



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

**PESQUISA DE POLIMORFISMOS NO
GENE U_L23 DO HERPES SIMPLEX
VÍRUS DO TIPO 2 EM AMOSTRAS DE
ÚLCERAS GENITAIS**

Tatiana Amaral Pires de Almeida

Manaus
2010



PESQUISA DE POLIMORFISMOS NO GENE U_L23 DO HERPES SIMPLEX VÍRUS DO TIPO 2 EM AMOSTRAS DE ÚLCERAS GENITAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, na área de concentração “Promoção da Saúde na Amazônia” e na linha de pesquisa “Diagnóstico Epidemiológico, Clínico e/ou Laboratorial”.

Orientador: **Profº. Felipe Gomes Naveca, Dr.**
Co-orientadora: **Profª Maria das Graças Souza Cunha, Drª**

Manaus
2010

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Almeida, Tatiana Amaral Pires de

A447p Pesquisa de polimorfismos no gene U_L23 do herpes simplex vírus do tipo 2 em amostras de úlceras genitais / Tatiana Amaral Pires de Almeida. - Manaus: UFAM, 2010.
140 f.: il. color; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde, área de concentração em Promoção da Saúde na Amazônia) — Universidade Federal do Amazonas, 2010.

Orientador: Prof.^o Dr. Felipe Gomes Naveca

Co-orientador: Prof.^o Dr.^a Maria das Graças Souza Cunha

1. Herpes simples 2. Herpesvirus humano 2 3. Polimorfismo genético 4. Aciclovir I. Naveca, Felipe Gomes (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 616.98(043.3)

TATIANA AMARAL PIRES DE ALMEIDA

**PESQUISA DE POLIMORFISMOS NO GENE U_L23 DO
HERPES SIMPLEX VÍRUS DO TIPO 2 EM AMOSTRAS DE
ÚLCERAS GENITAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, na área de concentração “Promoção da Saúde na Amazônia” e na linha de pesquisa “Diagnóstico Epidemiológico, Clínico e/ou Laboratorial”.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Felipe Gomes Naveca (Presidente)
Instituto Leônidas e Maria Deane (FIOCRUZ-AM)/ Universidade Federal do Amazonas
(UFAM)

Prof^a. Dr^a. Tatiana Nayara Libório dos Santos (Membro Interno)
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Prof^a. Dr^a. Paloma Helena Fernandes Shimabukuro (Membro Externo)
Instituto Leônidas e Maria Deane (FIOCRUZ-AM)

Dedicatória

À minha filha

Mariana Pires Herculano, luz da minha vida, minha razão e emoção

Aos meus pais

Teresa Cristina e **José Vallim**, minhas fortalezas e grandes exemplos, pelo amor incondicional e compreensão

Aos meus irmãos

José Alexandre e **Bruno**, meus amigos e companheiros

Aos meus tios

Benê e **Edu**, pela força

Aos meus avós

Maria Luísa e **Izidoro Zambaldi** e **Benedito** (*in memoriam*) e **Maria Theodora** (*in memoriam*), pelo grande amor e apoio

Aos meus grandes amigos

Danielle, **Carolina**, **Márcio**, **José Rogério** e **Priscila** pelo carinho, amizade e compreensão

Ao Doutor **Felipe Gomes Naveca** pela amizade, estímulo e brilhante orientação

À **Prof^a Dr^a. Júlia Salem**, **Prof^a Mestre Elisa Freire**

Meneghini e **Prof^a Dr^a. Maria Rosa Lozano Borrás** pelo apoio, incentivo, exemplo e carinho.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela certeza de sua presença ao longo desta caminhada.

A **minha família**, pela tolerância frente às mudanças que esta experiência gerou no percorrer destes anos.

Ao Dr. **Felipe Gomes Naveca**, por ter-me aceito como orientada desde a pós-graduação *Lato Sensu*, e ao longo deste tempo, espero ter merecido sua confiança. Agradeço pela atenção e paciência ensinando-me a dar grandes passos no caminho científico, incentivando e estimulando essa paixão.

