2004).

### **I.4.3 Confirmação da transfecção por PCR e sequenciamento**

A PCR executada com o DNA plasmidial obtido de células transfectadas e em cultura resultou em bandas com tamanhos moleculares correspondentes aos esperados para cada inserto - F3R3 (663 pb) e F4R3 (867 pb), conforme observado na figura I. 8. Isso confirmou a presença dos vetores com os respectivos insertos nas células em cultura.

**Figura I. 8:** Eletroforese em gel de agarose mostrando produtos de PCR obtidos a partir de DNA plasmidial extraído de células transfectadas. Observam-se produtos de PCR com tamanhos moleculares de aproximadamente 867 pb (Coluna 1) e 663 pb (Coluna 2) correspondente ao esperado para os insertos F4R3 e F3R3 respectivamente.



**Legenda:** PM – Padrão de peso molecular – 100 pb.

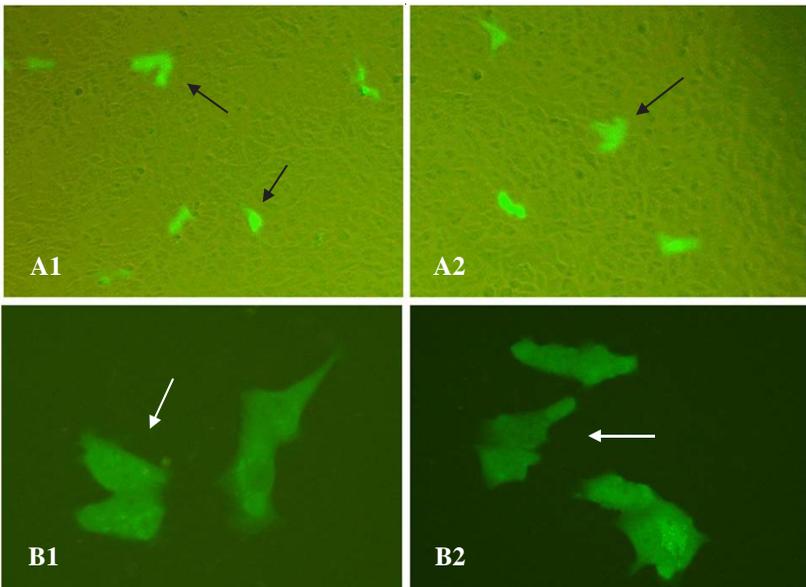
O sequenciamento dos produtos de PCR (F3R3 e F4R3) confirmou a identidade das sequências referentes à região ICP10 (GenBank: M27012.1) para ambos os fragmentos conforme análises via BLASTn. O sequenciamento diretamente do DNA plasmidial, para confirmação da clonagem sítio direcionada, foi realizado, entretanto a qualidade das sequências obtidas não foi adequada às análises.

#### **I.4.4 Autofluorescência celular e análise de interferentes**

A expressão de fluorescência pelas células do sistema repórter deveria ocorrer apenas em células submetidas à infecção viral, porém células fluorescentes na ausência de infecção viral (autofluorescentes) foram observadas nos sistemas ICP10 ZsGreen1-1 (F3R3 ZsGreen1-1 ou F4R3 ZsGreen1-1), mas não no sistema celular controle, que continha apenas células com o vetor pZsGreen1-1 (Vo). Pontos autofluorescentes distribuíam-se homoganeamente na monocamada celular e, curiosamente, as células autoflorescentes se dispunham em pares isolados ou em grupos binários, estando muito próximas umas das outras (Figura I. 9). Ocasionalmente, foram identificadas células autofluorescentes únicas isoladas, porém estas células tinham como característica o tamanho aumentado.

A autofluorescência em questão não se refere à fluorescência basal. A fluorescência basal é expressa por todas as células como um fundo (*Background*) observado por microscopia de fluorescência ou uma fluorescência fraca detectada por citometria de fluxo. A autofluorescência visualizada nas cavidades é expressa apenas por algumas células e resulta da ativação do sistema repórter de forma alternativa à ativação via VP16, diferenciando-se assim da fluorescência basal.

**Figura I. 9:** Autofluorescência e morfologia celular apresentada por células ICP10 ZsGreen1-1 48 h após a preparação das placas. Imagens A1 e A2 contendo células autofluorescentes dispostas em duplas ou grupos na monocamada celular (Setas indicativas) (10 x). Imagens B1 e B2 demonstrando células dispostas em duplas na monocamada celular com morfologia sugestiva de prévia divisão celular (Setas indicativas) (40 x). Células mantidas em meio DMEM acrescido de 10% de SFB e analisadas por microscopia de fluorescência.



Durante os ensaios foi efetuado o isolamento celular por diluição limitante das células F4R3 ZsGreen1-1 na tentativa de eliminar células com autofluorescência, deixando apenas clones de células induzíveis por vírus. Ao final do isolamento, realizado em placas de 96 cavidades

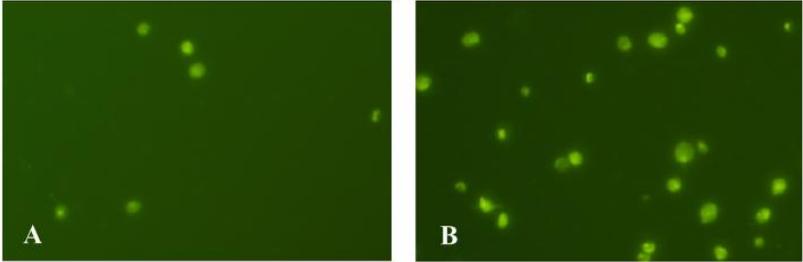
## Capítulo I – Resultados e discussão 78

contendo de 1 a 10 células por cavidade, obteve-se um clone denominado de clone 18. Testes subsequentes por citometria de fluxo, porém, demonstraram que o clone 18 isolado não apresentava um sistema repórter funcional através da indução viral pelo HSV-2, sendo a cultura deste isolado descontinuada.

Partindo dos resultados obtidos pelo isolamento, surgiu a hipótese de que a autofluorescência pudesse surgir em consequência de alguma condição da cultura celular. O SFB adicionado ao meio de cultura celular poderia consistir nessa condição, pois é uma fonte rica em proteínas, metabólitos intermediários, fatores de crescimento, lipídeos e hormônios. Estes constituintes do SFB podem atuar na regulação, por estímulo ou inibição, da proliferação celular e em algumas situações na diferenciação de células em cultura (FRESHNEY, 2005). As células avaliadas na presença e ausência de 10% de SFB mostraram um aumento no número de células autofluorescentes quando mantidas na presença de SFB em relação às células sem SFB (dados não mostrados).

A exposição das células a diferentes concentrações de SFB (0,5%, 2%, 5%, 10%, 20% e 50%), utilizadas para avaliar a influência da concentração do SFB sobre a autofluorescência, não resultou em alterações visíveis por microscopia de fluorescência. Entretanto, uma associação entre a concentração celular e a autofluorescência pode ser constatada. Em análises subsequentes com maior variação da concentração celular também pode ser observada relação entre a concentração celular e a autofluorescência. Quanto maior a concentração celular maior o número de células autofluorescentes (Figura I. 10).

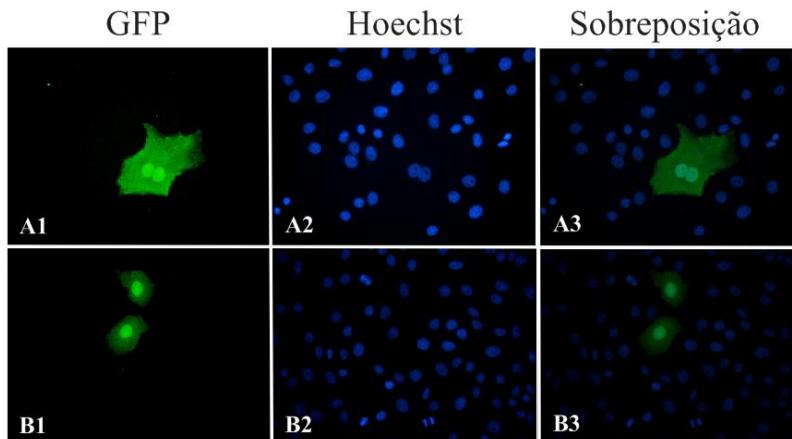
**Figura I. 10:** Imagem representativa de células autofluorescentes em cavidades com diferentes concentrações celulares 48 h após a preparação das placas. Imagem por microscopia de fluorescência (20 x) de células autofluorescentes em cavidades com  $0,8 \times 10^5$  células/ mL (A) e de células autofluorescentes em cavidades com  $3,33 \times 10^5$  células/ mL (B).



#### I.4.5 Morfologia das células autofluorescentes

De acordo com a morfologia apresentada pelas células autofluorescentes, a improvável associação da autofluorescência com a presença de diferentes concentrações de SFB e sua possível relação com a concentração celular, foi avaliada a disposição nuclear das células contendo autofluorescência por coloração com Hoechst. O Hoechst possui afinidade pelo DNA celular expressando fluorescência azul, sendo um reagente ideal para a análise da morfologia do núcleo celular em estudos de ciclo ou mecanismos de morte celular. Os resultados visualizados por microscopia sugeriram que a presença da autofluorescência em células ICP10 ZsGreen1-1 estaria associada com a divisão celular, visto que a morfologia das células coincidiram com a morfologia característica do processos de divisão celular (Figura I. 11).

**Figura I. 11:** Disposição dos núcleos das células autofluorescentes F4R3 ZsGreen1-1 coradas com Hoechst (40 x). (A1 e A3) Células autofluorescentes em disposição sugestiva de processo de divisão celular, com duplicação do núcleo sem separação citoplasmática e apresentando tamanho aumentado. (B1 e B3) Células autofluorescentes dispostas em duplas na monocamada celular ilustrando a característica comumente visualizada por microscopia de fluorescência. Imagens obtidas 24 h após a preparação da lâmina de cultura.



Baseando-se nos dados obtidos, levantou-se a hipótese de que alguma proteína, fator ou via sinalizadora da divisão celular poderia ativar o promotor ICP10, desencadeando a expressão da autofluorescência. Isso também justificaria a maior autofluorescência apresentada pelas células cultivadas na presença de SFB, pois o soro estimula a divisão celular. Esta hipótese é fortemente sustentada quando integrada aos dados encontrados na literatura, mostrados a seguir.

Como já descrito, para a ocorrência da indução do promotor viral ICP10 pelos vírus HSV há necessidade da interação da proteína VP16 com fatores celulares (Oct-1 e HCF-1), formando o VIC, que leva a expressão dos genes IE (WHITLEY et al., 1998; WYMER et al., 1989; WYSOCKA; HERR, 2003). Dos fatores transcricionais contribuintes para a ativação da expressão dos genes IE, o HCF-1 é essencial. O HCF-1 possui tamanha importância que em situações específicas pode induzir a expressão de genes IE na ausência de formação de complexo VIC, indicando a existência de vias alternativas de regulação dos genes IE (KRISTIE et al., 2010). Sendo assim, o sistema repórter construído com base nos princípios de ativação do promotor ICP10 poderia, da mesma forma, estar submetido a outras vias de regulação que não via VIC.

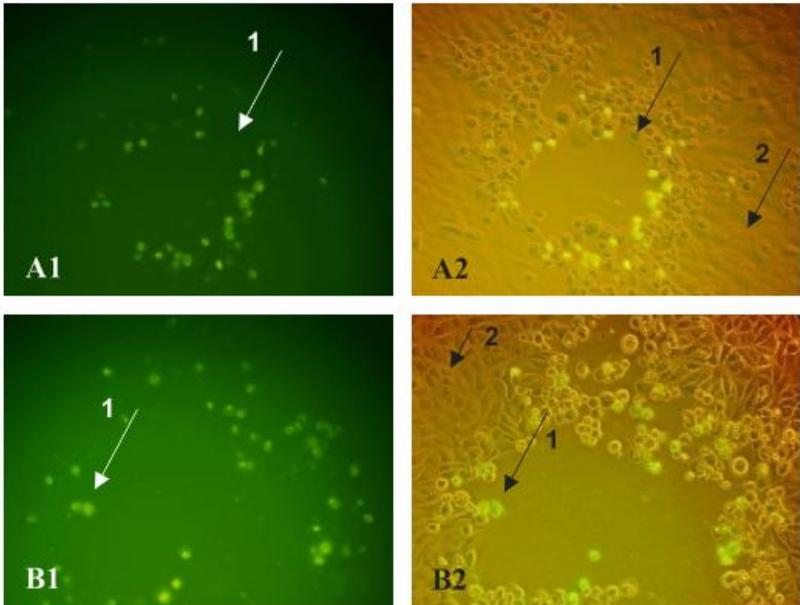
O fator celular HCF-1, além de participar da formação do complexo indutor de ICP10, interage com uma variedade de fatores celulares implicando na mediação de diversas vias metabólicas e sendo um integrante fundamental de processos biológicos como o de regulação gênica, proliferação celular e progressão do ciclo celular (KNEZ et al., 2006; KRISTIE et al., 2010). Esse fator foi identificado formando complexos com a proteína pRB (Proteína do Retinoblastoma) e com fatores de transcrição da família E2F durante o ciclo celular nas fases G1 e S. A pRB é uma proteína conhecidamente reguladora do ciclo celular e que esta acoplada aos fatores de transcrição da família E2F (KNEZ et al., 2006; TYAGI et al., 2007). Conforme relatado por Hanson e colaboradores (1994), o promotor ICP10 sofre regulação por proteínas do ciclo celular incluindo a pRB. Quando hipofosforilada a pRB tem papel repressor de E2F, porém sob condições favoráveis sofre fosforilação por cinases dependente de ciclina, resultando em uma mudança conformacional com consequente diminuição da afinidade da pRB pelos fatores de transcrição E2F. A baixa afinidade libera os fatores E2F, fundamentais agentes da expressão de genes que proporcionam a passagem da fase G1 para a fase S e desenvolvimento da fase S do ciclo celular (BARTEK; LUKAS, 2011; BURKE; HURA; RUBIN, 2012; COBRINIK, 2005; FRESHNEY, 2005; HANSON et al., 1994; IKEDA; JAKOI; NEVINS, 1996). A propriedade inibitória da progressão da fase G1 apresentada pelos HSV, em parte, parece estar conectada com a competição de VP16 por HCF-1, impedindo a sua associação normal com moléculas da família E2F e progressão do ciclo celular, o que reforça a ideia levantada (KNEZ et al., 2006; TYAGI et al., 2007).

Em conclusão, considerando que o HCF-1 pode agir independentemente da formação do complexo VIC, por vias alternativas, induzindo a expressão de genes IE e que o fator HCF-1 esta intimamente associado com as etapas do ciclo celular, pode-se supor que o recrutamento de HCF-1, durante os processos que resultam na divisão celular, poderia proporcionar o desencadeamento da indução do sistema repórter nas células. Assim, a autofluorescência apresentada pelas células, sugestivamente durante a divisão celular, estaria sob o regimento de vias alternativas, sendo o fator HCF-1 a peça chave para explicar tal expressão. Estudos mais aprofundados sobre ciclo celular e sua relação com a autofluorescência não foram efetuados em virtude deste não ser o foco do trabalho.

### **I.4.6 Indução do sistema repórter: avaliação por microscopia de fluorescência**

A indução do sistema celular repórter pode ser observada através do surgimento de células fluorescentes na região de apresentação do efeito citopático produzido pelo HSV-2 (Figura I. 12). Placas de lise circundadas por células citomorfologicamente alteradas, indicando infecção viral, expressaram clara fluorescência, enquanto as células periféricas à região da placa de lise não retrataram qualquer fluorescência. A partir do observado por microscopia, confirmou-se a ocorrência de indução do sistema repórter pelos vírus HSV-2, 48 h após a infecção. A indução do sistema também ocorreu utilizando o HSV-1, mais detalhes são discutidos no item I.4.10. Resultados de indução consistentes foram obtidos apenas com o sistema F4R3 ZsGreen1-1 enquanto os testes de indução realizados com o sistema F3R3 ZsGreen1-1 não apresentaram indução efetiva. O grupo celular F3R3 ZsGreen1-1, apesar de não apresentar um sistema funcional, tem resultados discutido no decorrer deste trabalho por sugestivamente as diferenças entre F4R3 e F3R3 apontarem sítios de regulação importantes para a indução de ICP10.

**Figura I. 12:** Células fluorescentes circundando o efeito citopático produzido pelo HSV-2 (10 x). (A) Setas 1 indicando região do efeito citopático e seta 2 indicando células sem efeito citopático e sem fluorescência (B) Setas 1 indicando exemplos de células fluorescentes e seta 2 indicando células sem efeito citopático e sem fluorescência. Células mantidas em DMEM + 1% de PS e 0,2 mg/mL de G418. Infecção com suspensão viral a 180 UFP/mL (MOI = 1,2 x 10<sup>-3</sup>). Imagens obtidas 48 h após a infecção viral.



De acordo com dados da literatura (KUNG et al., 2000) o promotor ICP10 é ativado e a RR1 transcrita precocemente durante a replicação viral, assim esperava-se a presença de fluorescência ainda nas primeiras horas após infecção. Avaliações periódicas por microscopia de fluorescência foram efetuadas a partir da terceira hora após a infecção nos testes preliminares. Ao final dos ensaios, foi constatada a necessidade de 48 h de incubação para a fluorescência das células repórteres ser visualizada por microscopia de fluorescência.

Talvez a visualização tardia da fluorescência reflita a ocorrência de fotobloqueamento da GFP, produzida de forma menos expressiva durante o período inicial de indução ou por o promotor não ser forte o suficiente para efetuar a indução detectável precocemente. A expressão tardia poderia também simplesmente se associar a necessidade de um

tempo prolongado para a ativação, transcrição, maturação e acúmulo suficiente de GFP para a detecção.

A proteína GFP pode sofrer fotobloqueamento por ser oxidada por metabólitos celulares ou por componentes do meio de cultura, comprometendo sua visualização devido à conversão da GFP em proteína de fluorescência vermelha. Foram descritas melhorias na estabilização de proteínas fluorescentes e redução do fotobloqueamento quando células expressando GFP foram cultivadas em meio DMEM sem as vitaminas riboflavina e piridoxal, bem como em meio sem essas vitaminas e com adição de rutina. A rutina, conhecida também por vitamina P, é um bioflavonóide com atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênica, hepatoprotetora entre outras propriedades. Este bioflavonóide é amplamente distribuído no reino vegetal, tendo aplicações farmacológicas diversas. A inibição do fotobloqueamento de proteínas fluorescentes pela rutina provavelmente acontece em função de sua propriedade antioxidante, porém, desconhece-se o mecanismo exato de sua ação (BECHO; MACHADO; GUERRA, 2009; BOGDANOV; KUDRYAVTSEVA; LUKYANOV, 2012; MICROMEDEX, 2014).

Com base no descrito por Bogdanov e colaboradores (2012) a rutina foi adicionada na tentativa de reduzir um possível fotobloqueamento nas células F4R3 ZsGreen1-1 expressando GFP. A fluorescência observada por microscopia, no entanto, não pareceu sofrer forte alteração, tanto quando a rutina foi adicionada ao PBS, usado alternativamente ao meio sem vitaminas, quanto ao meio DMEM contendo todas as vitaminas (BOGDANOV et al., 2009; BOGDANOV et al., 2012).

### **I.4.7 Fluorescência celular: avaliação em leitor de fluorescência**

A fim de proceder com os ensaios utilizando o sistema repórter, tornou-se fundamental saber o quanto a fluorescência basal acrescida da autofluorescência em células não infectadas poderia comprometer os testes de indução. Por microscopia já havia sido constatada a indução efetiva do sistema repórter pelos vírus HSV-2 (Item I. 4. 6). Entretanto, a automatização da metodologia de detecção poderia facilitar e acelerar tal procedimento, trazendo benefícios à utilização da técnica.

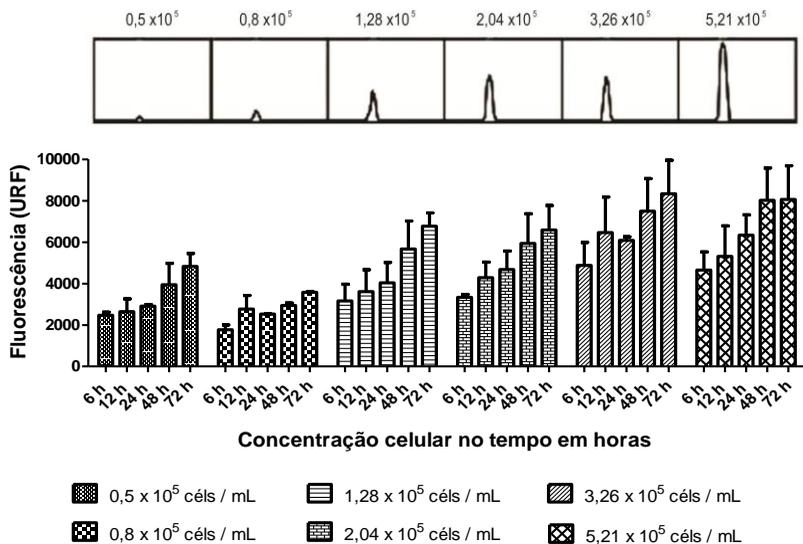
A primeira alternativa levantada para a automatização foi o uso do leitor de fluorescência - SoftMax<sup>®</sup> Pro -Molecular Devices, utilizando placas de 24 cavidades para leitura direta da fluorescência celular. Conforme o fabricante, o SoftMax<sup>®</sup> Pro faz leituras de

absorbância, luminescência e fluorescência em placas, permitindo diferentes modos de leitura em comprimentos de onda fixos ou para realização de espectros.

As análises utilizando o leitor não retrataram variação significativa da fluorescência nas células não infectadas no decorrer dos tempos de análise, porém ocorreu variação significativa da fluorescência de acordo a concentração celular depositada em cada cavidade (Figura I. 13). Obviamente, quanto maior o número de células maior o somatório da fluorescência basal. Além disso, caso adotado como verdadeira a hipótese da relação entre autofluorescência e divisão celular, os resultados seriam concordantes, afinal quanto maior o número de células em uma cavidade maior a chance de ocorrência de divisão celular e maior o número de células autofluorescentes por campo, em condições adequadas e não limitantes de cultura.

A variação da fluorescência no espectrograma confirmou a correta leitura da emissão em 593 nm, visto que os picos máximos ocorreram neste comprimento de onda. Pode ser constatada também uma intensificação dos picos no espectrograma associada ao aumento da concentração celular, concordando com os dados de leitura da fluorescência retratados na figura I. 13.

**Figura I. 13:** Fluorescência apresentada por células F4R3 ZsGreen1-1, não infectadas, em diversas concentrações celulares e em diferentes tempos. Análises por ANOVA dois fatores mostraram diferença significativa da fluorescência \*\*\* (P < 0,0001) entre as concentrações celulares avaliadas, porém não demonstraram diferença significativa entre os tempos de incubação analisados. Os dados representam a média +/- desvio padrão de dois ensaios. Acima do gráfico encontra-se o espectrograma de fluorescência das células F4R3 ZsGreen1-1, no qual se observa um aumento na intensidade de fluorescência, retratada pelo aumento da intensidade dos picos, proporcional às concentrações celulares analisadas.



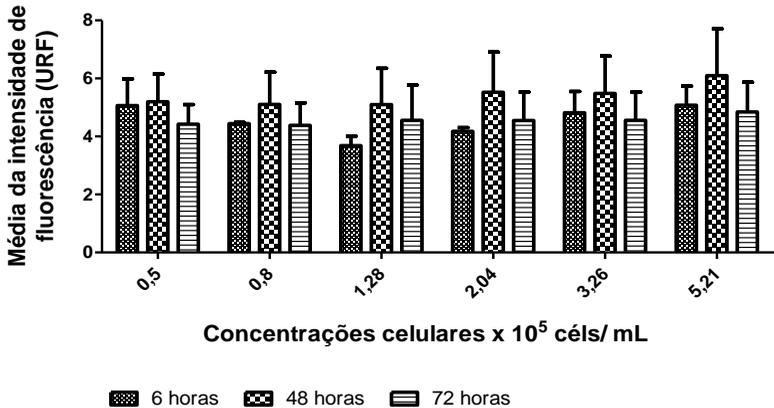
**Legenda:** URF – Unidades relativas de fluorescência. Célis – células.

Tentativas de padronizar a leitura em placas contendo células induzidas por infecção viral não foram satisfatórias. Provavelmente, as células infectadas distribuem-se heterogeneamente nas cavidades e as leituras *endpoint* não são adequadas para analisar a expressão de fluorescência em células induzidas por vírus. Além da dependência da concentração celular adotada, cada tipo de placa de cultura celular utilizada necessita de um processo de padronização. Devido às variáveis apresentadas durante os ensaios, optou-se por não utilizar o leitor de fluorescência como método de detecção.

### I.4.8 Fluorescência celular: avaliação por citometria de fluxo

A metodologia de detecção testada alternativamente ao leitor de fluorescência foi a citometria de fluxo. De acordo com os dados obtidos, observou-se que por citometria de fluxo as diferentes concentrações celulares e os tempos de incubação não alteravam significativamente a expressão da fluorescência das células F4R3 ZsGreen1-1 não infectadas, indicando ser esta uma metodologia de detecção promissora (Figura I. 14).

**Figura I. 14:** Avaliação da média da intensidade de fluorescência apresentada por células F4R3 ZsGreen1-1, não infectadas, em diversas concentrações celulares e em diferentes tempos por citometria de fluxo. Análise por ANOVA dois fatores não mostrou diferenças significativas na média da intensidade de fluorescência para as distintas concentrações celulares e para os tempos de incubação analisados. Os dados representam a média +/- desvio padrão de dois ensaios.



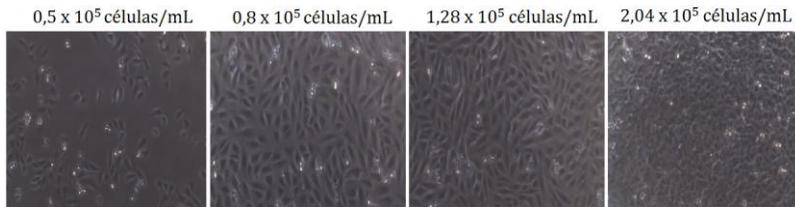
**Legenda:** URF- Unidades relativas de fluorescência. Céls – células.

A não ocorrência de diferenças significativas pode acontecer em função das características metodológicas da citometria de fluxo. Como por citometria de fluxo as células são avaliadas de forma individualizada, não há somatório da fluorescência basal como ocorre com o uso do leitor de fluorescência.

A constatação de que a concentração celular e os tempos de incubação não alteraram a leitura da fluorescência por citometria de

fluxo, fez com que a escolha da concentração celular para os demais ensaios de indução fosse escolhida com base no aspecto de distribuição, confluência e homogeneidade das células nas cavidades, 24 h após a preparação das placas. Como observado na figura I. 15, a concentração celular de  $0,8 \times 10^5$  células/mL forma em 24 h uma monocamada com ausência de sobreposição celular, porém com confluência de aproximadamente 100% e com possibilidade de acomodar possíveis células em proliferação durante o tempo de ensaio de indução, sem comprometer a homogeneidade e adequabilidade da monocamada celular. Dessa forma, a concentração celular de  $0,8 \times 10^5$  células/mL foi utilizada nos demais ensaios avaliados por citometria de fluxo.

**Figura I. 15:** Imagens por microscopia óptica - campo claro (4 x) das células F4R3 ZsGreen1-1 em diferentes concentrações 24 h após a preparação das placas.



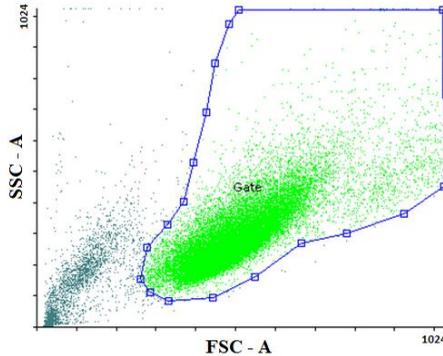
### I.4.9 Indução do sistema repórter por HSV-2: avaliação por citometria de fluxo

A marcação celular com proteínas fluorescentes integradas às células possibilita sua quantificação utilizando-se a metodologia de citometria de fluxo. As células podem ainda ser purificadas com base em seu nível de expressão de fluorescência para posteriores estudos através de diferentes técnicas de detecção (EL-SHERBINI et al., 2009; LOPEZ, 2006). Por citometria de fluxo, nos diagramas gerados pelos *softwares*, podem ser demarcadas áreas (*gates*) para as análises. O *gate* é criado para delimitar regiões contendo uma população de interesse e/ou eliminar eventos indesejáveis deixando disponível apenas o grupo celular que será empregado no estudo ou analisado estatisticamente (PURSLEY, 2006).

Inicialmente, por não haver conhecimento prévio sobre o comportamento das células transfectadas e submetidas à infecção, foi demarcado um *gate* isolando o grupo de células viáveis para realização

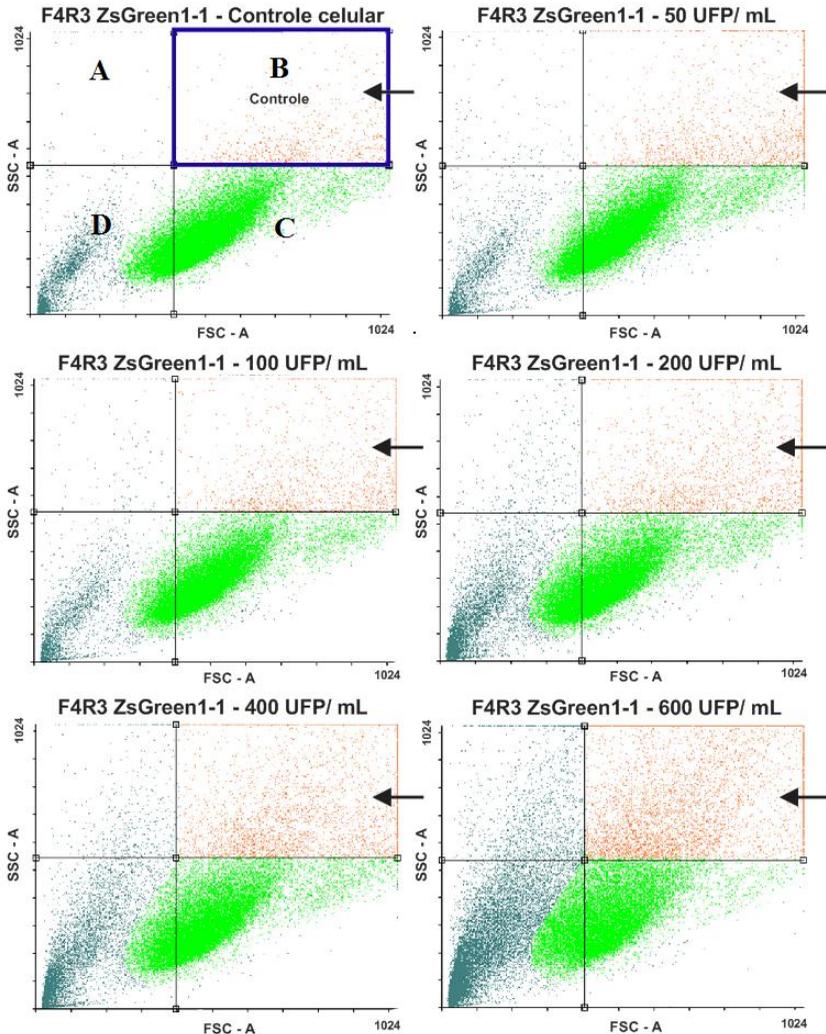
das análises estatísticas e descartando as células mortas e os resíduos celulares conforme exemplificado na figura I. 16.

**Figura I. 16:** *Dot plot* ilustrando a área selecionada (-□-) para análise estatística dos grupos celulares avaliados.



No decorrer dos ensaios, um comportamento padrão das células infectadas, sujeitas a expressão de fluorescência por indução do sistema repórter, foi observado. Essas células demonstraram tamanho aumentado e maior complexidade, havendo deslocamento dos eventos para a região do quadrante superior direito - quadrante B (Figura I. 17). Isso é esperado se consideradas as características celulares apresentadas por células infectadas. Assim, um *gate* no quadrante superior direito dos *dot plots* proporcionou a construção de histogramas com melhor definição ilustrativa das diferenças de expressão da fluorescência das células induzidas em relação às concentrações virais aplicadas. Na figura I. 17 constata-se o aumento do número de eventos na região do quadrante B proporcionalmente ao aumento da concentração viral utilizada para a indução. Como os vírus levam as células à morte, um aumento no número de eventos na região que retrata células mortas e restos celulares, quadrantes A e D, também podem ser visualizados. Todos os histogramas dispostos neste trabalho foram construídos para cada grupo celular utilizando um *gate* semelhante ao ilustrado na figura I.17. Estes histogramas possuem apenas função representativa e foram obtidos com base em ensaios isolados. Dados correspondentes aos ensaios independentes, obtidos com o *gate* demarcados de forma semelhante ao ilustrado na figura I. 16 estão retratados nas figuras com gráficos contendo a análise estatística.

**Figura I. 17:** *Dot plots* demonstrando a área selecionada para a construção dos histogramas (quadrantes B, indicados pelas setas). Observa-se um aumento no número de eventos nos quadrantes indicados pelas setas proporcional ao aumento da concentração viral utilizada para infecção e indicada em UFP/ mL. Dados obtidos 48 h após a infecção viral com aquisição de 30000 eventos por análise. Os *Dot plots* apresentados referem-se a um ensaio isolado e tem apenas função ilustrativa.



Como havia sido detectada a expressão de GFP visível somente 48 h após a infecção por microscopia de fluorescência, e pelo fato da citometria de fluxo ser uma metodologia mais sensível que a microscopia de fluorescência, os tempos testados para a padronização da citometria de fluxo foram 24 e 32 h pós-indução do sistema, além do tempo de 48 h já estabelecido para a microscopia.

As concentrações virais testadas resultam entre 20 a 240 UFP/cavidade. Essa variação de número de placas de lise permitiu análises por microscopia, que necessitam de menor número de UFPs para adequada leitura, até quantidades maiores que mantem um número considerável de células infectadas para estudos por citometria de fluxo. O ajuste da concentração mais alta de vírus utilizada considerou a concentração que proporcionava a maior quantidade de células infectadas e não lisadas nos tempos escolhidos para a leitura no citômetro de fluxo.

A concentração viral utilizada para indução do sistema esta expressa em MOI (*Multiplicity Of Infection*) e em UFP/cavidade na tabela I. 1. O MOI representa a proporção de partículas virais/célula. Assim, um MOI de 1 indica a existência de 1 partícula viral para cada célula. A baixa concentração viral relativa, representada pelo baixo MOI, reforça a sensibilidade do sistema repórter F4R3 ZsGreen1-1. Em algumas análises de indução viral reportadas na literatura são utilizados MOIs consideravelmente mais altos, como MOI 3, para indução detectável de um sistema repórter (KUNG, 2005; WANG et al., 2002).

**Tabela I. 1:** Concentrações virais, em diferentes unidades, utilizadas para infecção celular.

UFP/mL	UFP/ Cavidade	MOI*	Relação n° partículas virais / n° células
<b>50</b>	20	$3,3 \times 10^{-4}$	1 / 3030
<b>100</b>	40	$6,7 \times 10^{-4}$	1 / 1492
<b>200</b>	80	$1,3 \times 10^{-3}$	1 / 770
<b>400</b>	160	$2,7 \times 10^{-3}$	1 / 370
<b>600</b>	240	$4,0 \times 10^{-3}$	1 / 250

\* $0,8 \times 10^5$  células/mL – 750 µL/cavidade = 60000 células/cavidade.

### **I.4.9.1 Indução de células não transfectadas (Vero) e de células ZsGreen1-1 (Vo) com HSV-2**

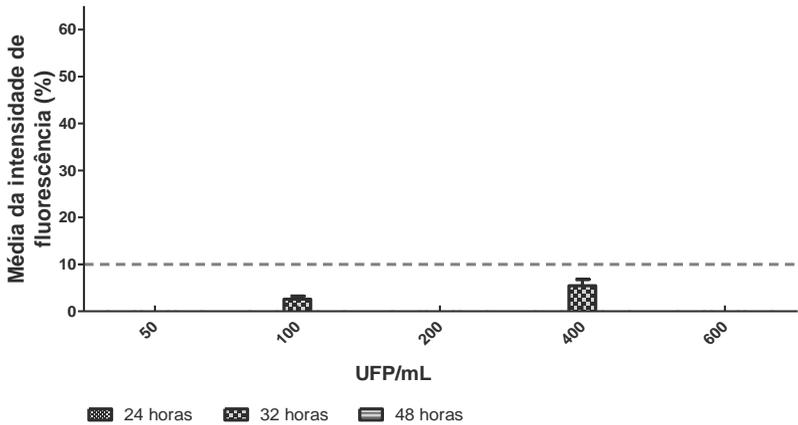
Os vírus do HSV produzem efeito citopático, que modifica as células morfológicamente. Para garantir que essas modificações não desencadeariam alterações na fluorescência expressa pelas células, independentemente da existência de um sistema repórter associado, foram analisadas células Vero não transfectadas e infectadas com HSV-2 por citometria de fluxo.

Como observado na figura I. 18, embora exista diferença significativa na média da intensidade de fluorescência em função do tempo de incubação, nenhum dos grupos celulares apresentou média da intensidade de fluorescência superior a 10% em relação ao controle celular não infectado. Nos histogramas da figura I. 19 também não são observadas alteração dos picos de fluorescência no canal do FITC (Isotiocianato de Fluoresceína) em nenhuma das concentrações virais analisadas para células Vero não transfectadas comparativamente ao controle celular. A sobreposição de histogramas não evidencia nenhum deslocamento do pico entre os diferentes histogramas.

Com a finalidade de verificar se a infecção viral poderia de alguma forma levar à indução da expressão de GFP pelo vetor pZsGreen1-1, mesmo este não possuindo um promotor inserido, foram realizados os testes de indução viral com HSV-2 nas células Vo (ZsGreen1-1). Como pode ser visualizado na figura I. 20 houve diferença significativa na média da intensidade de fluorescência tanto em função dos tempos de incubação como da concentração viral utilizada. A maior fluorescência expressa em relação ao controle celular não infectado ocorreu em concentrações virais relativamente altas, 400 e 600 UFP/mL, e apenas após 48 horas de incubação. Todavia, a maior fluorescência expressa ficou em torno de 10% acima da obtida para o controle celular não infectado.

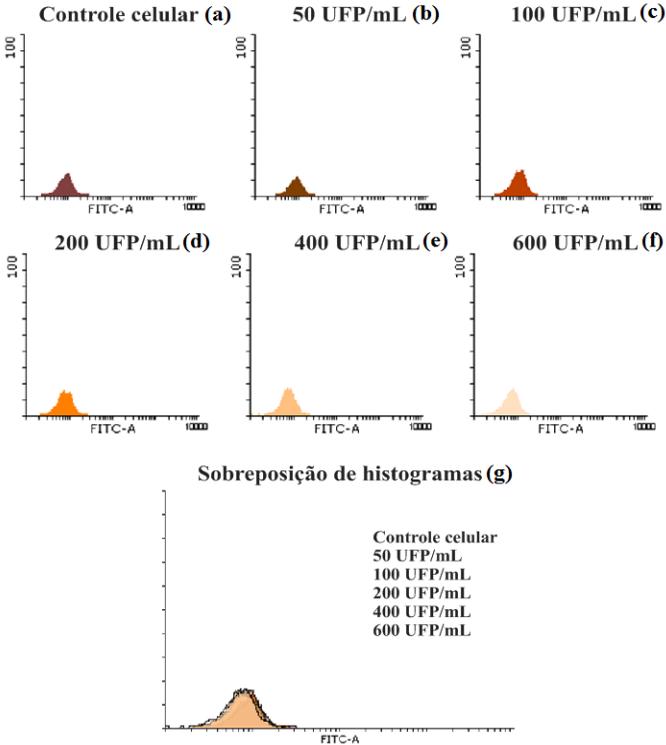
Nos histogramas (Figura I. 21) não é evidenciado deslocamento notável do pico comparativamente ao controle celular em nenhuma das concentrações virais utilizadas para a infecção. Na sobreposição dos histogramas apenas deslocamentos mínimos na intensidade dos picos podem ser observados.

**Figura I. 18:** Avaliação, por citometria de fluxo, da média da intensidade de fluorescência após infecção das células Vero não transfectadas com HSV-2. Em análise por ANOVA dois fatores, não pode ser observada diferença significativa na média da intensidade de fluorescência ( $P > 0,05$ ) em relação as concentrações de vírus utilizadas para a infecção, porém existe diferença significativa \*\* ( $P < 0,01$ ) em relação aos tempos de incubação. O incremento da fluorescência em relação ao controle celular, em todas as condições, não ultrapassou 10%. Os dados representam a média +/- desvio padrão de dois ensaios.

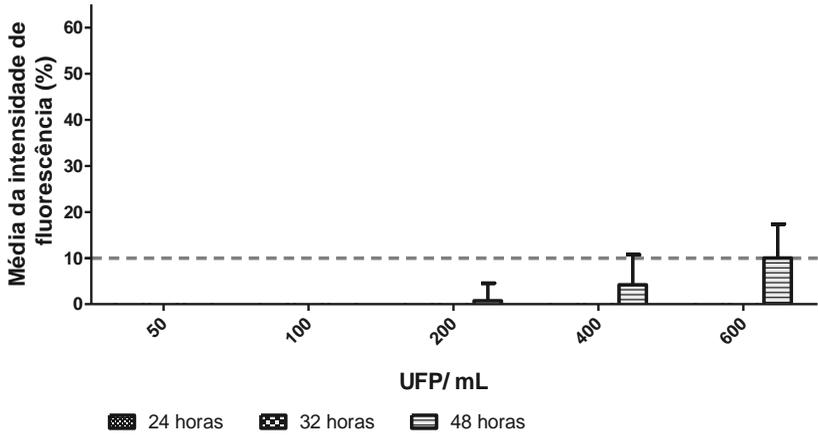


**Legenda:** UFP – Unidades formadoras de placa.

**Figura I. 19:** Representação por histogramas (FITC x n° de eventos) dos resultados obtidos por citometria de fluxo para as células Vero não transfectadas e infectadas com HSV-2. Quando comparados os histogramas referentes às células infectadas (b – f) com o histograma do controle celular (a) ou quando analisada a sobreposição de histogramas (g), não podem ser observadas diferenças na intensidade dos picos. Dados obtidos 48 h após a infecção viral.

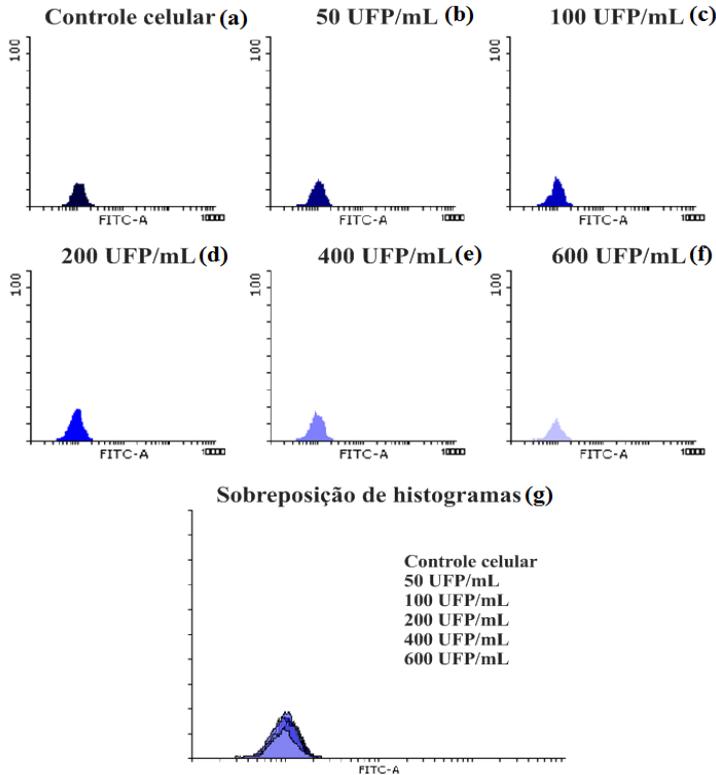


**Figura I. 20:** Avaliação, por citometria de fluxo, da média da intensidade de fluorescência após infecção das células Vo (ZsGreen1-1) com HSV-2. Em análise por ANOVA dois fatores, pode-se observar uma diferença significativa na média da intensidade de fluorescência \*\*\* ( $P < 0,0001$ ) em decorrência das concentrações virais utilizadas para a infecção e diferença significativa \* ( $P < 0,05$ ) devido aos tempos de incubação empregados, porém o incremento da fluorescência em relação ao controle celular não ultrapassou 10%. Os dados representam a média +/- desvio padrão de dois ensaios.



**Legenda:** UFP – Unidades formadoras de placa

**Figura I. 21:** Representação por histogramas (FITC x n° de eventos) dos resultados obtidos por citometria de fluxo para as células Vo (ZsGreen1-1) infectadas com HSV-2. Quando comparados os histogramas referentes às células infectadas (b – f) com o histograma do controle celular (a), ou quando analisada a sobreposição de histogramas (g), não pode ser observada diferenças consideráveis na intensidade dos picos. Dados obtidos 48 h após a infecção viral.



Os resultados de indução das células Vero não transfectadas e das células Vo garantem que a infecção viral altera muito pouco a fluorescência das células analisadas, não interferindo nos testes de indução e nos resultados finais. A leve expressão de fluorescência em altas concentrações virais para as células Vo pode ser consequência da alteração expressiva da morfologia da maior parte das células com concentrações virais altas a ponto de levar a um desequilíbrio bioquímico tão caótico que de algum modo leva ao aparecimento da

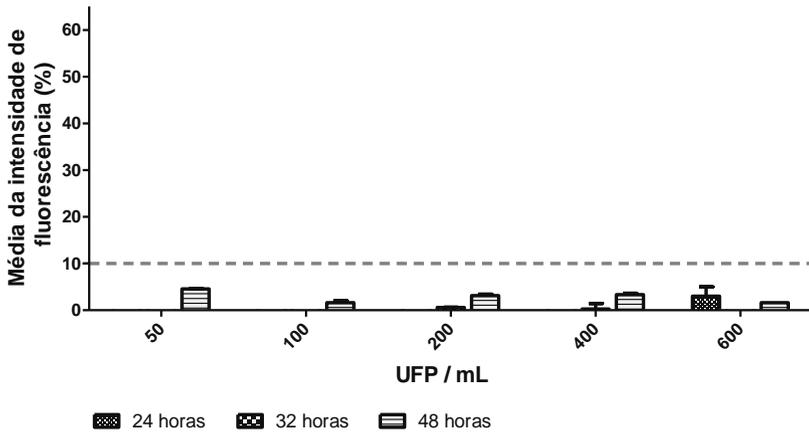
fluorescência em virtude da presença do vetor. Outra possibilidade, porém muito pouco provável, seria a existência de contaminação do controle Vo com um pequeno número de células contendo o vetor acrescido da região promotora ICP10 (Vi). Essa contaminação proporcionaria o aparecimento de células com fluorescência induzida nas altas concentrações virais, pois nessas condições praticamente todas as células estão infectadas pelos vírus, o que aumentaria a probabilidade de expressão da fluorescência em função da infecção viral.