À **Fundação “Alfredo da Matta” (FUAM)**, na pessoa da Diretora Presidente **Dra. Adele Schwartz Benzaken** pelo apoio total, recursos humanos/equipe científica e laboratorial, instalações, insumos, e disponibilização do laboratório de biologia molecular, todos imprescindíveis na realização deste trabalho.

Ao **Instituto de Pesquisa Leônidas e Maria Deane – Fundação Oswaldo Cruz - AM**, na pessoa do Diretor **Dr. Roberto Sena Rocha** pelo apoio científico e disponibilização dos laboratórios, materiais, insumos e equipamentos imprescindíveis na realização deste trabalho.

À **Fundação de Medicina Tropical do Estado do Amazonas (FMTAM)**, em nome de **Dra. Regina Maria Pinto de Figueiredo, Márcia da Costa Castilho** e da **Dra. Cíntia Mara Costa Oliveira**, pela participação em minha banca de qualificação, defesa e parceria no conhecimento.

À **Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Amazonas (FHMOAM)**, em nome de **Cristina Motta Ferreira, Dra. Adriana Malheiro** e **Tatiane Amábile** pela parceria com insumos e conhecimento científico.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas (FAPEAM)** pelo apoio financeiro referente à bolsa POSGRAD.

À **Dra. Tatiana Libório**, pela dedicação e apoio frente à Coordenação do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas e pelo aceite e participação em minha banca de defesa do Mestrado.

À Profa **Dra. Aya Sadahiro**, pelos ensinamentos desde os primeiros períodos da minha graduação, pelo apoio e incentivo desde então e, o mais importante, por ser um exemplo de “ser humano” e “Mestre”.

A todo o **peçoal do Laboratório de Biologia Molecular da Fundação “Alfredo da Matta”**, pela paciência, aceitação, apoio e amizade.

Ao **Pessoal do Laboratório Multidisciplinar da equipe de Biodiversidade do Instituto de**

Pesquisa Leônidas e Maria Deane – Fundação Oswaldo Cruz (CpLMD), em especial à Dra. Paloma Fernandes, Túllio Romão e “Leka” pelo apoio e disponibilidade nas atividades moleculares.

Ao pessoal do Laboratório de Genética de Microrganismos “João Lúcio de Azevedo”, Departamento de Genética, da Escola de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ-Universidade de São Paulo - USP, **Dr. Fernando Andreote, Armando Dias, Francisco Andreote e Danice Luvizzoto** pela colaboração, apoio e orientação em técnicas moleculares.

A todo o **Corpo Docente** do Mestrado em Ciências da Saúde pelo esforço e seriedade no oferecimento das disciplinas.

Aos meus **colegas de Mestrado**, especialmente **Víctor Souza, Fernanda Borowsky**, pelo acompanhamento e estímulo para não desistir dos meus objetivos.

Aos colegas de laboratório e paixão pelo meio científico **Thiago, Maressa, Elaine, Matilde, Dra. Lúcia, Isabella, Neide, Nyanne, George, Maísa**, pela paciência, apoio, conselhos e estímulo.

Às amigas e colegas de profissão **Elaine Veras e Matilde Contreras** pela amizade, incentivo e por terem feito parte da realização do “Projeto SUG”.

Aos funcionários da **Fundação “Alfredo da Matta” (FUAM) e Instituto de Pesquisa Leônidas e Maria Deane – Fundação Oswaldo Cruz-AM**, em especial à **Dra. Adele Benzaken, André Leturiondo, Daniel Dutra, Megumi Sadahiro, Dona Carmélia, Val, Júnior, William, Jairo Rodrigues, Paulinho (FUAM); Dr. Roberto Rocha, Dr. Sérgio Luz, Dr. Felipe Naveca, Dra Paloma Fernandes, Giovana Martins, Michele Jesus, Marizete Duarte, Natanael, Dona Juraci de Souza (ILMD)** pela ajuda valiosa e contribuição para o desenvolvimento do meu projeto.

Aos **meus pais, Teresa e José** e à **Dona Graça**, avós da minha filhota, pelo amor, carinho e auxílio cuidado, em muitos momentos da Mariana, durante a realização deste projeto.