### **I.4.9.2 Indução das células F3R3 e F4R3 ZsGreen1-1 com HSV-2**

O primeiro sistema testado foi o sistema F3R3 ZsGreen1-1. Por microscopia de fluorescência não pode ser detectado fluorescência neste sistema, mas funcionalidade do sistema foi avaliada também por citometria de fluxo, com a qual foram obtidos resultados negativos de indução. O sistema mostrou variação da média da intensidade de fluorescência estatisticamente significativa tanto em função da concentração viral utilizada quanto dos tempos de incubação. Apesar da variação, as médias da intensidade de fluorescência ficaram muito próximas aos valores do controle celular, retratando o baixo potencial de indução do sistema por quaisquer das concentrações virais e tempos de incubação testados (Figura I. 22). A fraca indução do sistema pode ser observada de forma mais visual nos histogramas, nos quais não há alterações importantes nos picos de fluorescência (Figura I. 23).

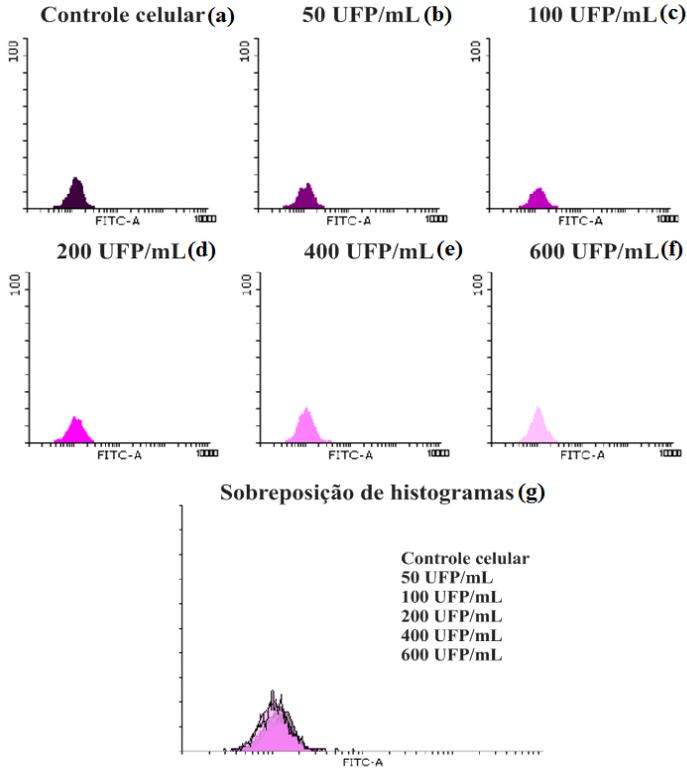
# Capítulo I – Resultados e discussão 98

**Figura I. 22:** Avaliação, por citometria de fluxo, da média da intensidade de fluorescência das células F3R3 – ZsGreen1-1 após infecção com HSV-2. Em análise por ANOVA dois fatores, pode ser observada diferença significativa na média da intensidade de fluorescência \*\* ( $P < 0,01$ ) em decorrência das concentrações virais utilizadas para a infecção e também devido aos tempos de incubação empregados \*\*\* ( $P < 0,0001$ ), porém o incremento da fluorescência em relação ao controle celular não ultrapassou 10%. Os dados representam a média +/- desvio padrão de dois ensaios.



**Legenda:** UFP – Unidades formadoras de placa

**Figura I. 23:** Representação por histogramas (FITC x nº de eventos) dos resultados obtidos por citometria de fluxo para as células F3R3 ZsGreen1-1 infectadas com HSV-2. Quando comparados os histogramas referentes às células infectadas (b – f) com o histograma do controle celular (a) ou quando analisada a sobreposição de histogramas (g), não pode ser observado diferenças consideráveis na intensidade dos picos. Dados obtidos 48 h após a infecção viral.

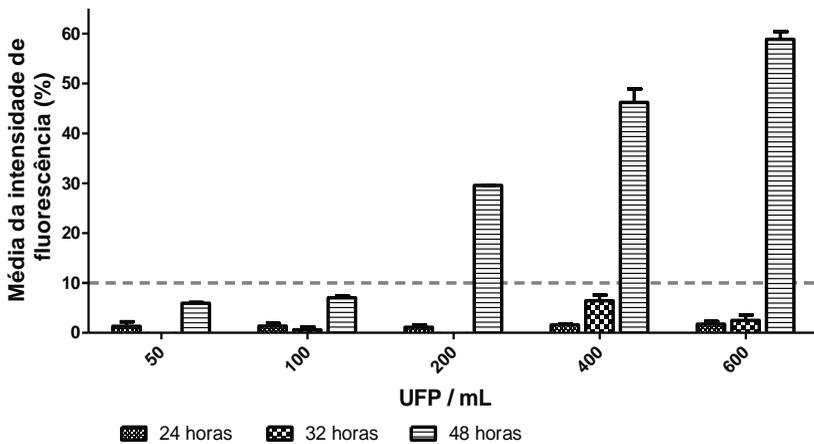


O sistema F4R3 ZsGreen1-1, ao contrário do sistema F3R3 ZsGreen1-1 e em concordância com o constatado por microscopia, mostrou-se eficientemente induzido pela infecção viral. Como pode ser observado na figura I. 24, a indução do sistema foi proporcional à concentração viral utilizada para a infecção e diferença significativa pode ser vistas tanto em relação aos tempos de incubação como em relação às concentrações virais utilizadas. A indução efetiva foi observada apenas 48 h após a infecção viral, concordando com o

## Capítulo I – Resultados e discussão 100

constatado por microscopia. Com 200 UFP/mL, em 48 h de incubação, houve incremento da expressão da GFP em relação ao controle celular em cerca de 30% e de aproximadamente 60% com concentrações virais de 600 UFP/mL. Durante a padronização da metodologia foi constatado aumento da média da intensidade de fluorescência de até 110% em relação ao controle celular com concentrações virais de 600 UFP/mL.

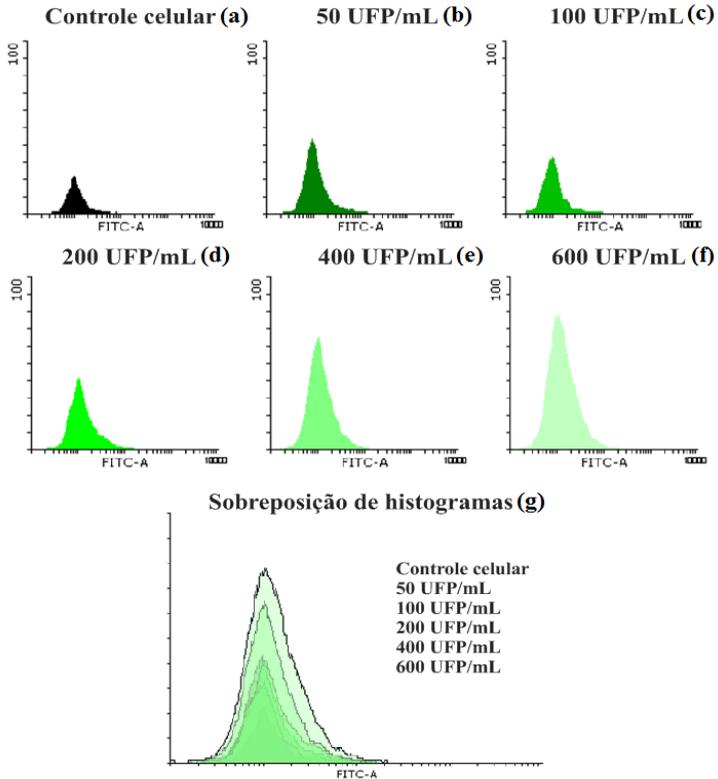
**Figura I. 24:** Avaliação, por citometria de fluxo, da média de intensidade da fluorescência após infecção das células F4R3 – ZsGreen1-1 com HSV-2. Em análise por ANOVA dois fatores, pode ser observada diferença significativa na média da intensidade de fluorescência \*\*\* ( $P < 0,0001$ ) em função das concentrações virais utilizada para a infecção e em relação aos diferentes tempos de incubação empregados \*\*\* ( $P < 0,0001$ ). A partir de 200 UFP/mL verifica-se incremento da fluorescência, em relação ao controle celular, acima de 10%. Os dados representam a média +/- desvio padrão de dois ensaios.



**Legenda:** UFP – Unidades formadoras de placa.

Nos histogramas, pode ser observada uma maior intensidade dos picos de fluorescência nas células infectadas (histogramas b – f) em relação ao controle celular (histograma a). Observa-se a formação de picos mais alargados e mais intensos nos grupos celulares infectados, o que indica um aumento no número de eventos expressando fluorescência e na intensidade de fluorescência expressa pelas células (Figura I. 25).

**Figura I. 25:** Representação por histogramas (FITC x n° de eventos) dos resultados obtidos por citometria de fluxo para as células F4R3 ZsGreen1-1 infectadas com HSV-2. Nos histogramas referentes aos grupos celulares infectados (b – f) observa-se um aumento da intensidade dos picos em comparação ao controle celular (a). Na sobreposição de histogramas (g) verifica-se a alteração da intensidade dos picos para os grupos celulares infectados com as diferentes concentrações virais. Dados obtidos 48 h após a infecção viral.



A não ativação do sistema F3R3 ZsGreen1-1 de forma semelhante ao ocorrido com as células F4R3 ZsGreen1-1 deve-se supostamente às diferenças de recobrimento da região promotora por cada inserto (Ver item I. 3.3.1). O sistema F3R3 foi montado sob a hipótese de que a presença no inserto do sítio de ligação para o VIC (TAATGARAT) seria suficiente para a ativação e expressão da GFP. O sistema F4R3 foi arquitetado sob a hipótese de que toda a região promotora da RR1 seria necessária para a funcionalidade do sistema

## Capítulo I – Resultados e discussão 102

(WILSON; MOHR, 2012; WYMER et al., 1989). Embora ambos os fragmentos contenham o sítio de ligação para o VIC, parece que para a correta ativação do sistema não basta apenas a disposição deste sítio no promotor.

A expressão proteica além de ser regulada por promotores distintos sofre influência de proteínas ligantes e elementos potencializadores (BOUWMAN; PHILIPSEN, 2002). Fatores que se ligam ao DNA influenciam a transcrição através de interações proteína-proteína e/ou por intercâmbio com outros fatores, resultando na estabilização e recrutamento de complexos para as regiões promotoras, como caracteristicamente ocorre com VIC (LANIA; MAJELLO; DE LUCA, 1997).

Conforme descrito por Wymer e colaboradores (1989), o promotor ICP10 possui sítios de regulação para Sp1, frequentemente apresentados por promotores imediatos e precoces dos HSV anteriormente a região TATA - box (KIM; DELUCA, 2002). O Fator de transcrição Sp1 é uma proteína expressa por diversos tecidos e com afinidade por regiões ricas em GC (GC - boxes), sendo bastante versátil e estando envolvido na transativação e expressão de vários genes (BOUWMAN; PHILIPSEN, 2002; IWAHORI et al., 2007). É estudada a sua participação no ciclo e diferenciação celular e no desenvolvimento e sobrevivência de alguns organismos (CHU; FERRO, 2005; LANIA et al., 1997). Uma variedade de promotores celulares e virais contem GC - boxes, que são encontradas próximas aos sítios de ligação de outros fatores de transcrição, sugerindo uma atuação em conjunto de Sp1 e outros fatores transcripcionais (CHU; FERRO, 2005; LANIA et al., 1997).

A regulação da transcrição via Sp1 associa-se supostamente a modificações pós-traducionais que essa proteína pode sofrer como glicosilação e fosforilação (CHU; FERRO, 2005; KIM; DELUCA, 2002). A fosforilação, que pode acontecer em diversas posições em Sp1, parece implicar em mudanças de afinidade de Sp1 pelo DNA e essas alterações afetam sua função sobre a expressão gênica (CHU; FERRO, 2005; KIM; DELUCA, 2002). Embora ainda não esteja claro como é feita a regulação, e se essas modificações pós-tradução realmente são as responsáveis pelo regimento da expressão gênica, alguns trabalhos como o de Kim e DeLuca (2002) indicam que essa teoria é verdadeira. No estudo de Kim e DeLuca (2002) é descrito que durante a infecção por HSV-1 ocorre hiperfosforilação de Sp1 e a hiperfosforilação reduz a

expressão de genes IE e E (IWAHORI et al., 2007; KIM; DELUCA, 2002).

Independentemente da forma de regulação via Sp1, sabe-se que esta proteína tem considerável relevância na regulação gênica. Greaves e O'Hare (1991), por exemplo, afirmam que a integridade das regiões ligantes de Sp1 demonstraram ser importantes para adequada ativação de promotores do HSV (GREAVES; O'HARE, 1991). Como a diferença estrutural básica dos insertos F3R3 e F4R3 consiste na presença ou ausência de três sítios ligantes de Sp1, anteriormente a região TATA-box e a região de ligação de VIC, sugere-se que esses fatores tenham alguma função na ativação de ICP10. Por os sítios de ligação de Sp1 serem frequentemente expressos em promotores IE do HSV e poderem participar em conjunto com outros fatores transcricionais, como já descrito, acredita-se que a ausência das regiões ligantes de Sp1 foi a responsável pela não ocorrência da indução do sistema repórter F3R3 Zsgreen1-1 por meio da infecção viral.

### **I.4.10 Indução do sistema repórter por HSV-1: avaliação por citometria de fluxo**

A especificidade do sistema repórter é garantida primeiramente pela propriedade de permissibilidade das células, pois fibroblastos são permissivos a um grupo seletivo de vírus. Esta propriedade depende inicialmente da existência de moléculas na superfície celular, que permitam a adsorção viral, e de todo um aparato replicativo celular (enzimas, proteínas, etc.), que possibilite a replicação viral nas células infectadas (FERREIRA, 2010). O sistema ainda garante sua especificidade através do mecanismo de ativação necessário para a indução do promotor viral, molecularmente particular ao HSV.

Análises de indução de um sistema repórter semelhante ao descrito neste trabalho, utilizando a região promotora de RR1 do HSV, foram efetuadas frente à infecção por outros vírus (CMV, VZV, adenovírus, influenza A e coxackievirus A16), não resultando em ativação do sistema repórter e reforçando sua característica seletiva. (LU et al, 2011). Entretanto, quando se trata dos dois tipos de HSV, tipo 1 e 2, que compartilham características como o sistema de ativação dos genes IE via VP16, a indução do promotor ICP10 poderia ocorrer por meio da infecção com o HSV-1 (WYSOCKA; HERR, 2003).

Em um estudo que avaliou a similaridade das sequências do HSV-1 e 2 não foram observadas variações acentuadas entre os tamanhos das regiões UL e US do genoma viral, bem como da porcentagem de citosina e guanina. A comparação da sequência de

## Capítulo I – Resultados e discussão 104

aminoácidos e dos sinais de início e de parada da transcrição dos genes também é semelhante, sendo a similaridade global dos nucleotídeos de 83% (DOLAN et al., 1998; WHO, 2013). Quando analisado, via BLASTn, o fragmento F4R3 obtido a partir do HSV-2 estirpe 333 com a região do genoma correspondente do HSV-1 estirpe KOS observou-se similaridade de 71% (GenBank: JQ780693.1). Todavia, apesar das semelhanças, são também constatadas diferenças entre os genomas do HSV-1 e 2, a região aminoterminal das proteínas RR1 do HSV, por exemplo, possuem relativamente baixa homologia (CHUNG et al., 1989).

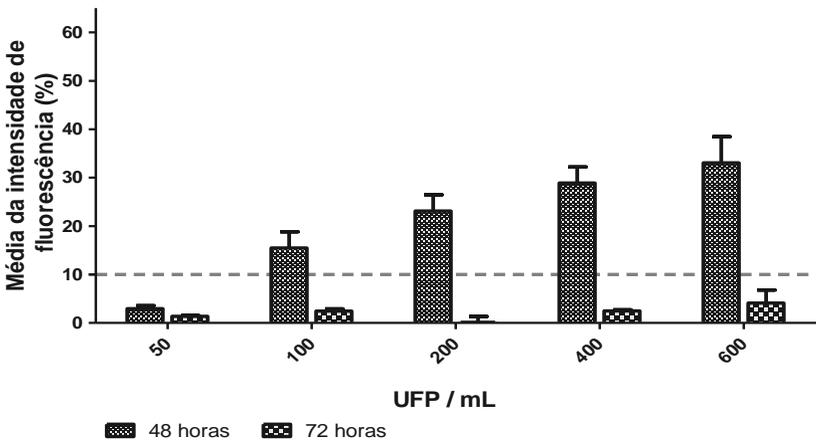
Assim, considerando similaridades e diferenças dos HSV, foram efetuados testes de indução do sistema repórter com os vírus HSV-1. Conforme analisado por citometria de fluxo, o sistema mostrou-se funcional para o HSV-1 com diferenças significativas da média da intensidade de fluorescência para os tempos de análise e para as diferentes concentrações virais utilizadas. No entanto, a ativação com as mesmas concentrações virais empregadas para o HSV-2 foi menor para o HSV-1 nas concentrações mais altas, atingindo aproximadamente 35% de incremento da média da intensidade de fluorescência, em relação aos controles, com 600 UFP/mL. Curiosamente, infecções pelo HSV-1 com concentrações virais mais baixas, 100 UFP/mL, resultaram em incremento da média da intensidade de fluorescência de quase 20%, enquanto para o HSV-2 o incremento com a mesma concentração ficou abaixo de 10% (Figura I. 26).

Em ensaios de placa de lise normalmente a leitura ocorre 72 h após a infecção. Conhecendo o comportamento viral do HSV-1, as análises de fluorescência foram realizadas apenas em 48 h, momento em que a fluorescência ocorre tipicamente para o HSV-2, e em 72 h, tempo de leitura utilizado para os ensaios baseados em placa de lise. Interessantemente, foi constatado aumento da média da intensidade de fluorescência já em 48 h, porém, essa fluorescência não se manteve até a análise de 72 h. Possivelmente, a redução da fluorescência aos níveis praticamente basais em 72 h pode combinar com o momento de lise celular das células previamente induzidas, assim a fluorescência não poderia ser detectada por citometria de fluxo, pois as células fluorescentes não estariam mais íntegras.

Os histogramas (Figura I. 27) retratam claramente o aumento do pico de fluorescência em decorrência do aumento da concentração viral do HSV-1. Ao contrário do apresentado nos histogramas do HSV-2, embora haja aumento da intensidade dos picos, o alargamento dos picos

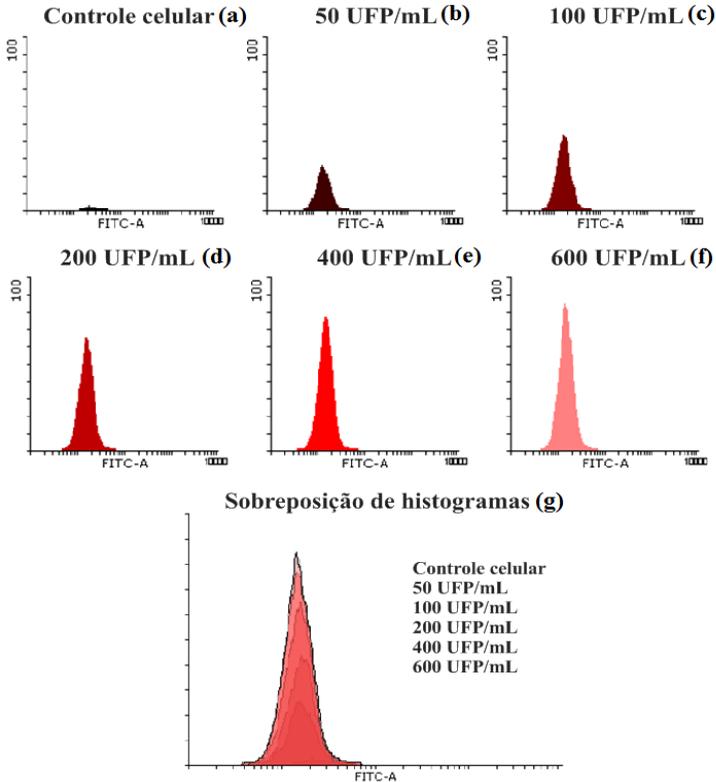
ocorre de forma mais discreta. Isso sugere a ampliação do número de eventos, mas sem grande acentuação na fluorescência apresentada pelas células.

**Figura I. 26:** Avaliação, por citometria de fluxo, da média da intensidade de fluorescência após infecção das células F4R3 – ZsGreen1-1 com HSV-1. Em análise por ANOVA dois fatores, pode ser observada diferença significativa na média da intensidade de fluorescência \* ( $P < 0,05$ ) em decorrência das concentrações virais utilizadas para a infecção e em relação aos tempos de incubação empregados \*\*\* ( $P < 0,0001$ ). Os dados representam a média +/- desvio padrão de dois ensaios.



**Legenda:** UFP – Unidades formadoras de placa

**Figura I. 27:** Representação por histogramas (FITC x nº de eventos) dos resultados obtidos por citometria de fluxo para as células F4R3 ZsGreen1-1 infectadas com HSV-1. Nos histogramas referentes aos grupos celulares infectados (b – f) observa-se um aumento da intensidade dos picos em comparação ao controle celular (a). Na sobreposição de histogramas (g) verifica-se o aumento da intensidade dos picos para os grupos celulares infectados proporcionalmente ao aumento das concentrações virais utilizadas. Dados obtidos 48 h após a infecção viral.



Em virtude do crescente número de pacientes imunodeprimidos apresentando formas atípicas, graves e agressivas das infecções herpéticas, o sistema repórter construído e analisado neste trabalho poderia servir como ferramenta auxiliar no diagnóstico clínico, pois as metodologias de diagnóstico disponíveis atualmente apresentam algumas desvantagens contornáveis com a utilização do sistema repórter.

O sistema repórter independe de imunoglobulinas e pode ser utilizado quando a sorologia não é útil (CHAILLON et al., 2012; RIZZA et al., 2011). As técnicas moleculares não avaliam a presença de partículas virais viáveis e infecciosas na amostra clínica, enquanto o sistema repórter necessita de partículas virais viáveis e com capacidade replicativa para funcionamento, indicando de forma mais fiel a existência de infecção ativa. A PCR muitas vezes não é vantajosa exatamente devido a uma de suas características de destaque, a sensibilidade, prejudicada por inibidores presentes em amostras clínicas. A técnica de PCR detecta quantidades muito pequenas de genoma viral, mas como os vírus podem persistir de forma crônica ou latente no organismo, como é o caso dos herpesvírus, a detecção do seu genoma nem sempre esta associada à doença e não indica o vírus como agente etiológico da manifestação clínica (FERREIRA, 2010).

O isolamento viral, considerado padrão-ouro para o diagnóstico de doenças por HSV, necessita de analista treinado e com experiência suficiente para diferenciar efeitos citopáticos apresentados pelos vírus, pois alguns vírus como poliomavírus BK e CMV também exibem efeito citopático (AHSAN, 2006). A possibilidade de automatização da técnica de leitura por citometria de fluxo diminui a subjetividade comparativamente a metodologia de placa de lise e proporciona a leitura em maior escala das amostras em um curto período de tempo.

Quando comparado com as técnicas que usam marcação por anticorpos, o sistema repórter mostra uma redução do custo das análises por amostra, pois a GFP esta integrada ao sistema celular e a aplicação de anticorpos, normalmente de custo considerável, é desnecessária. Muitos métodos de marcação com anticorpos ainda são laboriosos, demorados e precisam de uma preparação cuidadosa do espécime a ser analisado.

Como as lesões em pacientes imunodeprimidos apresentam altos títulos virais, a possibilidade do isolamento viral a partir de lesões atípicas é bastante favorecida. Além disso, quanto mais recentes as lesões maiores os títulos virais, o que facilitaria o diagnóstico ainda no início da infecção e a intervenção farmacológica precoce (FRISCH; GUO, 2013). De qualquer forma, nos testes de indução realizados com o sistema repórter, baixas concentrações virais (100 – 200 UFP/mL) foram suficientes para induzir o sistema, o que sugere uma adequada sensibilidade.

Tratando-se do HSV-1, os ensaios com o sistema repórter resultaram em picos de expressão de fluorescência em 48 h, o que traz a

vantagem do encurtamento em 24 h no tempo de análise em relação à utilização dos ensaios de placa de lise tradicionais.

### **I.4.11 Testes de viabilidade celular com amostras clínicas**

Obviamente, para a utilização de um sistema repórter no diagnóstico utilizando amostras clínicas, sabendo que este tem por base cultura de células, é de fundamental importância garantir que a interação entre as amostras e as células não comprometa a viabilidade celular e consequentemente o sistema repórter.

Vários tipos de amostras podem ser aproveitados para técnicas de isolamento viral convencional. Escarificações de vesículas, *swabs* e retirada de líquidos das lesões são os materiais mais comuns, mas líquido, urina, secreções de garganta, nasofaringe e conjuntiva também podem ser utilizados (SANTOS et al., 2008). A diversidade de espécimes das quais é possível realizar o isolamento dos HSV podem ser constatada em trabalhos como o de Berrington e colaboradores (2009), no qual o HSV foi isolado de líquido, pele, boca, ânus, tecido pulmonar e fluido ascítico (BERRINGTON et al., 2009).

Nas culturas celulares tradicionais, as secreções líquidas são inoculadas diretamente nas placas ou ressuspensas em meio de transporte (Ex. MEM, PBS, meio M5) para posterior inoculação nas células. A urina precisa de ajuste prévio de pH e espécimes de locais com presença de bactérias devem ser tratados com antibióticos e antifúngicos, mas os processos de pré-tratamento das amostras são bastante simples (SINGH et al., 2005; STORCH, 2007).

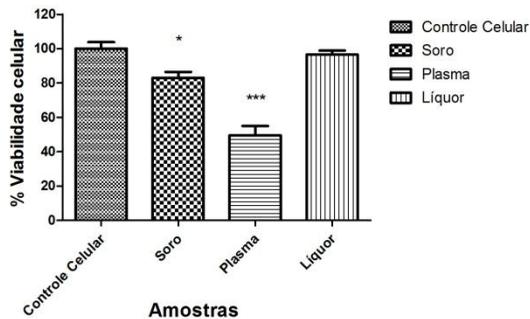
Quando proposto o uso do sistema repórter para diagnóstico clínico, questionou-se qual seria o comportamento de amostras clínicas como, por exemplo, o líquido quando em contato com as células do sistema repórter. Ainda, embora saibamos que o isolamento viral a partir de sangue, soro ou plasma para o HSV não é rotineiramente realizado, concentrações significativas de cópias genômicas de HSV, na ordem de  $10^3$  a  $10^6$ , são encontradas no soro e plasma sanguíneo (BERRINGTON et al., 2009). A presença de vírus nessas amostras indica a possibilidade de isolamento viral a partir desses espécimes. Isso poderia ser realizado através da otimização de técnicas como o isolamento por *Shell Vial* (SINGH et al., 2005), tratamentos químicos para estabilização viral ou sistemas que permitam a separação das partículas virais do material sanguíneo futuramente desenvolvidas. Assim, avaliou-se a viabilidade das células transfectadas quando expostas também a soro e plasma humano.

As análises de viabilidade das células F4R3 ZsGreen1-1 expostas às amostras clínicas foram efetuadas por ensaios colorimétricos do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil brometo de tetrazólio), que refletem a viabilidade de células cultivadas sob condições específicas. O MTT é um substrato amarelo que em contato com células viáveis, na dependência de redução enzimática nas mitocôndrias, produz um produto formazan azul escuro não hidrossolúvel, que é armazenado no citoplasma celular. Células não viáveis não possuem a capacidade de conversão do MTT. Após dissolução do produto com solventes apropriados, como o DMSO, análises espectrofotométricas podem ser realizadas, sendo a absorbância resultante proporcional à viabilidade celular (BERTOL, 2011; FREITAS, 2001; MOSMANN, 1983; SILVA, I. T. D., 2009).

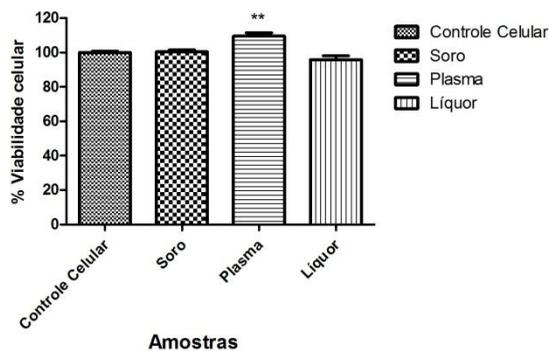
Como pode ser observado na figura I. 28, a exposição das células ao líquido não comprometeu a viabilidade celular se comparada com o controle celular contendo apenas meio de cultura, em nenhum dos tempos de exposição avaliados. O tempo de 48 h foi escolhido por ser o tempo desde a aplicação do inóculo nas células até a leitura da fluorescência por citometria de fluxo. A aplicação tanto de soro como de plasma humano comprometeram a viabilidade celular em 48 h, no entanto, em 2 h não houve perda da viabilidade. O tempo de 2 h de contato da amostra com o sistema celular foi utilizado por ser suficiente para a ocorrência da infecção pelo HSV. Como descrito no decorrer deste trabalho, quando as células são infectadas com uma suspensão viral é realizada a incubação por apenas 1 hora, sendo este tempo suficiente para a infecção. O tempo de 2 h estenderia o tempo de infecção para o dobro do necessário, garantido a eficiência da infecção sem comprometimento celular. O aumento da viabilidade celular quando as células foram expostas ao plasma e após este ser removido pode ser fruto da indução da proliferação celular por fatores de crescimento presentes no soro.

**Figura I. 28:** Viabilidade das células F4R3 ZsGreen1-1 expostas por 48 e 2 h à diferentes amostras clínicas. Gráfico A: Observa-se uma diminuição significativa da viabilidade das células expostas ao soro \* ( $P < 0,05$ ) e plasma humano \*\*\* ( $P < 0,0001$ ), porém não há diferença significativa entre as células do controle celular e as expostas ao líquido. Gráfico B: Ocorreu aumento significativo da viabilidade \*\* ( $P < 0,01$ ) das células expostas ao plasma humano, porém não foi observada diferença significativa entre as amostras expostas ao líquido e soro humano em relação ao controle celular. Os dados representam a média +/- desvio padrão de dois ensaios e foram analisados por teste t e pós-teste de Dunnett.

**Gráfico A - Viabilidade celular após 48h**



**Gráfico B - Viabilidade celular após 2h**



Na literatura são relatadas quantificações consideráveis de cópias genômicas no líquido, na ordem de  $10^6$ , o que aumentaria a probabilidade de obtenção de partículas virais viáveis neste espécime (CHAILLON et al., 2012). Assim, reforça-se a possibilidade de utilização do líquido para isolamento viral utilizando o sistema repórter em análises clínicas.

O presente trabalho não teve o objetivo de realizar a padronização com amostras clínicas, mas de sugerir possíveis aplicações do sistema repórter desenvolvido. Essa metodologia não visa substituir as técnicas de diagnóstico virais atualmente empregadas, embora possa ser mais uma ferramenta em prol de um diagnóstico e tratamento rápido e efetivo, principalmente quando combinada a outras técnicas de diagnóstico. O desenvolvimento deste sistema abre caminhos para a criação de sistemas semelhantes para outros vírus, deixando espaço para vertentes com objetivo de inovação nos diagnósticos.

### **I.4.12 Testes com antivirais e candidatos antivirais inativos**

Vírus podem tornar-se resistentes aos antivirais utilizados na clínica e uma forma de avaliar a efetividade dos tratamentos serviria como instrumento para escolha do melhor agente terapêutico evitando uso inadequado e desnecessário de medicamentos, diminuindo possíveis intoxicações e acelerando o processo de recuperação do paciente.

Atualmente, os estudos e avaliação de resistência aos antivirais são frequentemente realizados através da genotipagem viral, em busca de regiões com mutações específicas, as quais indicam se um agente etiológico é ou não resistente a determinado medicamento. A genotipagem depende do conhecimento prévio das mutações que causam resistência aos antivirais, bem como da existência de resistência cruzada resultante de mutações únicas ou que envolvam múltiplos pontos do genoma. Essa metodologia é bastante eficiente, desde que se conheça exatamente a conexão entre as mutações e o mecanismo de resistência, e que se tenha acesso a bases de dados para adequada interpretação dos resultados. Uma limitação da genotipagem refere-se à dificuldade de interpretação de determinadas mutações em subpopulações que coinfetam um indivíduo juntamente com subpopulações não mutantes (ANDREI et al., 2013; STRASFELD; CHOU, 2010).

Na ausência de uma metodologia semelhante à utilizada para análises de resistência bacteriana, o sistema repórter poderia ser implantado para avaliar o comportamento dos vírus de amostra clínica quando exposto aos diferentes antivirais de uso terapêutico. Essa metodologia permitiria a triagem de uma gama de fármacos, em tempo

relativamente curto, proporcionando a escolha do medicamento para o tratamento individualizado do paciente.

### **I.4.12.1 Antivirais**

O ACV foi escolhido para testar o sistema repórter por ser um medicamento empregado frequentemente na clínica para tratamento de infecções pelo HSV. Os compostos, AG, CNV e o extrato UT7 foram usados por representarem agentes antivirais mais recentemente avaliados quanto à atividade antiviral ou apresentarem mecanismos de ação diferentes do ACV.

O ACV é um análogo da 2-deoxiguanosina convertido a monofosfato pelas timidinacinasas, principalmente pela viral com a qual possui maior afinidade do que com a celular. Essa maior afinidade favorece a conversão do ACV para a forma monofosfato basicamente em células infectadas. As cinases celulares do hospedeiro convertem intracelularmente a forma monofosfato à forma trifosfato, que atua inibindo a DNA polimerase viral (EVANS et al., 2013; RANG et al., 2007).

O AG pertence ao grupo dos galatos, os quais são descritos na literatura como agentes com atividade antioxidante, genotóxica e antiviral. Estudos comprovam sua atividade como anti-herpético para HSV-1 e 2, mas o mecanismo de ação antiviral dos galatos não é entendido detalhadamente. Parecem agir por uma combinação de mecanismos, que incluem atividade virucida, degeneração precoce de células infectadas e inibição da replicação viral (ARAKAWA et al., 2009; KRATZ et al., 2008; SAVI et al., 2005).

A CNV é um cardenolídeo glicosilado. Os cardenolídeos são compostos com atividade cardiotônica tradicionalmente empregados no tratamento de doenças cardíacas. Porém, a propriedade antiviral da CNV é descrita tanto para o HSV-1 como para o HSV-2, embora detalhes sobre o mecanismo de ação não sejam descritos (BERTOL, 2011; CARVALHO, 2012; SLINGERLAND et al., 2013).

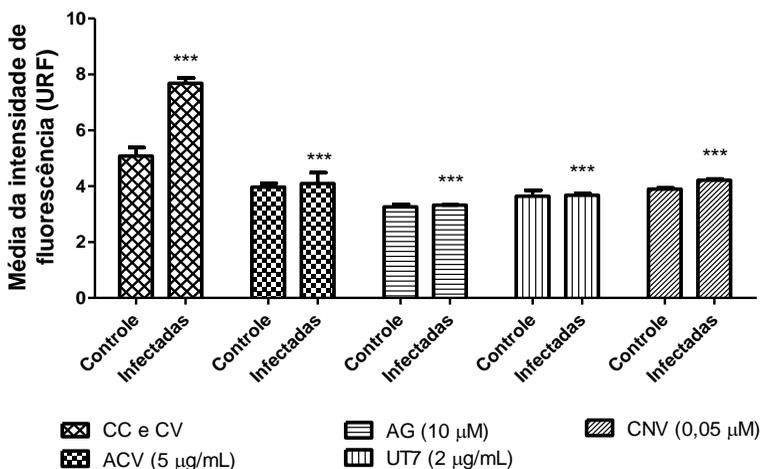
Extratos obtidos da casca de *Uncaria sp.*, conhecida popularmente como “unha de gato”, possuem atividade fortalecedora do sistema imunológico e também atividade anti-herpética, na qual o mecanismo de ação acontece por inibição da adsorção viral do HSV-1 (CAON et al., 2014).

Como pode ser observado na figura I. 29, os grupos celulares infectados e tratados, tanto com o fármaco ACV como com os compostos (AG e CNV) e extrato (UT7) efetivos na inibição da

replicação dos HSV, não apresentaram alteração significativa na média da intensidade de fluorescência em comparação com os respectivos controles celulares não infectados e tratados. Como estes antivirais bloqueiam o processo de infecção ou de replicação viral nas células, eles impedem o espalhamento viral para incremento detectável da fluorescência, diretamente ligada aos mecanismos bioquímicos e moleculares da replicação viral. Na figura I. 29 também pode ser observada diferença significativa na média da intensidade de fluorescência entre as células infectadas e tratadas e o controle viral. Para reforçar a confirmação de que não houve replicação viral, as placas foram acompanhadas durante todo o período de testes por microscopia óptica. Por microscopia óptica foi visualizada a formação de efeito citopático apenas no controle viral, enquanto nas demais cavidades não foram visualizadas quaisquer alterações citomorfológica indicativas da presença de replicação viral (dados não mostrados).

Uma supressão significativa da fluorescência nos controles tratados e não infectados foi constatada em comparação ao controle celular (Figura I. 29). A supressão da fluorescência pode ser consequência do fotobloqueamento ou interferência na leitura associado à presença dos antivirais aplicados, por isso, é importante que em todos os testes realizados haja inserção de controles celulares tratados com os antivirais em avaliação. A partir dos dados tanto dos controles celulares e virais, dos controles celulares tratados e das células infectadas tratadas é que deveriam ser realizados os cálculos para estimar a eficiência de inibição da replicação viral pelos medicamentos em análise.

**Figura I. 29:** Comportamento da média da intensidade de fluorescência em células F4R3 ZsGreen1-1 submetidas a diferentes tratamentos antivirais. Em análise por ANOVA dois fatores, não foi observada diferença significativa entre as células infectadas e as células controle nos grupos tratados. Em análise por ANOVA/ Bonferroni houve diferença significativa \*\*\* ( $P < 0,0001$ ) entre o controle viral e as células infectadas submetidas aos diferentes tratamentos. Diferenças significativas \*\* ( $P < 0,01$ ) \*\*\* ( $P < 0,0001$ ) também foram observadas entre os controles tratados e o controle celular. Os dados representam a média +/- desvio padrão de dois ensaios, obtidos 48 h após a infecção viral.



**Legenda:** CC – controle celular, CV – controle viral, ACV – aciclovir, AG – ácido gálico, UT7 – extrato de *Uncaria sp.*, CNV – convalotoxina, URF – Unidades relativas de fluorescência.

#### 1.4.12.2 Candidatos antivirais inativos

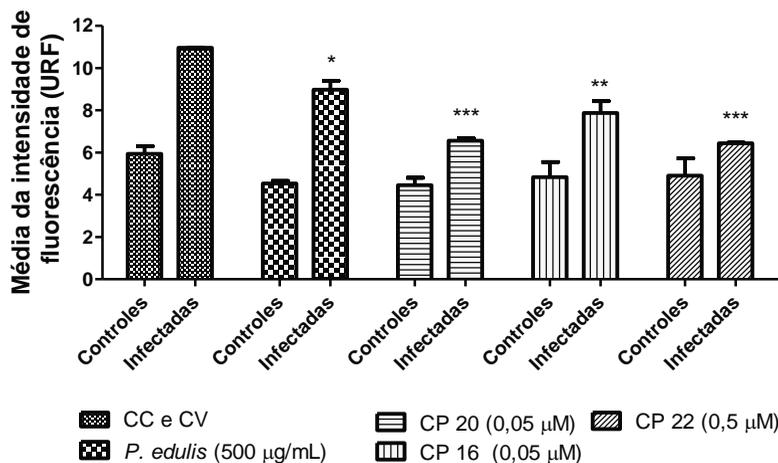
Para descartar a dúvida em relação à supressão da fluorescência do sistema em decorrência da presença apenas de substâncias acrescidas ao meio de cultura, no caso os antivirais, e não devido à inibição da replicação do vírus foram utilizados controles negativos. Como controles foram selecionados o extrato de *Passiflora edulis* e os derivados de cardenólídeos  $\beta$  - metildigoxina (composto 16), epi - digitoxigenina - 32 -OH (composto 20) e o 21- malonil desoxicorticosterona (composto 22). Em análises prévias realizadas pelo grupo do LVA (Laboratório de Virologia Aplicada - UFSC), nenhum

dos candidatos à antiviral selecionados para uso como controle negativo apresentavam atividade anti-HSV (BERTOL, 2011; SILVA, I. T. D., 2009).

Isolados do gênero *Passiflora* são conhecidos por suas propriedades como ansiolítico, sedativo, hipoglicêmicos, antioxidantes, anti-inflamatório entre outras atividades (KLEIN et al., 2013; MONTEFUSCO-PEREIRA et al., 2013). Os cardenólídeos são conhecidos por apresentarem atividade cardiotônica e terem uso terapêutico em casos de insuficiência cardíaca congestiva, arritmias cardíacas e fibrilação atrial, a exemplo da digoxina. Alguns cardenólídeos e seus derivados apresentam também ação antitumoral e anti-herpética, conforme relatos da literatura (BERTOL, 2011; CARVALHO, 2012; SLINGERLAND et al., 2013).

Como disposto na figura I. 30, a adição de compostos/extrato sem atividade antiviral não impediu o aumento da expressão da fluorescência em células infectadas quando comparadas com os controles não infectados contendo os candidatos correspondentes. Houve diferença significativa na média da intensidade de fluorescência entre as células infectadas e tratadas e seus controles correspondentes. Também houve diferenças significativas na expressão da média da intensidade de fluorescência do controle viral em relação às células infectadas e tratadas, mas isso pode ser justificado pela citotoxicidade demonstrada principalmente pelos compostos 20 e 22 durante os ensaios. As células tratadas com esses compostos, acompanhadas por microscopia, apresentaram mudanças na morfologia e morte celular quando comparadas aos controles celulares não tratados. Ocorreram diferenças significativas em função dos tratamentos utilizados e o incremento da média da intensidade de fluorescência das células infectadas e tratadas com extrato de *P. edulis* foi maior quando comparado com os demais grupos celulares infectados e tratado. Isso aconteceu devido à baixa citotoxicidade do extrato de *P. edulis*, que não comprometeu a viabilidade celular da mesma forma que o observado com os compostos derivados de cardenólídeos. Concentrações menores dos compostos com maior citotoxicidade não foram testadas para não haver o comprometimento do ensaio em função da alta diluição dos compostos.

**Figura I. 30:** Comportamento da média da intensidade de fluorescência em células F4R3 ZsGreen1-1 submetidas à diferentes tratamentos com compostos e extrato sem atividade antiviral. Em análise por ANOVA, foi observada diferença significativa \*\*\* ( $P < 0,0001$ ) entre as células infectadas e não infectadas e também entre os diferentes tratamentos. Em análise por ANOVA/Bonferroni não pode ser observada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os controles tratados e o controle celular, porém foram observadas diferenças significativas com valores de P variando de \*  $< 0,05$  a \*\*\*  $< 0,0001$  entre as células infectadas e o controle viral. Os dados representam a média +/- desvio padrão de dois ensaios, obtidos 48 h após a infecção viral.



**Legenda:** CC – controle celular, CV – controle viral, *P. edulis* - *Passiflora edulis*, CP16 -  $\beta$  - metildigoxina, CP20 - epi - digitoxigenina - 32 -OH, CP22 - 21- malonil desoxicorticosterona.

Com base nos resultados apresentados, verifica-se que o sistema repórter desenvolvido pode ser utilizado para aplicação em testes de resistência aos antivirais na pesquisa ou na clínica e ser um aliado na triagem e desenvolvimento de novos medicamentos antivirais. A depleção da fluorescência em função de uma possível citotoxicidade não seria um empecilho para a utilização do sistema na triagem farmacológica, pois os antivirais devem possuir baixa citotoxicidade e alta atividade antiviral em baixas concentrações.

#### I.4.13 Testes com hidroxuréia

As células dos sistemas repórteres utilizadas para os diferentes testes não foram isoladas, apenas selecionadas com G418. Por consequência, o grupo celular em cultura apresentava-se heterogêneo.

Embora o grupo não contenha células Vero não transfectadas, entre as células infectadas existe dois subgrupos celulares. Os subgrupos são compostos por células que receberam o vetor acrescido do inserto (Vi) e por células que receberam apenas o vetor desprovido de inserto (Vo). Como descrito nos testes de indução do sistema repórter, as células Vo não tem indução e expressão da fluorescência efetiva como ocorre com as células contendo o inserto (F4R3 ZsGreen1-1). Dessa forma, em uma cultura de células não isoladas as células Vo infectadas não expressam fluorescência, o que diminui a sensibilidade do sistema.

Uma cultura pura contendo apenas células passíveis de indução pelos vírus acentuaria a sensibilidade do método significativamente e possivelmente reduziria os tempos de incubação para detecção da fluorescência em células induzidas. Tempos reduzidos proporcionariam o uso do sistema para diagnóstico, triagem ou outras finalidades mais agilmente. Para o isolamento das células de interesse poderia ser utilizado um citômetro de fluxo associado a um sistema de separação de células conhecido como FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*).

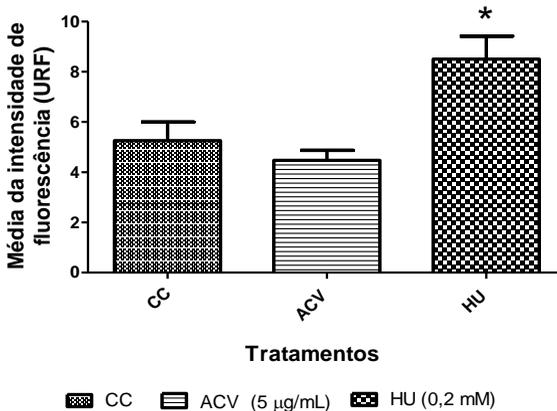
O FACS é uma tecnologia que permite a separação por método mecânico ou eletrostático de células ou partículas submetidas à citometria de fluxo. A separação se dá de acordo com as características biológicas apresentadas pelas células em um procedimento rápido, que resulta no isolamento de populações puras (GRIMM, 2004; HOY, 2006; SHAPIRO, 2003). A separação consistiria em isolar células expressando fluorescência que, após indução, voltariam ao estado não fluorescente, poderiam ser subcultivadas, propagadas e utilizadas como sistema celular repórter. Contudo, a indução do sistema ocorre basicamente pela infecção viral e se esta forma de indução fosse utilizada as células estariam inviáveis para a reutilização.

Em um estudo de Hanson e colaboradores (1994) células Vero transfectadas com vetor contendo o gene da enzima cloranfenicol acetil transferase, associado ao promotor da ICP10 do HSV-2, foram expostas a 0,2 mM de hidroxauréia. A hidroxauréia é conhecida como um inibidor do ciclo celular parando o processo na fase S por inibição da redução de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos e é empregada na clínica para o tratamento da anemia e como antitumoral (ALVINO et al., 2007; HANSON et al., 1994; LORENZI, 2006). As análises de Hanson e colaboradores (1994) demonstraram a ativação do promotor ICP10 quando as células foram expostas à hidroxauréia, ocorrendo expressão significativa 4 h após adição da substância. Com base nesta verificação, levantou-se a hipótese da indução ocorrer da mesma forma em células F4R3 ZsGreen1-1 tratadas com hidroxauréia a 0,2 mM. A concentração

de 0,2 mM não prejudica a viabilidade celular, visto que a concentração citotóxica 50% da hidroxiuréia é 3,29 mM (NEYTS; DE CLERCQ, 1999; SERGERIE; BOIVIN, 2008). Durante os ensaios, foi adicionado um grupo celular tratado com ACV como controle negativo.