Aos meus amigos **Danielle Vieira Hitotuzi, Carolina da Costa Marinho, Márcio Santos, José Rogério Mendes Júnior, Priscila Drumond, Moema Monteiro, Karina Vieiralves**, amigos nas baixas e nas altas, sempre perto, muito obrigada, vocês estarão sempre em meu coração.

E a todos aqueles que mais próximos ou mais distantes contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Muito Obrigada a todos vocês!

*"Todo jardim começa com um sonho de amor.
Antes que qualquer árvore seja plantada ou
qualquer lago seja construído, é preciso que as
árvores e os lagos tenham nascido da alma.
Quem não tem jardins por dentro, não planta
jardins por fora e nem passeia por eles..."*

Rubem Alves

RESUMO

O Herpes Simplex Virus do tipo 2 (HSV-2) é um agente ubíquo, incurável, que estabelece latência em células nervosas sendo responsável pela maioria dos casos de herpes genital. O U_L23 é um gene polimórfico que codifica a timidinaquinase viral (TK) do Herpesvírus. A TK possui seis regiões conservadas, incluindo dois sítios ativos; esta enzima desempenha um papel importante no metabolismo do aciclovir (ACV). Consequentemente, algumas mutações no gene U_L23 estão relacionadas a fenótipos de resistência ao ACV. Nesta dissertação, analisamos 67 amostras coletadas entre Abril de 2008 e Setembro de 2009 na clínica de DST/IST da Fundação “Alfredo da Matta”, em Manaus, Amazonas, Brasil, obtidas de pacientes com úlceras genitais por HSV-2. Com o objetivo de se caracterizar polimorfismos, todos os espécimes foram processados para extração total de ácido nucleico e submetidos à amplificação da CDS do gene U_L23 pela técnica de PCR, seguida de sequenciamento nucleotídico automatizado utilizando-se terminadores dideoxi. As análises de sequências mostraram que 45 delas foram 100% similares à cepa-referência “HG52”. As 22 sequências restantes (32,8%) mostraram pelo menos uma substituição de nucleotídeo; nenhuma inserção ou deleção foi encontrada. Substituições de aminoácidos foram detectadas em 19 dessas 22 sequências. A mutação Gly39Glu foi a mais frequente (16/19), seguida pela Asn78Asp (5/19); Gly39Glu e Asn78Asp foram encontradas simultaneamente em quatro amostras. Sequências deduzidas de aminoácidos foram alinhadas com 66 sequências Africanas e Americanas disponíveis no GenBank. Um total de 23 sítios variáveis foram identificados e, mais uma vez, a mutação Gly39Glu foi a mais frequente (74/133). Substituições previamente associadas à resistência ao ACV não foram detectadas, entretanto, a Gly39Glu foi recentemente descrita como uma provável mutação de resistência. Outras quatro mutações observadas, His4Tyr, Met70Arg, Asn245Ser e Ala366Val, foram descritas pela primeira vez por este trabalho. Nos modelos teóricos da estrutura da TK, construídos para sete amostras, foi possível visualizar que as substituições de aminoácidos estavam situadas longe dos sítios ativos/conservados desta enzima, com exceção da mutação Arg338Gln que apresentou maior proximidade com o sítio de ligação de ATP. Não foram detectadas mutações sugestivas de resistência ao ACV. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo de polimorfismos do gene U_L23 do HSV-2 em amostras brasileiras, um campo considerado prioridade pelo Programa de HIV/IST da OMS.

Palavras chave: HSV-2, U_L23 , TK, Polimorfismos, Aciclovir, Resistência.