As células tratadas com hidroxiuréia apresentaram fluorescência significativamente maior em relação ao controle celular não tratado (Figura I. 31). Testes realizados em 6 h após a exposição, em leituras com espectrofotômetro, já demonstraram diferença significativa na expressão de fluorescência entre o grupo tratado com hidroxiuréia e não tratado (dados não mostrados).

**Figura I. 31:** Comportamento da média da intensidade de fluorescência em células F4R3 ZsGreen1-1 submetidas ao tratamento com hidroxiuréia 0,2 mM. Em análise por ANOVA de um fator, foi observada diferença significativa \* ( $P < 0,05$ ) da média da intensidade de fluorescência entre as amostras analisadas. Com o pós-teste de Dunnett pode-se constatar diferença significativa \* ( $P < 0,05$ ) entre o controle celular e as células tratadas com hidroxiuréia. O ACV foi adicionado apenas como controle negativo do ensaio. Os dados representam a média +/- desvio padrão de dois ensaios, obtidos 48 h após o tratamento com hidroxiuréia.



**Legenda:** CC – controle celular, ACV - aciclovir, HU – hidroxiuréia, URF – unidades relativas de fluorescência.

De acordo com os resultados, o emprego da hidroxiuréia pode ser uma forma de proporcionar um fácil isolamento de clones de interesse por FACS. Como a hidroxiuréia atua inibindo a enzima ribonucleotídeo redutase de forma reversível, esta substância poderia ser aplicada às

células para o isolamento, e removida para posterior propagação das células reutilizáveis como sistema celular repórter (ALVINO et al., 2007). O isolamento por FACS também possibilitaria a eliminação de possíveis clones contendo vetores não funcionais que sofreram alguma recombinação inativando o sistema celular repórter

### I.5 CONCLUSÃO

Clones recombinantes ICP10 – ZsGreen1-1 foram desenvolvidos de forma eficaz por meio da amplificação da região promotora ICP10, clonagem em vetores codificantes da GFP, transfecção de células Vero e seleção com G418. O sistema repórter F4R3 ZsGreen1-1 foi eficientemente induzido, expressando GFP em função da infecção com HSV-1 e 2. A indução foi confirmada através de microscopia de fluorescência e por citometria de fluxo, na qual a fluorescência correlacionou-se diretamente com as concentrações virais utilizadas na infecção. A avaliação de um dos possíveis espécimes clínicos para diagnóstico, o líquido, não resultou em perda da viabilidade celular, bem como materiais não utilizados normalmente para isolamento dos HSV como soro e plasma humano incubados com as células por 2 h. O sistema F4R3 ZsGreen1-1 manteve a capacidade de indução na presença de agentes sem propriedade antiviral e manteve-se inativo na ausência de replicação viral decorrente da aplicação de antivirais. A aplicação de hidroxiuréia induziu o sistema por manipulação química, propriedade aproveitável para isolamento de clones utilizando FACS.

Em resumo, o sistema F4R3 ZsGreen1-1 é um sistema funcional, eficiente e passível de diversas aplicações. Suas características permitiriam sua utilização na clínica para diagnóstico e elaboração de testes de resistência aos antivirais e na pesquisa para o estudo e desenvolvimento de novos medicamentos antivirais. Estas aplicações favoreceriam a escolha do medicamento adequado para cada paciente de forma individualizada e ampliariam o leque de medicamentos disponíveis para o tratamento de infecções pelos HSV, que são extremamente comprometedoras para pacientes imunodeprimidos.

## **I.6 PERSPECTIVAS**

- Transformar bactérias utilizando vetores F4R3 – ZsGreen1-1 para posterior transfecção das células eucarióticas;
- Realizar o isolamento por FACS das células Vi - F4R3 ZsGreen1-1;
- Cultivar as células em meios com ausência de vitamina para verificar se há melhor expressão de fluorescência nestas condições e testar o efeito da rutina no fotobloqueamento para o sistema avaliado por citometria de fluxo;
- Realizar testes de indução do sistema repórter com amostras clínicas de pacientes;
- Submeter o sistema repórter à infecção com vírus HSV resistentes aos antivirais e avaliar a expressão da fluorescência em células infectadas e tratadas com os antivirais;
- Testar o sistema repórter como ferramenta para triagem de novos medicamentos com uma maior variedade de agentes terapêuticos;
- Analisar a efetividade do sistema repórter como instrumento de testes de resistência aos antivirais com amostras clínicas;
- Verificar a estabilidade do sistema repórter por longos períodos de tempo;
- Aperfeiçoar o sistema repórter por meio da introdução de reforçadores da expressão da GFP no vetor construído, com objetivo de encurtar o tempo de incubação.



## **Capítulo II**

# **IMPLANTAR UMA PCR QUANTITATIVA PARA POLIOMA VÍRUS BK**



## II.1 POLIOMAVÍRUS

### II.1.1 Histórico

A denominação “*polyomavirus*” foi atribuída a este grupo de vírus devido à observação de formação de múltiplos tumores em ratos recém-nascidos expostos ao agente viral. O nome deriva do Grego “poly”, que significa muitos, e de “oma”, que significa tumor. A primeira evidência de que os poliomavírus poderiam infectar humanos aconteceu no ano de 1965, quando foram encontradas estruturas semelhantes a do vírus em material cerebral de paciente com Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (LMP). No entanto, o isolamento do poliomavírus JC ocorreu somente em 1971, quando Padgett e colaboradores conseguiram isolar o poliomavírus JC em cultura de células gliais fetais inoculadas com material cerebral infectado de um paciente com LMP. O poliomavírus BK também foi isolado em 1971, por Gardner e colaboradores, mas a partir da urina de pacientes assintomáticos após transplante renal (AHSAN, 2006; IMPERIALE; MAJOR, 2007; SANTOS et al., 2008).

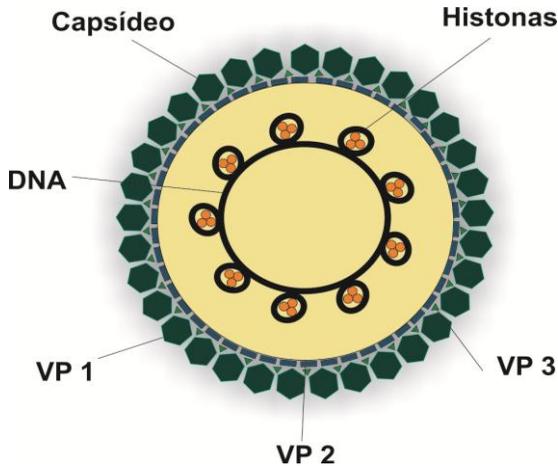
### II.1.2 Classificação

Os poliomavírus eram classificados como um gênero da família *Papovaviridae* juntamente com os papilomavírus até o ano 2000, após foram reclassificados e foi criada uma família para os poliomavírus. A família *Polyomaviridae* é constituída por 13 membros, entre eles dois patógenos humanos pertencentes ao gênero *Polyomavirus*, o poliomavírus JC e poliomavírus BK. A denominação JC e BK foi atribuída em referência as iniciais dos nomes dos pacientes dos quais esses vírus foram isolados pela primeira vez. Os demais poliomavírus infectam outras espécies como macacos, coelhos e ratos (AHSAN, 2006; ICTV, 2014; IMPERIALE; MAJOR, 2007).

### II.1.3 Morfologia

Os poliomavírus possuem cerca de 40 a 45 nm de diâmetro, não têm envelope viral e são formados por um capsídeo com 73 pentâmeros, cada um composto por 5 moléculas VP1 (expostas no capsídeo), e uma molécula VP2 ou VP3. A proteína VP1 é o maior componente do capsídeo. O vírus tem DNA dupla fita circular complexado com histonas celulares formando uma estrutura semelhante a da cromatina celular (Figura II. 1) (KHALILI; STONER, 2001; MADIGAN et al., 2010).

**Figura II. 1:** Imagem ilustrativa da estrutura viral dos poliomavírus.



**Fonte:** A autora baseado em SANTOS et al, 2008.

O genoma mede aproximadamente 5 Kpb e é dividido em 3 regiões. A região inicial está associada a funções anteriores à replicação do DNA, a região tardia expressa proteínas úteis após a replicação do DNA e a região regulatória contém os promotores para a transcrição das regiões iniciais e tardias além da origem de replicação (IMPERIALE; MAJOR, 2007).

Em relação às sequências nucleotídicas, os poliomavírus JC e BK apresentam um considerável grau de homologia havendo o compartilhamento de 72% da sequência entre o poliomavírus JC e o poliomavírus BK (KHALILI; STONER, 2001).

### II.1.4 Ciclo viral

A forma de transmissão dos poliomavírus JC e BK não é conhecida, mas acredita-se que a transmissão seja respiratória, pois há a possibilidade de células do trato respiratório participarem como sítio primário da infecção juntamente com células linfóides. A transmissão por via placentária também é uma forma de transmissão considerada possível (IMPERIALE; MAJOR, 2007).

Os poliomavírus entram nas células por endocitose. O poliomavírus BK liga-se ao ácido siálico e a gangliosídeos, penetrando nas células via cavéolas envolvidas por caveossomas, que auxiliam na endocitose dos vírions conduzidos ao retículo endoplasmático e

internalizados no núcleo. O poliomavírus JC liga-se nas células por interações com o ácido siálico e com receptores de serotonina (5-HT<sub>2A</sub>), penetrando nas células através da endocitose clatrina dependente (IMPERIALE; MAJOR, 2007; PHO; ASHOK; ATWOOD, 2000; TAN; KORALNIK, 2010).

A organização do genoma dos poliomavírus é bastante conservada e a homologia entre os nucleotídeos é significativa entre os poliomavírus JC e BK. Os genes precoces são transcritos em uma direção do genoma e os genes tardios no sentido oposto a partir da fita complementar, dirigidos por promotores da região reguladora. A transcrição, realizada pela RNA polimerase II, gera um mRNA inicial que é processado pós-transcricionalmente originando um mRNA grande e um pequeno. Esses mRNAs são traduzidos no citoplasma originando duas proteínas, os antígenos grandes (Ag T) e os pequenos (Ag t) (KHALILI; STONER, 2001; MADIGAN et al., 2010).

O Ag T é uma fosfoproteína de aproximadamente 70 aminoácidos, que possui múltiplas funções como a de iniciação da replicação do DNA viral e regulação da expressão de outras proteínas, sendo a única proteína essencial para a replicação do DNA viral. A proteína serve também como sítio de reconhecimento para citotoxicidade mediada por células T (SANTOS et al., 2008). O Ag T induz as células a entrarem na fase S do ciclo celular, o que recruta as proteínas da replicação celular que atuarão em favor da replicação do genoma viral. Isso acontece por interação entre o Ag T e proteínas como a pRb e os fatores de transcrição E2F (IMPERIALE; MAJOR, 2007). Já o Ag t é uma proteína rica em cistina com tamanho que varia de 124 a 194 aminoácidos. Esse antígeno pode induzir a tumorigenicidade alterando a progressão do ciclo celular e inibindo a apoptose (SANTOS et al., 2008).

Para que ocorra a replicação, o Ag T se liga à origem de replicação e recruta a DNA polimerase celular por interação com a enzima. Com a abertura da dupla fita, outras proteínas celulares do processo replicativo são mobilizadas por interação com o Ag T e ao final são produzidas duas moléculas circulares de DNA ligadas. Juntamente ao início da replicação do DNA, é iniciada a transcrição da região tardia, produzindo as proteínas de capsídeo VP1, VP2 e VP3. A VP1 é a principal proteína participante da adsorção viral e contém um sítio antigênico comum a todos os poliomavírus. Outra proteína reguladora importante, codificada pela região tardia, é a agnoproteína. A agnoproteína perturba as funções celulares do hospedeiro, como o

reparo do DNA e a progressão do ciclo celular (IMPERIALE; MAJOR, 2007).

A montagem das partículas virais começa por translocação das proteínas do capsídeo para o núcleo e incorporação do DNA ao capsídeo. Não é conhecido o mecanismo de saída dos vírus das células, porém é sugerido que os vírus saíam após provocar lise celular em conjunto com apoptose. Outras hipóteses afirmam que os vírus podem deixar as células mantendo-as intactas (AHSAN, 2006; IMPERIALE; MAJOR, 2007; MADIGAN et al., 2010).

### II.1.5 Infecção

Os poliomavírus humanos parecem preferir determinados tecidos para a replicação. O poliomavírus BK tem boa replicação em células epiteliais humanas e em fibroblastos, e o poliomavírus JC parece estritamente neurotrópico, infectando células gliais fetais humanas ou células cerebrais de adultos (IMPERIALE; MAJOR, 2007; TAN; KORALNIK, 2010).

A soroprevalência dos poliomavírus humanos é consideravelmente alta, estando entre 60 – 80% na população em geral. Um estudo de Egli e colaboradores (2009), no qual amostras de sangue de doadores foram analisadas por ensaios imunológicos, retratam bem esses dados de prevalência. Das 400 amostras avaliadas houve soroprevalência de 82% para o poliomavírus BK e 58% para o poliomavírus JC (EGLI et al., 2009).

A primoinfecção por poliomavírus ocorre comumente na infância e posteriormente o vírus se mantém em latência no tecido renal e/ou em células mononucleares do sangue, que são sítios importantes de latência dos vírus. Durante o período de latência não se sabe ao certo se o DNA fica na forma episomal nas células ou se é integrado. Alternativamente ao estabelecimento de latência podem instalar-se infecções crônicas, não sendo raro nesses casos a excreção dos poliomavírus na urina em grandes quantidades. Entretanto, nenhuma enfermidade foi associada à grande eliminação viral pela urina nos portadores crônicos (SANTOS et al., 2008; TAN; KORALNIK, 2010).

As infecções nem sempre são benignas, o poliomavírus JC causa a LMP e nefropatia e complicações urinárias podem apresentar-se como consequência de infecções causadas pelo poliomavírus BK (IMPERIALE; MAJOR, 2007; KHARFAN-DABAJA et al., 2007; PIRES et al., 2011; TAN; KORALNIK, 2010). A LMP é uma doença desmielinizante resultante da infecção lítica dos oligodendrócitos e

astrócitos causada pelo poliomavírus JC. A desmielinização forma placas com lesões multifocais, levando o paciente a apresentar sintomas como distúrbios musculares, deficiências cognitivas, demência, déficit sensorial e visual (BREW et al., 2010; IMPERIALE; MAJOR, 2007; TAN; KORALNIK, 2010). A nefropatia causada pelo poliomavírus BK é considerada uma grande causa de rejeição de transplante renal, em consequência da ação viral e da indução do processo inflamatório no rim transplantado. A infecção normalmente manifesta-se por disfunção renal, mas pode estar associada a apresentações clínicas como cistite hemorrágica, estenose uretral e nefrite tubulointersticial (AHSAN, 2006; SANTOS et al., 2008).

O poliomavírus BK pode ser reativado muitos anos depois da primoinfecção em situações como gravidez, infecção por HIV, lúpus eritematoso sistêmico, síndrome nefrótica, transplante de medula óssea e de órgãos sólidos (AHSAN, 2006; BREW et al., 2010). Infecções concomitantes podem acontecer em imunodeprimidos levando a agravos do estado de saúde (ANDREI et al., 2007).

### **II.1.6 Poliomavírus X Imunodeprimidos**

A imunodepressão por si e o desenvolvimento de infecções virais oportunistas, sejam elas adquiridas por primoinfecção ou resultantes da reativação, possuem uma íntima relação. Para os poliomavírus essa relação de causa e consequência parece sofrer interferências de outros fatores também. Alguns trabalhos como os de Nali e colaboradores (2012), no qual foram analisadas por PCR amostras de urina de pacientes HIV positivos, não constataram correlação entre imunodepressão e virúria por poliomavírus. Embora, este estudo tenha revelado positividade para poliomavírus em 83,9% das amostras (NALI et al., 2012).

Para o poliomavírus BK a imunodepressão parece não ser determinante do desenvolvimento de doença, porém em pacientes transplantados renais a reativação do poliomavírus BK é bastante comum. Isso sugere a necessidade, além da imunodepressão, de um ambiente permissivo para a reativação, visto que beneficiários de transplantes de órgão sólidos não renais tem baixa taxa de reativação do poliomavírus BK (KUPPACHI; THOMAS; KOKKO, 2013). Como a prevalência de infecções latentes pelos vírus da família dos poliomavírus é alta, um dos sítios de latência é o tecido renal e a injúria tecidual supostamente favorece a reativação viral, os pacientes submetidos a transplante de rim são especialmente vulneráveis aos danos de uma eventual reativação viral durante a imunossupressão

## Capítulo II – Revisão bibliográfica 130

profilática e terapêutica (KHARFAN-DABAJA et al., 2007; KUPPACHI et al., 2013; PIRES et al., 2011).

Em um estudo das infecções por JC e BK de Pires e colaboradores (2011), amostras de urina de pacientes com sintomas de doença renal foram analisadas por PCR com iniciadores dirigidos para o Ag T. Das 295 amostras testadas, 17,6% foram positivas para poliomavírus, 22,4% das amostras foram positivas no grupo controle (assintomáticos) e 30,5% das amostras foram positivas no grupo de pacientes transplantados. No grupo de transplantados 18 amostras de 59 mostraram-se positivas para infecção por poliomavírus, sendo que 16 eram infecções por BK e somente 2 por poliomavírus JC. Esse estudo indica que as infecções por poliomavírus BK em transplantados é normalmente mais alta do que por poliomavírus JC (PIRES et al., 2011).

Comum a alguns outros vírus, os poliomavírus possuem a propriedade de favorecer a rejeição do enxerto e levar a complicações. A rejeição de órgãos em situações de infecção pelo BK pode ser provocada por ação direta do vírus e pela reação inflamatória (SANTOS et al., 2008). Em um estudo de Sellares e colaboradores (2012), do total dos casos de rejeição de transplante renal, incluindo todas as causas, 7% correspondiam a nefropatia causada por poliomavírus. A nefropatia tem grande importância entre receptores de transplante renal, pois até 10% dos pacientes apresentam nefropatia por poliomavírus, sendo em 95% dos casos causada pelo poliomavírus BK. O diagnóstico tardio dessa complicação resulta em perda rápida da função do enxerto em mais de 50% dos pacientes (CUKURANOVIC et al., 2012; SELLARES et al., 2012).

Os transplantados não estão sujeitos à reativação e complicações em decorrência da infecção pelos poliomavírus apenas nos primeiros meses pós-transplante, mas por longos períodos de tempo. As infecções pelo BK podem surgir nas 8 primeiras semanas pós-transplante, como ocorre em 50% dos casos, bem como surgir anos depois da realização do transplante (CASTÓN; CISNEROS; TORRE-CISNEROS, 2007). Conforme Pollara e colaboradores, pacientes transplantados com viremia positiva durante os primeiros seis meses pós-transplante não apresentaram deterioração progressiva do tecido renal, mas os pacientes com viremia detectada 10 meses após o transplante mostraram disfunção do enxerto, sendo esta estabilizada apenas com redução dos imunossuppressores (POLLARA et al., 2011). Assim, para minimizar os riscos de reativação, complicações e rejeição do enxerto os

transplantados devem estar sob uma contínua vigilância através de acompanhamento médico e laboratorial.

### II.1.7 Diagnóstico

O diagnóstico da LMP, causada pelo poliomavírus JC, é realizado por análises histológicas e exames como ressonância magnética e tomografia. O achado do vírus é efetuado por biópsia cerebral ou por pesquisa dos antígenos virais através de hibridização *in situ*, por exemplo, e a pesquisa de ácido nucleico é efetuada costumeiramente por PCR do líquor (AHSAN, 2006; TAN; KORALNIK, 2010). O isolamento viral não é uma prática frequente e requer células fetais gliais humanas primárias. O uso de sorologia é limitado em pacientes com LMP, visto que estes anticorpos são comuns e os títulos virais não são muitas vezes detectados no líquor (SANTOS et al., 2008).

O diagnóstico das infecções por poliomavírus BK é baseado na análise de urina e sangue, citologia (células de decoy), biopsias e histopatologia (VATS; RANDHAWA; SHAPIRO, 2006). A sorologia não é útil, pois os pacientes imunodeprimidos não produzem títulos altos de anticorpos. Como isolamento viral não é realizado com frequência para esses vírus, as técnicas moleculares são as mais empregadas para a detecção dos poliomavírus, sendo a qPCR o método de escolha e aceito pelo FDA para diagnóstico de poliomavírus BK no sangue e na urina (BECHERT et al., 2010; FDA, 2012). A detecção em urina e sangue é possível porque os poliomavírus podem ser encontrados em valores que excedem um bilhão de cópias genômicas/mL na urina ou mais de  $10^5$  cópias/mL no sangue. O uso de urina não é incomum, embora Cukuranovic e colaboradores (2012) citem que para o poliomavírus BK, a detecção no sangue é mais preditiva do que na urina (CUKURANOVIC et al., 2012).

A origem do DNA do poliomavírus BK no sangue não é clara, mas provavelmente é proveniente de partículas virais que replicam em células epiteliais tubulares, ou que trafegam via membrana basal lesada para capilares peritubulares e estabelecem infecção sistêmica. Alternativamente, também é possível que o DNA viral presente no soro derive da replicação do vírus em tecidos extrarenais (DADHANIA, 2012; TONG et al., 2004).

A viremia por poliomavírus BK é um excelente marcador universal de nefropatia causada por esse vírus. Além disso, a associação da nefropatia e da cistite hemorrágica em transplantados renais com a existência de viremia é bem enfatizada. Transplantados renais apresentam viremia para poliomavírus BK logo no início do

desenvolvimento da doença renal, a qual pode ser diagnosticada antes mesmo do estabelecimento de lesão histopatológica e disfunção do enxerto (BOECKH et al., 2005; ESPY et al., 2006). A detecção precoce traz o benefício de diagnóstico rápido, permitindo intervenção terapêutica de forma mais eficiente.

### II.1.8 Tratamento

O tratamento para LMP não é efetuado com uma medicação específica, mas pode ser feito com medicamentos como citarabina, cidofovir, risperidona, mirtazapina, interferon  $\alpha$  e  $\beta$ , topotecan, inteleucina 2, inibidores seletivos de captação de serotonina e mefloquina como revisado por Patel e colaboradores (2011) e Brew e colaboradores (2010), porém esses medicamentos apresentam eficácia contraditória contra a LMP e o uso é bastante discutidos (BREW et al., 2010; PATEL et al., 2011; TAN; KORALNIK, 2010).

No caso de nefropatia causada por poliomavírus BK em transplantados renais, o único manejo clínico que parece favorecer a manutenção do enxerto é a redução dos imunossuppressores e, por vezes, a utilização de cidofovir em baixas doses como revisado por Vats e colaboradores (2006). Contudo, o cidofovir possui efeito nefrotóxico, não sendo muito conveniente para o tratamento deste tipo de complicação (STRASFELD; CHOU, 2010; VATS et al., 2006). O tratamento com leflunomida parece apresentar bons resultados para redução da virúria e viremia e o uso de fluoroquinolonas e imunoglobulinas também têm sido descrito para o tratamento de infecções pelo poliomavírus BK (HILTON; TONG, 2008; LEUNG et al., 2005; WILLIAMS, J. W. et al., 2005).

Para ambos os vírus e suas complicações não há medicamentos específicos e métodos preventivos, como através da imunização por vacinas, assim a imunomodulação adequada e a prevenção da progressão de complicações parecem ser as formas mais sensatas de assegurar um bom prognóstico para os pacientes (SANTOS et al., 2008).

### II.1.9 PCR em tempo real

A PCR consiste na amplificação, *in vitro*, de sequências genômicas específicas a partir de uma pequena quantidade de DNA molde heterogêneo. Esta técnica foi criada em 1983 por Kary Mullis e disponibilizada na forma quantitativa (qPCR) em 1996 pela Applied Biosystems. A qPCR é considerada uma metodologia precisa e sensível para detecção e quantificação de ácidos nucleicos e, atualmente, é

bastante utilizada em pesquisas moleculares e para diagnóstico clínico (DORAK, 2006; THEOPHILUS, 2008).

A qPCR ou PCR em tempo real analisa ciclo a ciclo o acúmulo de material amplificado via um repórter fluorescente, que pode ser um ligante de DNA ou um oligonucleotídeo fluorescente. O SYBR Green é um exemplo de ligante de DNA, que intercala apenas DNA dupla fita permitindo a detecção e quantificação do material amplificado. Os oligonucleotídeos na forma de sondas usados na qPCR são formados por um fluoróforo e um “silenciador da fluorescência” (Quencher), que emprega um mecanismo de transferência de energia por ressonância para suprimir a fluorescência do fluoróforo (FRET *probes*). As sondas são desenhadas para hibridizar na sequência alvo entre os dois iniciadores na amplificação, como ocorre no método TaqMan e *molecular beacons*. O método TaqMan (*hydrolysis probes*) aproveita a atividade exonuclease 5'→3' da Taq DNA polimerase para clivar/degradar a sonda, liberando o fluoróforo, enquanto o método por *molecular beacons* afasta o quencher do fluoróforo no momento da hibridização, permitindo a expressão da fluorescência (BUSTIN et al., 2009; ESPY et al., 2006; THEOPHILUS, 2008).

Independentemente do método usado, o acompanhamento da reação através dos repórteres fluorescentes revela o  $C_q$  (*quantification cycle*) da reação, que é o exato ciclo de incremento da fluorescência com passagem do limiar da linha de base para fluorescência detectável pelo instrumento de PCR. Para realizar a quantificação, é determinado o limiar na fase exponencial de amplificação, que é um valor numérico atribuído a cada corrida para calcular o valor  $C_q$  de cada amplificação. Através do valor  $C_q$  pode ser feita a quantificação do material amplificado em comparação com uma curva padrão (DORAK, 2006; MCPHERSON; MØLLER, 2006). A construção da curva padrão utiliza moléculas alvo purificadas e em concentração conhecida. Como exemplos, pode-se citar oligonucleotídeos sintéticos, material genético obtido de amostras específicas ou DNA clonado, diluído e aliquoteado para utilização durante análises (BUSTIN et al., 2009; MCPHERSON; MØLLER, 2006).

Além dos  $C_q$ s e da quantificação, são gerados diversos outros dados pelos *softwares* dos equipamentos de qPCR. Dados podem ser visualizados na forma de plot de amplificação (*Amplification plot*), o qual dispõe o número de ciclos versus a fluorescência ( $\Delta R_n$ ) ou na forma linearizada na curva de calibração dispondo informações como slope e eficiência em %, por exemplo (BUSTIN et al., 2009). Outra informação importante para a qPCRs utilizando SYBR Green é a curva

## Capítulo II – Revisão bibliográfica 134

de *melting*, que permite a observação da formação de produtos inespecíficos durante a reação. A curva de *melting* é produzida a partir de dados da temperatura de *melting* ( $T_m$ ), que é a temperatura em que a dupla fita de DNA produzida esta 50% na forma simples fita. A  $T_m$  é dependente de características como o tamanho do DNA amplificado e a proporção de CGs no produto (DORAK, 2006; MCPHERSON; MØLLER, 2006).

Por a qPCR ser uma técnica adaptável a detecção de material genético obtido de diversos tipos de amostras, ter boa sensibilidade e especificidade, entre outras vantagens, esta técnica é amplamente empregada no diagnóstico clínico. Para o diagnóstico do poliomavírus BK utilizando sangue e urina o método de escolha e aceito pelo FDA é a qPCR. Assim, neste trabalho utilizou-se uma qPCR para detecção/quantificação de poliomavírus BK conforme descrito e detalhado a seguir (BECHERT et al., 2010; ESPY et al., 2006; FDA, 2012; THEOPHILUS, 2008).

## **II.2 OBJETIVOS**

### **II.2.1 Objetivo geral**

Implantar uma reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) para poliomavírus BK.

### **II.2.2 Objetivos específicos**

- Amplificar a região correspondente ao antígeno T do poliomavírus BK;
- Construir padrões de reação através da clonagem do gene amplificado em plasmídeos;
- Implantar a qPCR utilizando amostras clínicas;
- Analisar amostras clínicas de pacientes submetidos a transplante renal em relação à infecção por poliomavírus BK.

### II.3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### II.3.1 Amostras

Amostras de DNA extraídas de 200 µL de sangue total, utilizando o kit Biopur Mini Spin Plus (Biopur), foram gentilmente cedidas pelo HEMOSC (Hemocentro de Santa Catarina). Estas amostras provem de pacientes transplantados renais em acompanhamento médico e foram empregadas neste trabalho para a análise de Poliomavírus BK por qPCR. Entretanto, as amostras de DNA cedidas não levam a identificação dos pacientes nem qualquer dado associado a eles. O transporte das amostras do HEMOSC até o Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC (LVA) foi realizado em caixa térmica contendo gelo, sendo as amostras posteriormente acondicionadas a – 20°C por no máximo 4 meses até o momento da análise. O DNA foi quantificado e a pureza avaliada no leitor NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Life Science).

#### II.3.2 Produção dos padrões

Amostras de DNA de poliomavírus BK, gentilmente cedidas pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Franco da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), foram utilizadas para os testes de avaliação dos iniciadores em PCR convencional e para a produção dos insertos para a clonagem em bactérias.

##### II.3.2.1 Escolha dos iniciadores

Através de revisão da literatura foram escolhidos iniciadores anteriormente utilizados para estudos de detecção e quantificação de poliomavírus BK em amostras clínicas por qPCR, conforme dispostos nos trabalhos de Dumoulin e Hirsch, (2011) e de Egli e colaboradores (2009) (DUMOULIN; HIRSCH, 2011; EGLI et al., 2009). Os iniciadores escolhidos são dirigidos para a região do gene correspondente ao Ag T (GenBank: KF445132.1) e foram sintetizados pela empresa Exxtend - soluções em oligos (Quadro II. 1). A adequabilidade e especificidade dos iniciadores foi verificada por análise no banco de dados GenBank e por meio dos *softwares* PrimerBlast (NCBI), PrimerSelect – *version* 7.0.0 e BioEdit Sequence Alignment Editor – *version* 7.1.3.0.

**Quadro II. 1:** Sequências dos iniciadores BKF e BKR

Poliomavírus BK Ag T*	Sequências dos iniciadores
<b>BKF</b>	5' – AGCAGGCAAGGGTTCTATTACTAAAT -3'
<b>BKR</b>	5' – GAAGCAACAGCAGATTCTCAACA -3'

\* Tamanho do produto de PCR = 132 pb

**II.3.2.2 Produção do inserto (AT132)**

Os insertos foram produzidos por PCR convencional, após padronização, utilizando reagentes da Promega e GoTaq<sup>®</sup> Flexi DNA polymerase (5 U/ $\mu$ L) em reações de 25  $\mu$ L nas seguintes concentrações: tampão da enzima 1 x (pH 8,5 e sem magnésio), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 1,0  $\mu$ M de cada um dos iniciadores BKF e BKR, 1 U de Taq polimerase e 70 ng de DNA molde de poliomavírus BK. As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, ligação dos iniciadores a 52° por 1 min, extensão a 72°C por 30 seg, e extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos foram aplicados em gel de poliacrilamida 10% e a corrida eletroforética realizada em sistema Mini Trans-Blot<sup>®</sup> Cell (Bio-Rad) (70 – 90 V) com tampão TBE 1 x. Foram aplicados no gel 8  $\mu$ L de cada amostra acrescidos de 20% de Loading dye e 2% de GelRed para visualização das bandas no sistema fotodocumentador MiniBIS Pro (DNR Bio - Imaging Systems). Para a clonagem, o produto de PCR foi purificado a partir do gel de agarose 1% com o Kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). A dosagem e os parâmetros de pureza dos produtos foram verificados no equipamento NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Life Science).

**II.3.2.3 Plasmídeo**

Para a clonagem foi utilizado o kit pGEM<sup>®</sup> - T Easy Vector Systems A1380 (Promega). O kit contém um vetor linearizado com sítios de iniciação de transcrição e promotores para T7 RNA polimerase e SP6 RNA polimerase, um gene de resistência para ampicilina e uma região codificadora para  $\beta$  - galactosidase. A efetiva inserção do produto de interesse ao plasmídeo interrompe a sequência da  $\beta$  - galactosidase, que passa a não ser expressa, consequentemente não clivando o substrato X-Gal adicionado na cultura bacteriana. A não clivagem do substrato resulta na formação de colônias brancas (vetor com inserto),

## Capítulo II – Materiais e métodos 138

enquanto colônias contendo a  $\beta$  - galactosidase funcional apresentam coloração azul (vetor sem inserto).

### II.3.2.4 Ligação, clonagem e seleção dos clones transformados

A ligação dos insertos (AT132) ao vetor pGEM<sup>®</sup> - T Easy Vector foi realizada nas seguintes condições: 5  $\mu$ L de tampão 2 x (60 mM de Tris-HCl, 20 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 mM de DTT, 2 mM ATP e 10% polietilenoglicol), 1  $\mu$ L de pGEM<sup>®</sup> - T Easy Vector (50 ng/ $\mu$ L), 3  $\mu$ L de produto de PCR (49,5 ng/ $\mu$ L) e 1  $\mu$ L de T4 DNA Ligase (3 U/ $\mu$ L). A reação ocorreu a 4°C em incubação de 14 a 16 h no termociclador Techne (Flexigene), seguindo recomendações do fabricante.

Células de *Escherichia coli* DH5 –  $\alpha$  (Invitrogen) cálcio competentes, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Biologia Molecular e Micobactéria (LBMM-UFSC), foram utilizadas para transformação. Aproximadamente 100  $\mu$ L de células (10<sup>7</sup> a 10<sup>8</sup> células/mL) foram descongeladas em gelo (5 a 10 min), homogeneizadas com 5  $\mu$ L da reação de ligação e incubadas por 30 min em banho de gelo. A internalização do plasmídeo foi realizada por choque térmico em banho a 42°C por 45 seg e 2 min em banho de gelo. Aos microtubos foram adicionados 400  $\mu$ L de meio SOC (2,0 g Bacto®-tryptone, 0,5 g de Bacto®-yeast, 1 mL de NaCl 1M, 0,25 mL de KCl 1M, 1 mL de Mg<sup>2+</sup> 2M e 1 mL de glicose 2M) para incubação por 90 min a 37°C sob agitação permanente (100 rpm). Os clones recombinantes foram selecionados com base na cor das col nias (azul/branco) após crescimento em  gar LB (Luria – Bertani) suplementado com 100  $\mu$ g/mL de ampicilina, 20  $\mu$ g/mL de X-Gal e 20  $\mu$ g/mL de IPTG. A presenç a do inserto foi confirmada por PCR convencional com os iniciadores universais M13 (Quadro II. 2), seguindo as mesmas concentrações de reagentes descritas no item II. 3.2.2 e usando como DNA molde uma colônia bacteriana.

#### Quadro II. 2: Sequência de iniciadores universais M13

pGEM <sup>®</sup> - T Easy Vector + inserto*	Sequências dos iniciadores
Universal M13F	5' - GTAAAACGACGGCCAG - 3'
Universal M13R	5' - CAGGAAACAGCTATGAC - 3'

\*Tamanho do produto: 248 pb do plasmídeo + 132 pb do inserto = 380 pb.

Foram adotadas as seguintes condições para a PCR: desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguida de 35 ciclos a 95°C por 30 seg, 55° por 30 seg, 72°C por 2 min e extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram avaliados em gel de agarose 1% de forma semelhante ao descrito no item II 3.2.2. O tamanho esperado dos produtos com os iniciadores M13 é de 380 pb.

### **II.3.2.5 Repique e produção das suspensões bacterianas padrão**

As colônias transformadas foram repicadas em tubos contendo 5 mL de meio LB líquido com 20 µL de ampicilina (25mg/mL) e incubadas em estufa microbiológica a 37°C por aproximadamente 16 h. Após crescimento, o DNA bacteriano foi extraído por fervura e amplificado por PCR com os iniciadores M13F e M13R nas condições descritas anteriormente.

As colônias positivas na PCR foram aliqüotadas em microtubos estéreis de 0,5 mL contendo meio LB e glicerol autoclavado (30%) para armazenamento a – 80°C até momento da extração do DNA plasmidial e produção dos padrões da qPCR.

### **II.3.2.6 Extração de DNA plasmidial**

Um volume de 5 mL de suspensão bacteriana foi centrifugado a 4500 x g por 5 min a 4°C, o sobrenadante descartado e o sedimento utilizado para a extração plasmidial por lise alcalina, seguindo o protocolo de Sambrook e Russel, 2001 com pequenas modificações.

### **II.3.2.7 Confirmação da presença do inserto no DNA plasmidial**

O DNA plasmidial foi aplicado em gel de agarose 1% para a verificação da integridade do mesmo e uma alíquota do produto extraído foi submetida a PCR com os iniciadores BKF e BKR para a confirmação da amplificação da região de interesse. O produto de PCR foi aplicado em gel de poliacrilamida 10%, sob as mesmas condições descritas no item II. 3.2.2, para avaliação da amplificação de AT132.

### **II.3.3 Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)**

As qPCRs para detecção e quantificação de poliomavírus BK usando DNA extraído de sangue total foram realizadas com a Master Mix Maxima SYBR Green/ROX qPCR 2 x (Fermentas). Como controles foram utilizadas amostras de DNA negativas e positivas para poliomavírus BK, segundo análise do HEMOSC, além de controles de reação isentos de DNA. A reação foi ajustada para 15 µL, sendo 6,25 µL de Master Mix, 1,5 µL de cada iniciador a 3 µM, 0,75 µL de água DEPC

## Capítulo II – Materiais e métodos 140

e 5 µL da amostra de DNA. As qPCRs foram pré-incubadas a 50°C por 2 min para descontaminação, conforme instruções do fabricante, após sofreram desnaturação inicial a 95°C por 10 min seguidos por 30 a 40 ciclos com desnaturação a 95° por 15 seg com ligação dos iniciadores e extensão a 60°C por 60 seg. As reações foram realizadas no StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) em placas MicroAmp® Optical 96-Well de 0,1 mL recobertas com filme adesivo óptico (Applied Biosystems®). Os resultados obtidos foram analisados no *software* StepOne™ Version 2.1.

### II.3.3.1 Determinação da concentração dos iniciadores e curva de calibração.

A fim de confirmar a concentração de iniciadores sugerida pelo fabricante da Master Mix, reações em duplicata contendo 4, 3, 2, 1 e 0,5 µM dos iniciadores BKF e BKR foram avaliadas com DNA conhecidamente positivo para poliomavírus BK. Para a curva de calibração, diluições 1 : 10 ( $10^9$  a  $10^5$  cópias / mL) do DNA plasmidial extraído dos clones recombinantes, foram submetidas a qPCR seguindo os volumes e condições descritos no item II. 3. 3.

### II.3.3.2 Limite de detecção da qPCR

Uma amostra de DNA obtida de sangue total, conhecidamente positiva para poliomavírus BK, foi quantificada por qPCR seguindo o protocolo estabelecido neste trabalho. Após a quantificação foram feitas diluições da amostra e considerada positiva a última diluição com pico na temperatura de *melting* característica para os produtos obtidos com os iniciadores BKF e BKR. Controles com amostras positivas e negativas foram empregados, bem como controles de reação isentos de DNA.

### II.3.3.3 Análise das amostras

Das amostras recebidas do HEMOSC, 29 foram utilizadas para os ensaio de detecção/quantificação de poliomavírus BK por qPCR em virtude da limitação de reagentes. Das 29 amostras, 9 eram positivas, 10 negativas e 10 amostras não haviam sido avaliadas para detecção/quantificação do poliomavírus BK. As amostras não avaliadas para poliomavírus BK foram avaliadas pelo HEMOSC para CMV, sendo 5 positivas e 5 negativas para detecção/quantificação de CMV. Em todas as placas submetidas à qPCR foram utilizados no mínimo 3 concentrações dos padrões de quantificação em duplicata, uma amostra conhecidamente positiva e uma conhecidamente negativa para poliomavírus BK, além de um controle de reação isento de amostra. Os

resultados foram analisados no *software* StepOne™ Version 2.1. Após as qPCRs, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10% para confirmação da especificidade do produto amplificado.

Para a quantificação em cópias genômicas / mL, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ C\u00f3pias gen\u00f4micas / mL} = \frac{\text{Vpe} \times \text{Q}}{\text{Va} \times \text{Vu}}$$

Vpe = Volume de amostra obtido pela extra\u00e7\u00e3o em  $\mu\text{L}$ ;

Q = Quantifica\u00e7\u00e3o atribu\u00edda pelo *software* da PCR;

Va = Volume de amostra (sangue) utilizada em mL;

Vu = Volume do produto de extra\u00e7\u00e3o usado por rea\u00e7\u00e3o de PCR em  $\mu\text{L}$ .

### II.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### II.4.1 Amostras

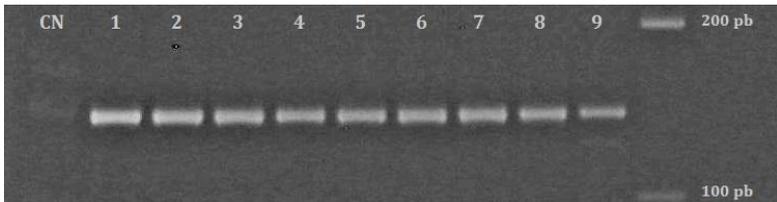
As alíquotas de DNA extraídas pelo HEMOSC, foram quantificadas anteriormente à utilização na qPCR. As concentrações variaram de 8,9 a 62,0 ng/μL e a pureza (A260/A280) ficou entre 1,192 e 2,682 para todas as alíquotas utilizadas durante as análises. Conforme dados do fabricante do kit de extração (Biopur Mini Spin Plus), o rendimento da extração a partir de 200 μL de sangue total de um indivíduo saudável varia normalmente entre 15 ng/μL a 50 ng/μL, porém recuperações menores podem acontecer em amostras tratadas com anticoagulante, e a pureza (A260/280) obtida seria entre 1,7 a 2,0. Idealmente, a relação de absorbância A260/280 deve estar entre 1,8 e 2,0, valores maiores ou menores indicam contaminação por RNA ou proteínas (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Neste estudo, como já foram utilizadas amostras de DNA extraídas, não foi possível otimizar o processo de extração, sendo que os dados de pureza forneceram subsídios somente para investigação de possíveis ampliações.

#### II.4.2 Produção do inserto

Durante o estabelecimento da PCR foi observada a amplificação do fragmento AT132 em todas as temperaturas testadas (44,0°C a 53,1°C), conforme ilustrado na figura II. 2. A definição das temperaturas iniciais e finais para a curva de temperatura foi realizada com base nos dados do fornecedor dos oligonucleotídeos (Exxtend – Solução em oligos), dados da literatura e análise da sequência (DUMOULIN; HIRSCH, 2011; EGLI et al., 2009). A especificidade dos iniciadores foi confirmada também pelo algoritmo BLASTn no banco de dados GenBank (GenBank: KF445132.1).

**Figura II. 2:** Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% para os produtos de PCR AT132 obtidos com os iniciadores BKF e BKR. Curva com temperatura de anelamento variando de 44,0°C a 53,1°C (1- 44,0°C, 2 - 44,7°C, 3 - 45,6°C, 4 - 46,6°C, 5 - 48,0°C, 6 - 49,4°C, 7 - 50,7 °C, 8 - 52,0 °C e 9 - 53,1°C).

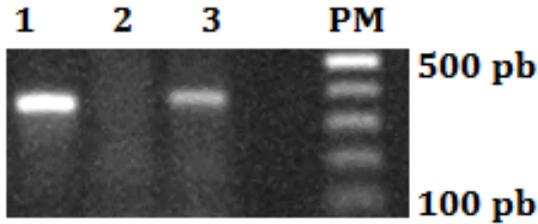


A PCR convencional foi padronizada utilizando a temperatura de anelamento de 52°C devido à apropriada amplificação do produto AT132 verificada no gel de poliacrilamida 10%, e por ser a temperatura que garantiria maior estringência, para amplificação de produtos específicos.

### II.4.3 Transformação e seleção dos clones recombinantes

Como o plasmídeo pGEM<sup>®</sup> - T Easy Vector possui sítios para o anelamento dos iniciadores M13, que flanqueiam o sítio de clonagem, a utilização dos iniciadores M13 permitiu a amplificação do fragmento introduzido ao vetor e de parte das regiões plasmidiais periféricas ao inserto. Sabendo-se que as frações do plasmídeo amplificadas somam 248 pb e que o inserto AT132 possui 132 pb o tamanho do produto esperado é de 380 pb. O tamanho correspondente pode ser visualizado na imagem do gel de agarose 1% na figura II. 3.

**Figura II. 3:** Produto de PCR obtido com os iniciadores M13F e M13R. Produtos com 380 pb, o que inclui amplificação de frações do pGEM<sup>®</sup> - T Easy Vector (248 pb) somadas ao inserto (132 pb). Culturas 1 e 3 foram positivas para a presença do plasmídeo contendo inserto.



A extração dos plasmídeos, por lise alcalina, da colônia transformada selecionada teve de ser adaptada com redução dos tempos de incubação, pois nas condições recomendadas por Sambrook e Russel (2001) não resultaram em plasmídeos em boas condições de integridade. A concentração final do DNA extraído usado para diluição e produção da curva padrão foi de 4,78  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

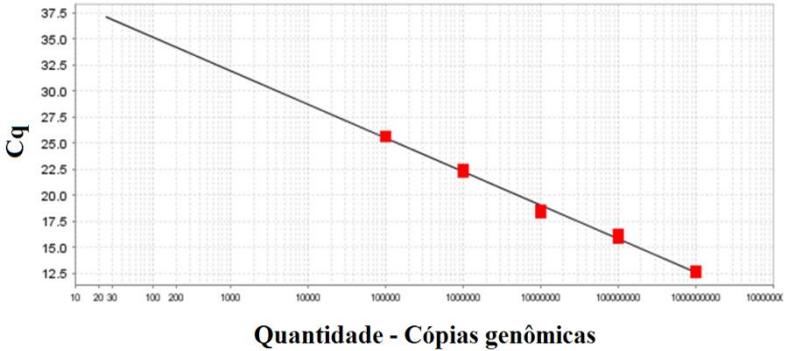
### II.4.4 qPCR utilizando SYBR Green.

#### II.4.4.1 Curva padrão

A indicação da concentração dos iniciadores dada pelo fabricante da master mix foi confirmada através da qPCR, que apresentou maior  $\Delta\text{Rn}$  e menor  $C_q$  com a concentração de 3  $\mu\text{M}$  de cada iniciador. A curva de calibração obtida com concentrações de DNA de  $10^9$  cópias genômicas/ $\mu\text{L}$  a  $10^5$  cópias genômicas/ $\mu\text{L}$  resultou em um *Slope* de -3,224 e uma eficiência de 104 % (Figura II. 4). A interpolação do eixo Y foi em 41,603 e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,995.

A eficiência de amplificação é determinada pelo *slope*, ( $10^{-1/\text{slope}}$  -1), que dará informações sobre a quantidade de material em dupla fita resultante por ciclo. O valor de  $R^2$  (coeficiente de determinação) é importante por relacionar duas grandezas em comparação em um gráfico de função linear, como o referente à curva padrão disposto na figura II. 4 (BUSTIN et al, 2009).

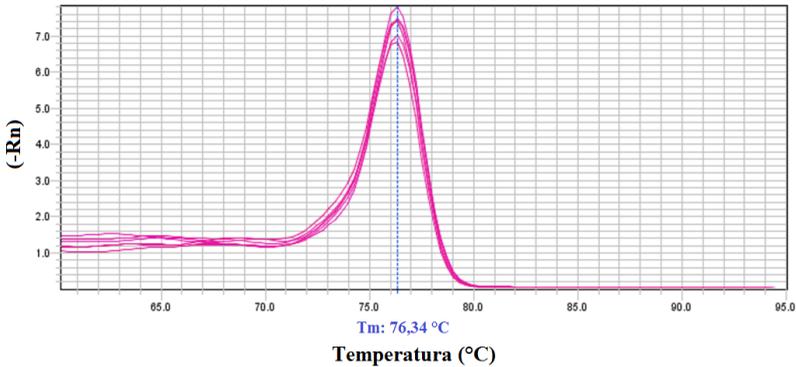
**Figura II. 4:** Curva padrão obtida com DNA plasmidial extraído dos clones bacterianos recombinantes. Observam-se cinco pontos na curva com concentrações de DNA variando de  $10^5$  a  $10^9$  cópias genômicas/ $\mu$ L. Relação entre  $C_q$  (eixo y) e quantidade de cópias genômicas (eixo x).



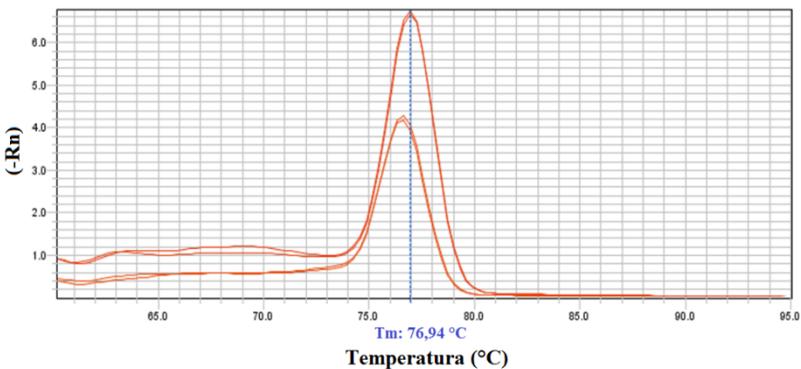
#### II.4.4.2 Curva de *melting*

Os calibradores apresentaram uma curva de *melting* desprovida de ampliações inespecíficas, com picos únicos na temperatura característica para os produtos AT132 ( $\sim 76,5^\circ\text{C}$ ) (Figura II. 5). Da mesma forma que os calibradores, todas as amostras com amplificação anteriores ao  $C_q$  32 demonstraram picos de *melting* em torno da temperatura aproximada para os produtos de PCR AT132 ( $\sim 76,5^\circ\text{C}$ ) como exemplificado na figura II. 6.

**Figura II. 5:** Picos indicando a temperatura de *melting* obtida para os padrões de reação da qPCR. Pode ser observado um pico único na temperatura de *melting* de ~ 76,5 °C. A não formação de picos inespecíficos em temperaturas diferentes indica a obtenção de um único produto (AT132) utilizando os iniciadores BKF e BKR.



**Figura II. 6:** Picos resultantes da amplificação de AT132 a partir de amostras clínicas. Pode ser observada a formação de picos na temperatura de *melting* característica para os produtos AT132 (~ 76,5 °C). A temperatura de *melting* semelhante à apresentada pelos padrões de reação e a não formação de picos inespecíficos indicam a amplificação de um único produto a partir do material genético contido nas amostras clínicas testadas.

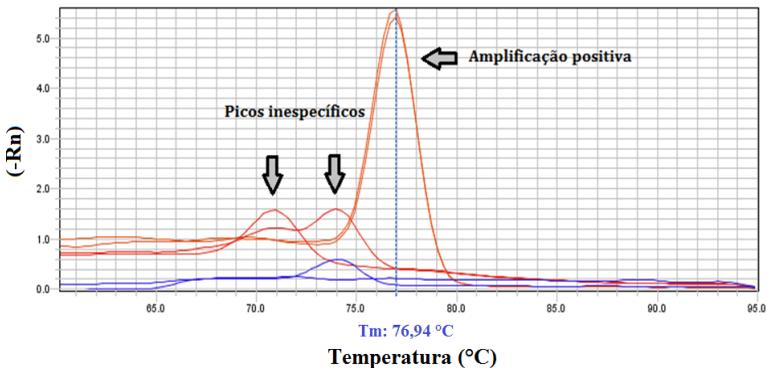


Na maioria das amostras foram vistos picos únicos, porém em algumas situações pode ser constatada a presença de picos em temperaturas de *melting* mais baixas do que o esperado, sendo estas

amostras classificadas como amostras com picos múltiplos. Amostras com amplificação não características do produto AT132 retrataram picos de *melting* com menor  $-Rn$ , sendo esses possivelmente associados à formação de dímeros de iniciadores. Amplificações inespecíficas com materiais genéticos não pertencentes à região do Ag T eventualmente poderiam acontecer. Seria possível também surgirem interferências na amplificação em função da adição dos controles internos nas amostras, realizada pelo HEMOSC durante a extração do DNA para validação das suas análises. Esses padrões podem ser materiais genéticos sintéticos ou de outros organismos e com frequência não tem sequências divulgadas pelas empresas desenvolvedoras dos kits de diagnóstico. No entanto, essas interferências parecem pouco prováveis neste caso, visto que o controle negativo, desprovido dos analitos, ocasionalmente apresentava amplificação em  $C_q$ s maiores que 32 em temperaturas também apresentadas pelas amostras com picos múltiplos.

qPCRs com menores concentrações de iniciadores (150 nM, 125 nM e 75 nM) foram realizadas para as amostras com picos múltiplos. As qPCRs utilizando 150 nM e 125 nM dos iniciadores reduziram o  $-Rn$  dos picos inespecíficos e em algumas amostras até mesmo os eliminaram (Figura II.7). A concentração de 75 nM resultou em curva de calibração com baixa eficiência (84,864 %), sendo inadequada para as amplificações.

**Figura II. 7:** Curva de *melting* resultante de qPCR de amostras clínicas. Pode ser observada a temperatura de *melting* característica para os produtos de PCR com amplificação positiva e picos inespecíficos formados anteriormente a temperatura de 76,94 °C.



### II.4.5 Análise das amostras clínicas

As amostras foram divididas em três grupos para representação e discussão dos resultados conforme disposto na tabela II. 1.

- Grupo 1 - amplificação positiva para poliomavírus BK conforme o HEMOSC;
- Grupo 2 - amplificação negativa para poliomavírus BK conforme o HEMOSC;
- Grupo 3 - não analisadas para poliomavírus BK pelo HEMOSC e analisadas para CMV.

Conforme Bustin e colaboradores (2009), condições de rejeição de resultados podem ser formuladas de acordo com os dados relativos aos controles. Na qPCR em estabelecimento foi determinada uma condição para rejeição de amostras com amplificação, teoricamente, resultantes de formação de produtos inespecíficos. Durante as análises, nenhuma amostra do grupo 1 amplificou pela metodologia utilizando SYBR Green em  $C_q$  maior que 32. Amplificações posteriores a este  $C_q$  foram vistas apenas nas amostras do grupo 2, e ocasionalmente nos controles negativos da reação, porém essas amplificações não possuíam picos de *melting* nas temperaturas esperadas para os produtos AT132. Assim, a condição para determinação dos resultados neste estudo foi: “Amostras com  $C_q$  maior ou igual a 32, e com temperatura de *melting* diferente do esperado para os produtos AT132, são consideradas negativas para a amplificação. E, toda amostra com  $C_q$  menor que 32, e com temperatura de *melting* característica dos produtos AT132, são consideradas positivas para a amplificação de DNA correspondente ao poliomavírus BK.”

As amostras dos grupos 1 e 2, analisadas pela metodologia utilizando SYBR Green, apresentaram resultados de amplificação compatíveis com os obtidos pelo HEMOSC quando considerada a condição de rejeição estabelecida neste trabalho. Análises dos produtos de qPCR dos 3 grupos avaliados em gel de poliacrilamida 10% confirmaram os resultados obtidos e os tamanho dos produtos esperados (dados não mostrados). Das 10 amostras do grupo 3, como pode ser observado na tabela II. 1, uma mostrou amplificação dentro das condições estabelecidas para poliomavírus BK. Esta amostra foi positiva também para CMV, conforme laudo do HEMOSC. O estabelecimento de uma relação entre infecções pelo CMV e pelo poliomavírus BK na literatura é bastante confuso e os estudos são contraditórios quanto à

existência desta relação, embora alguns estudos demonstrem altas taxas de coinfeção por esses dois vírus (WATCHARANANAN et al., 2010).

No estudo de Watcharananan e colaboradores (2010) foi avaliada a presença de monoinfeções e coinfeções em pacientes pediátricos transplantados para CMV, poliomavírus (JC e BK) e adenovírus. Das 219 amostras de sangue analisadas, 119 apresentavam DNA viral na análise por qPCR. Das amostras positivas, 36,1% (43 amostras) apresentaram viremia para poliomavírus BK, 27,7% (33 amostras) viremia para citomegalovírus, 7,6% (9 amostras) viremia para adenovírus e 0,84% (1 amostra) para poliomavírus JC. A coinfeção ocorreu em 23,5% das amostras (n = 28), e do total de amostras com coinfeção, 18,5% (n = 22) correspondiam a coinfeção com CMV e poliomavírus BK. A segunda maior coinfeção ocorreu entre CMV e adenovírus em 3,4% das amostras (n = 4) (WATCHARANANAN et al., 2010).

Na clínica, normalmente é utilizado um controle interno para que possa ser feito o cálculo da eficiência de reação. Neste trabalho foi efetuada a tentativa de utilização de um conjunto de iniciadores dirigido a um gene constitutivo humano ( $\beta$  – globina), porém este par de iniciadores não se mostrou efetivo e seu emprego foi desconsiderado. Assim, na fórmula utilizada para a quantificação não há correção pela eficiência de reação.

Como pode ser observado na tabela II. 1, as quantificações em cópias genômicas/mL para o poliomavírus BK variaram entre  $9,8 \times 10^5$  a  $6,7 \times 10^7$  cópias genômicas/ mL. Os resultados de quantificação do HEMOSC não foram semelhantes aos obtidos pela qPCR utilizando SYBR Green, no entanto como as metodologias de detecção não são correspondentes e os cálculos de quantificação não são os mesmos é aceitável tal discrepância.

Em um estudo com 100 amostras de plasma realizada por Stellrecht e colaboradores (2013), as quantificações tiveram amplitude variando de  $10^2$  a  $10^9$  cópias genômicas/mL, utilizando diferentes variações de qPCR. No trabalho de Pollara e colaboradores com pacientes transplantados renais, as quantificações variaram entre  $10^3$  a  $10^6$  cópias/ mL para as amostras de plasma analisadas. Assim, as quantificações obtidas neste trabalho estão de acordo com os valores normalmente encontrados em amostras clínicas e a diferença de quantificação devido à metodologia aplicada também é sustentada pela literatura (POLLARA et al., 2011; STELLRECHT et al., 2013).

O limite inferior de detecção da qPCRs TaqMan utilizando os iniciadores BKF e BKR por Dumoulin e Hirsch (2011) foi de 415 cópias

## Capítulo II – Resultados e discussão 150

genômicas/ mL e o limite de detecção informado pelo fabricante do kit BKV Q-PCR Alert Kit (Nanogen), utilizado pelo HEMOSC é de 125 cópias genômicas/ mL (DUMOULIN; HIRSCH, 2011). Esses dois limites foram determinados a partir da diluição de DNA plasmidial padrão. O limite de detecção verificado para a metodologia utilizando SYBR Green neste trabalho foi obtido por diluição de material genético extraído de uma amostra conhecidamente positiva para poliomavírus BK. O limite inferior de detecção para a metodologia utilizando SYBR Green foi de 3600 cópias genômicas /mL ou 18 cópias genômicas/ reação.

Em um estudo com pacientes submetidos a transplante renal, o qual analisou a viremia por poliomavírus BK por qPCR, aproximadamente 57% dos pacientes apresentavam quantificações acima de  $10^4$  cópias genômicas/mL e 86% dos pacientes que desenvolveram nefropatia tubular intersticial possuíam quantificações de DNA viral acima de  $10^4$  cópias genômicas/mL. A quantificação de  $10^4$  cópias genômicas/mL é comumente adotada como um ponto de corte que reflete o risco de nefropatia. Assim, o limite de detecção apresentado pela metodologia utilizando SYBR Green ( $3,6 \times 10^3$  cópias genômicas /mL) é capaz de detectar os valores normalmente considerados de risco para nefropatia em pacientes transplantados (POLLARA et al., 2011).

A qPCR utilizando SYBR Green mostrou resultados interessantes e promissores para sua futura aplicação na clínica. Todas as amostras analisadas corresponderam aos resultados qualitativos obtidos com um kit comercial que emprega TaqMan. Como benefício em relação aos kits comerciais TaqMan, a qPCR utilizando SYBR Green é financeiramente vantajosa, principalmente para as instituições que mantêm grandes rotinas de análises. O pequeno volume de reação utilizado na qPCR utilizando SYBR Green também favorece a redução dos custos.

**Tabela II. 1:** Dados da avaliação de amostras clínicas por qPCR com SYBR Green.

Amostras	DADOS HEMOSC			DADOS qPCR SYBR GREEN					
	CMV	BK	Cop/mL	Cop/mL	Cq médio	Cq DP	Média Tm1	Tm2	Observação
<b>Grupo 1 - Amplificação positiva</b>									
1	21A	NA	(+)	8,44E+01	8,20E+06	24,23	0,198	76,569	
2	18	NA	(+)	1,56E+04	1,20E+07	26,01	0,113	76,791	
3	35	NA	(+)	1,50E+04	1,10E+07	25,41	0,064	76,638	
4	42	NA	(+)	4,83E+03	2,30E+07	25,51	0,021	76,937	
5	21B	NA	(+)	1,90E+04	4,40E+06	24,44	0,049	76,568	
6	13	NA	(+)	5,05E+04	3,70E+06	29,43	0,304	76,646	73,964 Múltiplos picos
7	14	NA	(+)	2,90E+03	5,70E+06	26,32	0,057	76,646	
8	13B	NA	(+)	4,23E+02	9,80E+05	27,73	0,057	76,796	73,666 Múltiplos picos
9	14B	NA	(+)	6,36E+02	5,30E+07	26,42	0,014	76,419	
<b>Grupo 2 - Amplificação negativa</b>									
1	1	NA	LLS	LLS	LLS	Indeterm. ou >32	x	72,835	
2	2	NA	LLS	LLS	LLS	Indeterm. ou >32	x	71,421	
3	3	NA	LLS	LLS	LLS	Indeterm. ou >32	x	72,166	74,103 Múltiplos picos
4	4	NA	LLS	LLS	LLS	Indeterm. ou >32	x	71,269	
5	5	NA	LLS	LLS	LLS	Indeterm. ou >32	x	72,318	
6	6	NA	LLS	LLS	LLS	Indeterm. ou >32	x	73,952	
7	7	NA	LLS	LLS	LLS	Indeterm. ou >32	x	68,44	
8	12	NA	LLS	LLS	LLS	Indeterm. ou >32	x	73,954	
9	9	NA	LLS	LLS	LLS	Indeterm. ou >32	x	72,312	67,543 Múltiplos picos
10	10	NA	LLS	LLS	LLS	Indeterm. ou >32	x	68,144	
<b>Grupo 3 - Não avaliadas para poliomavírus BK pelo HEMOSC</b>									
1	18A	(+)	NA	NA	LLS	Indeterm. ou >32	x	74,116	76,350 Múltiplos picos
2	23	(+)	NA	NA	LLS	Indeterm. ou >32	x	74,113	
3	30	(+)	NA	NA	LLS	Indeterm. ou >32	x	74,226	
4	32	(+)	NA	NA	LLS	Indeterm. ou >32	x	74,115	
5	18B	(+)	NA	NA	6,70E+07	23,768	0,100	76,345	73,97 Múltiplos picos
6	2	LLS	NA	NA	LLS	Indeterm. ou >32	x	74,044	
7	3	LLS	NA	NA	LLS	Indeterm. ou >32	x	73,82	
8	10	LLS	NA	NA	LLS	Indeterm. ou >32	x	73,967	81,863 Múltiplos picos
9	11	LLS	NA	NA	LLS	Indeterm. ou >32	x	73,819	
10	12	LLS	NA	NA	LLS	Indeterm. ou >32	x	74,004	

**Legenda:** Amostras não analisadas (NA); Inferior ao limite de sensibilidade (LLS); (+) Amplificação positiva; Citomegalovírus humano (CMV); Poliomavírus BK (BK); Temperatura de *melting* (Tm); Cópias genômicas por mililitro (Cop/mL); (C<sub>q</sub> DP); *Quantification cycle* (C<sub>q</sub>).

## **II.5 CONCLUSÃO**

A qPCR utilizando SYBR Green mostrou resultados promissores que possibilitam sua futura aplicação para diagnóstico clínico. As amostras clínicas analisadas apontaram resultados qualitativos correspondentes aos obtidos com um kit comercial que emprega TaqMan e as quantificações assemelharam-se aos dados encontrados na literatura. A metodologia apresentou sensibilidade suficiente para determinar o risco de nefropatia em pacientes transplantados renais e devido ao volume de reação e a técnica de detecção é permitida a redução dos custos por amostra em relação à metodologia que utiliza TaqMan.

## **II.6 PERSPECTIVA**

- Inserir um padrão interno de reação através do desenho de um par de iniciadores para um gene constitutivo humano;
- Realizar testes com um grupo maior de amostras para eventuais ajustes na metodologia;
- Implantar a metodologia para diagnóstico clínico;
- Analisar a relação entre valores de quantificação viral e desenvolvimento de nefropatia.

### ***CONCLUSÃO GERAL***

O sistema repórter desenvolvido neste trabalho consiste em uma metodologia inovadora que abre caminhos para a modernização dos sistemas de pesquisa e diagnóstico existentes, através da fusão de técnicas tradicionais com técnicas atuais de biologia molecular. Adicionalmente ao uso para diagnóstico, o sistema repórter pode ser empregado na clínica para realizar testes de resistência aos antivirais e na pesquisa para o desenvolvimento de novos medicamentos. Já a qPCR utilizando SYBR Green parece eficiente no diagnóstico clínico podendo ser uma ferramenta para detectar risco de desenvolvimento de nefropatia em pacientes transplantados renais.

As duas metodologias discutidas neste trabalho visam priorizar pacientes imunodeprimidos, os quais desenvolvem doenças virais oportunistas graves, de difícil diagnóstico e que levam à morbidade e mortalidade considerável. Através deste estudo, buscou-se contribuir seja na forma de conhecimento ou de possível aplicação prática com as áreas da pesquisa e da clínica. Progressos na pesquisa e a reflexão disto em bens que atendam a sociedade, trazendo também benefícios para saúde, dão à pesquisa sua verdadeira função, a de contribuir através do conhecimento para a melhoria da qualidade de vida e para a evolução da sociedade humana.

**REFERÊNCIAS**

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS - ABTO. **Dimensionamento dos transplantes no Brasil e em cada estado (2005-2012)**. São Paulo. 4: 95 p. 2012.

ADAMS, A. B. et al. Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 12, p. 1887-95, 2003.

AHSAN, N. (Ed.). **Polyomaviruses and Human Diseases**. United States: Springer, 2006.

ALVINO, G. M. et al. Replication in hydroxyurea: it's a matter of time. **Molecular Cell Biology**, v. 27, n. 18, p. 6396-406, 2007.

AMENÁBAR, J. J. et al. Encefalitis por virus herpes simple en paciente portadora de trasplante renal. Estudio de un caso y revisión de la literatura. **Nefrología**, v. 26, n. 2, p. 270-273, 2006.

ANDREI, G. et al. Dual infection with polyomavirus BK and acyclovir-resistant herpes simplex virus successfully treated with cidofovir in a bone marrow transplant recipient. **Transplant Infectious Disease**, v. 9, n. 2, p. 126-31, 2007.

ANDREI, G. et al. Heterogeneity and evolution of thymidine kinase and DNA polymerase mutants of herpes simplex virus type 1: implications for antiviral therapy. **Journal Infectious Disease**, v. 207, n. 8, p. 1295-305, 2013.

ARAKAWA, T. et al. Antiviral and virucidal activities of natural products. **Current Medecinal Chemistry**, v. 16, n. 20, p. 2485-97, 2009.

BAR-NUN, S.; SHNEYOUR, Y.; BECKMANN, J. S. G-418, an elongation inhibitor of 80 S ribosomes. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 741, n. 1, p. 123-7, 1983.

BARTEK, J.; LUKAS, J. DNA repair: Cyclin D1 multitasks. **Nature**, v. 474, n. 7350, p. 171-2, 2011.

BECHERT, C. J. et al. Monitoring of BK viral load in renal allograft recipients by real-time PCR assays. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 133, n. 2, p. 242-50, 2010.

BECHO, J. R. M.; MACHADO, H.; GUERRA, M. D. O. Rutina – estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 1, p. 21-25, 2009.

BERRINGTON, W. R. et al. Clinical Correlates of Herpes Simplex Virus Viremia Among Hospitalized Adults. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 9, p. 1295-1301, 2009.

BERTOL, J. W. **Avaliação da atividade anti-herpética de cardenólídeos e derivados**. 2011. 165 f. Dissertação (Mestre). Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BOECKH, M. et al. Emerging viral infections after hematopoietic cell transplantation. **Pediatric Transplantation**, v. 9 Suppl 7, p. 48-54, 2005.

BOGDANOV, A. M. et al. Cell culture medium affects GFP photostability: a solution. **Nature Methods**, v. 6, n. 12, p. 859-60, 2009.

BOGDANOV, A. M.; KUDRYAVTSEVA, E. I.; LUKYANOV, K. A. Anti-fading media for live cell GFP imaging. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e53004, 2012.

BOREL, J. F. et al. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. **Agents Actions**, v. 6, n. 4, p. 468-75, 1976.

BOUWMAN, P.; PHILIPSEN, S. Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. **Molecular Cell Endocrinology**, v. 195, n. 1-2, p. 27-38, 2002.

BREHM, M. A. et al. Allografts stimulate cross-reactive virus-specific memory CD8 T cells with private specificity. **American Journal Transplantation**, v. 10, n. 8, p. 1738-48, 2010.

- BREW, B. J. et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy and other forms of JC virus disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 6, n. 12, p. 667-79, 2010.
- BROOKS, G. F. et al. **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 24. Ohio: McGraw-Hill, 2007.
- BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. Porto Alegre: AMGH, 2012.
- BURKE, J. R.; HURA, G. L.; RUBIN, S. M. Structures of inactive retinoblastoma protein reveal multiple mechanisms for cell cycle control. **Genes & Development**, v. 26, n. 11, p. 1156-66, 2012.
- BURLESON, F. G.; CHAMBERS, T. M.; WIEDBRAUK, D. L. **Virology**. San Diego: Elsevier Science & Technology Books, 1992.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-22, 2009.
- CANN, A. J. **Principles of Molecular Virology**. 4. United States: Leicester, 2005.
- CAON, T. et al. Antimutagenic and antiherpetic activities of different preparations from *Uncaria tomentosa* (cat's claw). **Food and Chemical Toxicology**, 2014.
- CARVALHO, A. D. **Avaliação dos efeitos citotóxicos de cardenolídeos em células tumorais**. 2012. 121 f. Dissertação (Mestre). Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- CASANOVA, J. L.; ABEL, L. The genetic theory of infectious diseases: a brief history and selected illustrations. **Annual Review Genomics Human Genetics**, v. 14, p. 215-43, 2013.
- CASTÓN, J. J.; CISNEROS, J. M.; TORRE-CISNEROS, J. Efectos de la infección viral en el paciente trasplantado. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 25, n. 8, p. 535-548, 2007

CAVINESS, A. C. et al. Direct immunofluorescence assay compared to cell culture for the diagnosis of mucocutaneous herpes simplex virus infections in children. **Journal of Clinical Virology**, v. 48, p. 58-60, 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. **Seroprevalence of Herpes Simplex Virus Type 2 Among Persons Aged 14-49 Years - United States, 2005-2008**. United States: American Medical Association. 304: 849-850 p. 2010.

CHAILLON, A. et al. Case report: benefits of quantitative polymerase chain reaction in the clinical management of herpes simplex virus 1 infection with prominent hepatitis and unusual secondary progression. **Journal of Medical Virology**, v. 84, n. 3, p. 457-61, 2012.

CHONG, S.; KIM, T. S.; CHO, E. Y. Herpes simplex virus pneumonia: high-resolution CT findings. **The British Journal of Radiology**, v. 83, n. 991, p. 585-9, 2010.

CHU, S.; FERRO, T. J. Sp1: regulation of gene expression by phosphorylation. **Gene**, v. 348, p. 1-11, 2005.

CHUDAKOV, D. M. et al. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 1103-63, 2010.

CHUNG, T. D. et al. Protein kinase activity associated with the large subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase (ICP10). **Journal of Virology**, v. 63, n. 8, p. 3389-98, 1989.

CLARIDGE, L. C. et al. Acute liver failure secondary to opportunistic viral infection in adult solid organ transplant recipients. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 105, n. 9, p. 879-82, 2012.

CLAUSS, H. E. et al. Infections in Liver, Kidney, Pancreas, and Intestinal Transplant Recipients. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 35, n. 7, p. 53-59, 2013.

CLEMENTS, J. B.; BROWN, S. M. Herpesviruses. In: BITTAR, E. E. e BITTAR, N. (Ed.). **Principles of Medical Biology**: Greenwich : JAI Press, v.9 B, 1997. cap. 24, p.393-414.

CLERCQ, E. D. The Discovery of Antiviral Agents: Ten Different Compounds, Ten Different Stories. **Medicinal Research Reviews**, v. 28, n. 6, p. 929-953, 2008.

CLONTECH. **pZsGreen1-1 Vector information**. 2004. Disponível em: [http://www.clontech.com/US/Products/Fluorescent\\_Proteins\\_and\\_Repoters/Fluorescent\\_Proteins\\_by\\_Name/ZsGreen1\\_Fluorescent\\_Protein](http://www.clontech.com/US/Products/Fluorescent_Proteins_and_Repoters/Fluorescent_Proteins_by_Name/ZsGreen1_Fluorescent_Protein)

COBRINIK, D. Pocket proteins and cell cycle control. **Oncogene**, v. 24, n. 17, p. 2796-809, 2005.

CUKURANOVIC, J. et al. Viral infection in renal transplant recipients. **Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1- 18, 2012.

DADHANIA, D. BK Virus Infection in renal allograft recipients In: KAPUR, S.; AFANEH, C., *et al* (Ed.). **Current Concepts in Kidney Transplantation** INTECH, 2012.

DAWOOD, F. S. et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 25, p. 2605-15, 2009.

DELEHOZZEE, S. et al. GABP, HCF-1 and YY1 are involved in Rb gene expression during myogenesis. **Genes Cells**, v. 10, n. 7, p. 717-31, 2005.

DOLAN, A. et al. The genome sequence of herpes simplex virus type 2. **Journal of Virology**, v. 72, n. 3, p. 2010-21, 1998.

DOMINGUES, R. B. et al. Diagnósticos alternativos em pacientes com suspeita de encefalite por herpes simplex e negativos à reação em cadeia por polimerase (PCR) **Arquivo de Neuropsiquiatria**, v. 58, n. 4, p. 1073-1080, 2000.

DORAK, M. T. (Ed.). **Real-Time PCR**. 2. Oxford: Taylor & Francis Group, 2006.

## Referências 160

DUMOULIN, A.; HIRSCH, H. H. Reevaluating and optimizing polyomavirus BK and JC real-time PCR assays to detect rare sequence polymorphisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 1382-8, 2011.

EGAN, K. P. et al. Immunological control of herpes simplex virus infections. **Journal of Neurovirology**, v. 19, n. 4, p. 328-45, 2013.

EGLI, A. et al. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 6, p. 837-46, 2009.

EL-SHERBINI, Y. M. et al. Quantitative characterization of cell transduction by HSV-1 amplicons using flow cytometry and real-time PCR. **Journal of Virology Methods**, v. 159, n. 2, p. 160-6, 2009.

ESPY, M. J. et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 165-256, 2006.

EVANS, C. M.; KUDESIA, G.; MCKENDRICK, M. Management of herpesvirus infections. **International Journal Antimicrobial Agents**, v. 42, n. 2, p. 119-28, 2013.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. **Summary of safety and effectiveness data (SSED)**. United States: 63 p. 2012.

FELGNER, P. L. et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. **PNAS**, v. 84, n. 21, p. 7413-7, 1987.

FERREIRA, D. F. Propriedades Gerais dos Herpesvírus. In: LUPI, O.; LAMY, F., *et al* (Ed.). **Infecção por Herpesvírus**. Guanabara Kogan. Rio de Janeiro, 2010. cap. 1, p.1-12.

FISHMAN, J. A. Opportunistic infections-coming to the limits of immunosuppression? **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 10, p. a015669, 2013.

FLINT, S. J. et al. **Principles of Virology**. Washington: ASM Press, 2000. 804 p.

FREEMAN, M. L. et al. Psychological stress compromises CD8+ T cell control of latent herpes simplex virus type 1 infections. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 1, p. 322-8, 2007.

FREITAS, A. M. D. **Avaliação da citotoxicidade e da atividade antiviral de extratos de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, Araucariaceae**. 2001. 84 f. Dissertação (Mestre). Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FRESHNEY, I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**. 5. Hoboken: John Wiley & Sons, 2005.

FRISCH, S.; GUO, A. M. Diagnostic methods and management strategies of herpes simplex and herpes zoster infections. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 29, n. 2, p. 501-26, 2013.

GREAVES, R. F.; O'HARE, P. Sequence, function, and regulation of the Vmw65 gene of herpes simplex virus type 2. **Journal of Virology**, v. 65, n. 12, p. 6705-13, 1991.

GRIMM, S. The art and design of genetic screens: mammalian culture cells. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 3, p. 179-89, 2004.

GUPTA, R.; WARREN, T.; WALD, A. Genital herpes. **Lancet**, v. 370, n. 9605, p. 2127-37, 2007.

HANSON, N.; HENDERSON, G.; JONES, C. The herpes simplex virus type 2 gene which encodes the large subunit of ribonucleotide reductase has unusual regulatory properties. **Virus Research**, v. 34, n. 3, p. 265-80, 1994.

HERTZ, A. et al. Herpesvírus e imunodepressão. In: LUPI, O.; LAMY, F., et al (Ed.). **Infecções por Herpesvírus**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. cap. 13, p.247-274.

HILTON, R.; TONG, C. Y. Antiviral therapy for polyomavirus-associated nephropathy after renal transplantation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 5, p. 855-9, 2008.

## Referências 162

HOY, T. Flow Sorting. In: WULFF, S (Ed.). **Flow Cytometry Educational Guide**. 2. Califórnia: Dako; 2006. p. 47 – 54.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES - ICTV. **Virus Taxonomy: 2012 Release** 2014.

IKEDA, M. A.; JAKOI, L.; NEVINS, J. R. A unique role for the Rb protein in controlling E2F accumulation during cell growth and differentiation. **PNAS**, v. 93, n. 8, p. 3215-20, 1996.

IMPERIALE, M. J.; MAJOR, E. O. Polyomaviruses. In: KNIPE, D. M. e HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. 5: Lippincott Williams & Wilkins, v.2, 2007. cap. 67. p. 2263 – 98.

IRO, M. et al. A reporter cell line for rapid and sensitive evaluation of hepatitis C virus infectivity and replication. **Antiviral Research**, v. 83, n. 2, p. 148-55, 2009.

IWAHORI, S. et al. Enhanced phosphorylation of transcription factor sp1 in response to herpes simplex virus type 1 infection is dependent on the ataxia telangiectasia-mutated protein. **Journal of Virology**, v. 81, n. 18, p. 9653-64, 2007.

KAUFFMAN, G. B.; ADLOFF, J.-P. The 2008 Nobel Prize in Chemistry: Osamu Shimomura, Martin Chalfie, and Roger Y. Tsien : the Green Fluorescent Protein **The Chemical Educator**, v. 14, p. 70-78, 2009.

KHALILI, K.; STONER, G. L. **Human Polyomaviruses: Molecular and Clinical Perspectives**. United States: John Wiley & Sons, 2001.

KHARFAN-DABAJA, M. A. et al. Two cases of progressive multifocal leukoencephalopathy after allogeneic hematopoietic cell transplantation and a review of the literature. **Bone Marrow Transplant**, v. 39, n. 2, p. 101-7, 2007.

KIM, D. B.; DELUCA, N. A. Phosphorylation of transcription factor Sp1 during herpes simplex virus type 1 infection. **Journal of Virology**, v. 76, n. 13, p. 6473-9, 2002.

- KLEIN, N. et al. Assessment of sedative effects of *Passiflora edulis f. flavicarpa* and *Passiflora alata* extracts in mice, measured by telemetry. **Phytotherapy Research**, 2013.
- KNEZ, J. et al. Host cell factor-1 and E2F4 interact via multiple determinants in each protein. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 288, n. 1-2, p. 79-90, 2006.
- KNEZEVIC, A. et al. Disseminated neonatal herpes caused by herpes simplex virus types 1 and 2. **Emerging Infectious Disease**, v. 13, n. 2, p. 302-4, 2007.
- KOLB, G.; KRISTIE, T. M. Association of the cellular coactivator HCF-1 with the Golgi apparatus in sensory neurons. **Journal of Virology**, v. 82, n. 19, p. 9555-63, 2008.
- KRATZ, J. M. et al. Evaluation of anti-HSV-2 activity of gallic acid and pentyl gallate. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 5, p. 903-7, 2008.
- KRISTIE, T. M.; LIANG, Y.; VOGEL, J. L. Control of alpha-herpesvirus IE gene expression by HCF-1 coupled chromatin modification activities. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1799, n. 3-4, p. 257-65, 2010.
- KUNG, S. H. Reporter cell lines for the detection of herpes simplex viruses. **Methods in Molecular Biology**, v. 292, p. 73-82, 2005.
- KUNG, S. H. et al. Rapid diagnosis and quantification of herpes simplex virus with a green fluorescent protein reporter system. **Journal of Virological Methods**, v. 90, n. 2, p. 205-12, 2000.
- KUPPACHI, S.; THOMAS, B.; KOKKO, K. E. BK virus in the kidney transplant patient. **The American Journal of the Medical Science**, v. 345, n. 6, p. 482-8, 2013.
- LANIA, L.; MAJELLO, B.; DE LUCA, P. Transcriptional regulation by the Sp family proteins. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 29, n. 12, p. 1313-23, 1997.

LEUNG, A. Y. et al. Ciprofloxacin decreased polyoma BK virus load in patients who underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Clinical Infectious Disease**, v. 40, n. 4, p. 528-37, 2005.

LEVINE, A. J.; ENQUIST, L. W. History of Virology. In: WILKINS, L. W. (Ed.). **Fields Virology**. Philadelphia, v.1, 2007. cap. 1, p.3 - 19.

LOPEZ, P. Fluorescent Proteins. In: WULFF, S (Ed.). **Flow Cytometry Educational Guide**. 2. Califórnia: Dako; 2006. p. 81 – 88.

LOPEZ, P. **Fluorescent Proteins**. 2. California: Dako, 2006. 119 p.

LORENZI, T. **Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica**. 4. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

LORET, S.; EL BILALI, N.; LIPPE, R. Analysis of herpes simplex virus type I nuclear particles by flow cytometry. **Cytometry Analysis**, v. 81, n. 11, p. 950-9, 2012.

LU, W. W. et al. A dual reporter cell assay for identifying serotype and drug susceptibility of herpes simplex virus. **Analytical Biochemistry**, v. 415, n. 2, p. 97-104, 2011.

LUPI, O.; LAMY, F.; SEMENOVITCH, I. **Infecção por Herpesvírus**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MCPHERSON, M. J.; MØLLER, S. G. **PCR**. 2. Cornwall: Taylor & Francis Group, 2006. 292 p.

MICROMEDEX<sup>®</sup> 2.0. **Truven Health Analytics Inc**. 2014. Disponível em: <http://www.micromedexsolutions.com/micromedex2/librarian/>

MIES, S. et al. Transplantes hepáticos. **Einstein**, p. 13-20, 2005.

MOFENSON, L. M. et al. **Guidelines for the Prevention and Treatment of Opportunistic Infections Among HIV-Exposed and HIV-Infected Children**: 166 p. 2009.

MOHAN, H. **Textbook of Pathology**. 6. New Delhi: JAYPEE, 2010.

MOLTON, J.; SPELMAN, D. Central nervous system infections in intensive care patients. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine** v. 13, n. 4, 2012.

MONTEFUSCO-PEREIRA, C. V. et al. Antioxidant, anti-inflammatory, and hypoglycemic effects of the leaf extract from *Passiflora nitida* Kunth. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 170, n. 6, p. 1367-78, 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NALI, L. H. et al. High prevalence of the simultaneous excretion of polyomaviruses JC and BK in the urine of HIV-infected patients without neurological symptoms in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, n. 4, p. 201-5, 2012.

NEYTS, J.; DE CLERCQ, E. Hydroxyurea potentiates the antiherpesvirus activities of purine and pyrimidine nucleoside and nucleoside phosphonate analogs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 12, p. 2885-92, 1999.

NICOLL, M. P.; PROENCA, J. T.; EFSTATHIOU, S. The molecular basis of herpes simplex virus latency. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 3, p. 684-705, 2012.

NOBELPRIZE. **The Nobel Prize in Chemistry 2008**. 2014. Disponível em: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2008/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/)

NOGARA, M. A. S. et al. Avaliação dos transplantes hepáticos no estado de Santa Catarina no período de agosto de 2002 a janeiro de 2008. **Jornal Brasileiro de Transplantes**, v. 12, n. 3, p. 1166, 2009.

OLDSTONE, M. B. A. **Viruses, plagues & history**. New York: Oxford University Press, 2010.

## Referências 166

OVERTON, W. R. Fluorochromes. In: WULFF, S (Ed.). **Flow Cytometry Educational Guide**. 2. Califórnia: Dako; 2006. p. 17 – 22.

PATEL, R. et al. European guideline for the management of genital herpes, 2010. **International Journal of STD AIDS**, v. 22, n. 1, p. 1-10, 2011.

PEREIRA, J. M. A. **Manual: Virologia Prática** 3.Lisboa: Faculdade de Farmácia, 2008.

PHO, M. T.; ASHOK, A.; ATWOOD, W. J. JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. **Journal of Virology**, v. 74, n. 5, p. 2288-92, 2000.

PIRES, E. P. et al. Prevalence of infection by JC and BK polyomaviruses in kidney transplant recipients and patients with chronic renal disease. **Transplant Infectious Disease**, v. 13, n. 6, p. 633-7, 2011.

POLLARA, C. P. et al. Quantitative viral load measurement for BKV infection in renal transplant recipients as a predictive tool for BKVAN. **New Microbiologica**, v. 34, n. 2, p. 165-71, 2011.

PURSLEY, S. W. Data Analysis. In: WULFF, S (Ed.). **Flow Cytometry Educational Guide**. 2. Califórnia: Dako; 2006. p. 33 – 39.

RANG, H. P. et al. **Rang & Dale Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RIZZA, V. et al. A rare case of herpes simplex type 1 bronchopneumonia associated with cardiomegaly in renal transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 43, n. 4, p. 1210-2, 2011.

ROIZMAN, B.; KNIPE, D. M.; WHITLEY, R. J. Herpes Simplex Viruses. In: KNIPE, D. M. e HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. 5. United States: Lippincott Williams & Wilkins, v.1, 2007. cap 67, p. 2502 – 2601.

ROIZMAN, B.; WHITLEY, R. J. An inquiry into the molecular basis of HSV latency and reactivation. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, p. 355-74, 2013.

ROTHBERG, M. B.; HAESSLER, S. D.; BROWN, R. B. Complications of viral influenza. **The American Journal of Medicine**, v. 121, n. 4, p. 258-64, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. New York: CSHL Press, 2001.

SANTOS, N. S. D. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à Virologia Humana 2**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SAVI, L. A. et al. Evaluation of anti-herpetic and antioxidant activities, and cytotoxic and genotoxic effects of synthetic alkyl-esters of gallic acid. **Arzneimittel-Forschung**, v. 55, n. 1, p. 66-75, 2005.

SCHENBORN, E.; GROSKREUTZ, D. Reporter gene vectors and assays. **Molecular Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 29-44, 1999.

SELIN, L. K. et al. Memory of mice and men: CD8<sup>+</sup> T-cell cross-reactivity and heterologous immunity. **Immunology Reviews**, v. 211, p. 164-81, 2006.

SELLARES, J. et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. **American Journal of Transplantation**, v. 12, n. 2, p. 388-99, 2012.

SERGERIE, Y.; BOIVIN, G. Hydroxyurea enhances the activity of acyclovir and cidofovir against herpes simplex virus type 1 resistant strains harboring mutations in the thymidine kinase and/or the DNA polymerase genes. **Antiviral Research**, v. 77, n. 1, p. 77-80, 2008.

SEVILLA, J. et al. Fatal hepatic failure secondary to acute herpes simplex virus infection. **Journal of Pediatric Hematology/ Oncology**, v. 26, n. 10, p. 686-8, 2004.

## Referências 168

SHARPE, J. Flow Cytometry Instrumentation. In: WULFF, S (Ed.). **Flow Cytometry Educational Guide**. 2. Califórnia: Dako; 2006. p. 9 – 16.

SHAPIRO, H. M. **Practical Flow Cytometry**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2003.

SILVA, I. T. D. **Triagem anti-herpética de alguns táxons da biodiversidade brasileira: Fracionamento biomonitorado de *Cecropia glaziovii* Sneth., Urticaceae (embaúba)**. 2009. 133 Dissertação (Mestre). Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SINGH, A. et al. The laboratory diagnosis of herpes simplex virus infections. **Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 92-8, 2005.

SLINGERLAND, M. et al. Cardiac glycosides in cancer therapy: from preclinical investigations towards clinical trials. **Investigational New Drugs**, v. 31, n. 4, p. 1087-94, 2013.

STELLRECHT, K. A. et al. Comparison of three real-time PCR for the quantification of polyomavirus BK. **Journal of Clinical Virology**, v. 56, n. 4, p. 354-9, 2013.

STORCH, G. A. Diagnostic Virology. In: KNIPE, D. M. e HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**: Lippincott Williams & Wilkins, v.1, 2007. cap. 17, p.2950.

STRASFELD, L.; CHOU, S. Antiviral drug resistance: mechanisms and clinical implications. **Infectious Disease Clinics North America**, v. 24, n. 3, p. 809-33, 2010.

TAL-SINGER, R. et al. The transcriptional activation domain of VP16 is required for efficient infection and establishment of latency by HSV-1 in the murine peripheral and central nervous systems. **Virology**, v. 259, n. 1, p. 20-33, 1999.

TAN, C. S.; KORALNIK, I. J. Progressive multifocal leukoencephalopathy and other disorders caused by JC virus: clinical features and pathogenesis. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 4, p. 425-37, 2010.

THEOPHILUS, B. D. M. Principles and Medical Applications of the Polymerase Chain Reaction. In: WALKER, J. M. e RAPLEY, R. (Ed.). **Molecular Biomethods Handbook**. 2: Humana Press, 2008. cap. 3, p.1124.

THURMAN, R. H. et al. Fulminant herpes simplex virus hepatic failure in pregnancy requiring liver transplantation. **Australian and New Zealand Journal Obstetrics and Gynaecology**, v. 50, n. 5, p. 492-4, 2010.

TOBE, R. et al. High error rates in selenocysteine insertion in mammalian cells treated with the antibiotic doxycycline, chloramphenicol, or geneticin. **The Journal Biological Chemistry**, v. 288, n. 21, p. 14709-15, 2013.

TONG, C. Y. et al. Monitoring the progress of BK virus associated nephropathy in renal transplant recipients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 19, n. 10, p. 2598-605, 2004.

TSIEN, R. Y. The green fluorescent protein. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, p. 509-44, 1998.

TYAGI, S. et al. E2F activation of S phase promoters via association with HCF-1 and the MLL family of histone H3K4 methyltransferases. **Molecular Cell**, v. 27, n. 1, p. 107-19, 2007.

JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV / AIDS - UNAIDS. **2013 Global Fact Sheet**: 3 p. 2012.

VATS, A.; RANDHAWA, P. S.; SHAPIRO, R. Diagnosis and treatment of BK virus-associated transplant nephropathy. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 577, p. 213-27, 2006.

## Referências 170

VIGIL, K. J.; CHEMALY, R. F. Valacyclovir: approved and off-label uses for the treatment of herpes virus infections in immunocompetent and immunocompromised adults. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 11, n. 11, p. 1901-13, 2010.

WANG, Y. C. et al. A cell line that secretes inducibly a reporter protein for monitoring herpes simplex virus infection and drug susceptibility. **Journal of Medical Virology**, v. 68, n. 4, p. 599-605, 2002.

WATCHARANANAN, S. P. et al. Cytomegalovirus, adenovirus, and polyomavirus co-infection among pediatric recipients of allogeneic stem cell transplantation: characteristics and outcome. **Pediatric Transplantation**, v. 14, n. 5, p. 675-81, 2010.

WHITLEY, R. J.; KIMBERLIN, D. W.; ROIZMAN, B. Herpes simplex viruses. **Clinical Infectious Disease**, v. 26, n. 3, p. 541-53; quiz 554-5, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. United States 2013.

WILLIAMS, E. J. et al. Viral infections: contributions to late fetal death, stillbirth, and infant death. **Journal of Pediatrics**, v. 163, n. 2, p. 424-8, Aug 2013.

WILLIAMS, J. W. et al. Leflunomide for polyomavirus type BK nephropathy. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 11, p. 1157-8, 2005.

WILSON, A. C.; MOHR, I. A cultured affair: HSV latency and reactivation in neurons. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 12, p. 604-11, 2012.

WU, M. et al. Herpesvirus-associated central nervous system diseases after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77805, 2013.

WYMER, J. P. et al. Identification of immediate-early-type cis-response elements in the promoter for the ribonucleotide reductase large subunit from herpes simplex virus type 2. **Journal of Virology**, v. 63, n. 6, p. 2773-84, 1989.

WYSOCKA, J.; HERR, W. The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 6, p. 294-304, 2003.

YAMAGUCHI, A. et al. Herpes simplex virus pneumonia following mitral valve replacement. **General Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 58, n. 11, p. 580-3, 2010.

YUDIN, M. H.; KAUL, R. Progressive hypertrophic genital herpes in an HIV-infected woman despite immune recovery on antiretroviral therapy. **Infectious Diseases Obstetrics and Gynecology**, v. 2008, p. 592532, 2008.

ZANETTI, B. F.; GOMES, W. J.; HAN, S. W. Identification, selection, and enrichment of cardiomyocyte precursors. **Biomed Research International**, v. 2013, p. 1-9, 2013.