ABSTRACT

The Herpes Simplex Virus type 2 (HSV-2) is a widespread, incurable agent that establishes latency in nervous cells and is responsible for the majority of genital herpes cases. The U_L23 is a polymorphic gene, which encodes the viral thymidine kinase (TK) of the Herpes virus. TK has six conserved regions, including two active sites, which plays an important role in acyclovir (ACV) metabolism. Therefore, some mutations in U_L23 are implicated with ACV resistance phenotype. In this work, we analyzed 67 samples collected between April 2008 and September 2009 at the STI/STD clinic of “Alfredo da Matta” Foundation, in Manaus, Amazonas, Brazil obtained from HSV-2 genital ulcer patients. In order to characterize polymorphisms, all specimens were processed for total nucleic acid isolation, submitted to PCR amplification targeting the complete ORF of U_L23 gene followed by automated nucleotide sequencing with dideoxy chain terminators. Sequences analysis shown that 45 sequences were 100% similar to the reference strain “HG52”. The remaining 22 sequences (32.8%) showed at least one nucleotide substitution; none insertions or deletions were found. Amino acids substitutions were detected in 19 out of 22. The mutation Gly39Glu was the most frequently detected (16/19), followed by Asn78Asp (5/19); Gly39Glu and Asn78Asp were simultaneously found in four samples. Deduced amino acids sequences were aligned with 66 available on GenBank from African and American continents. A total of 23 variable sites were identified and, once more, Gly39Glu mutation was the most frequent found (74/133). Substitutions previously associated with ACV resistance were not detected, however, Gly39Glu was recently described as a probable resistant mutation. Another four mutations observed: His4Tyr, Met70Arg, Asn245Ser and Ala366Val had not been previously described. The theoretical models of TK’s structure built for seven samples showed that amino acids substitutions were found away from the conserved and/or catalytic sites of TK, with the exception of Arg338Gln which was nearly from ATP-binding site. Mutations associated with ACV resistance were not detected. However one of the mutations found, Gly39Glu, was previously associated with this resistance phenotype. Another four mutations found in his work: His4Tyr, Met70Arg, Asn245Ser and Ala366Val had not been previously described elsewhere. To our knowledge, this is the first study on U_L23 polymorphisms on Brazilian HSV-2 samples, a research field considered as a priority by WHO HIV/STI program.

Keywords: HSV-2, U_L23, TK, Polymorphisms, Acyclovir, Resistance

JUSTIFICATIVA

Os Herpes simplex vírus dos tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) são causadores de herpes genital, entretanto o HSV-2 é responsável pela maioria dos casos dessa doença. Essa virose possui total importância em Saúde Pública principalmente por suas manifestações clínicas variarem entre leves, moderadas e severas, incluindo complicações neonatais e congênitas. Além disso, é causada por um agente incurável que pode facilitar a transmissão e a replicação do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Uma grande parcela dos indivíduos infectados são assintomáticos e/ou possuem sintomas não específicos, o que justifica a facilidade de dispersão do HSV-2 na população. A Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou um documento em 2001, durante um *workshop* em Londres, alertando sobre a problemática em relação ao HSV-2, destacando prioridades nas pesquisas (relação HSV-2 *versus* HIV, proporção de HSV-2/HSV-1, pesquisa de resistência ao tratamento farmacológico etc.) e programas relacionados ao controle potencial da infecção por esse agente. A infecção pelo HSV-2 é bastante comum tanto em países industrializados como nos em desenvolvimento, mas sua carga global nunca foi sistematicamente determinada. Estudos de prevalência mostraram taxas variando entre 18% em mulheres e 13% em homens na Europa Ocidental e taxas de 70% entre mulheres e 55% entre os homens na África Subsaariana. Nos Estados Unidos da América (EUA), estima-se que cerca de 50 milhões de indivíduos possuem herpes genital e 500.000 novos casos sintomáticos ocorrem a cada ano. No Brasil, existe uma visível carência de estudos sobre os herpes simplex vírus e herpes genital. Um estudo de soroprevalência realizado em mulheres em idade sexualmente ativa de São Paulo, entre 1990 e 1991, estimou uma taxa de 42%. Em Campinas, outro estudo realizado entre 1993 e 1997 encontrou taxas de soroprevalência de até 64% na população. Entre doadores de sangue brasileiros a taxa foi de 29%. A Fundação Alfredo da Matta, centro de referência em venereologia no Estado do Amazonas, atendeu em 2009, 564 casos de Síndrome de Úlceras Genitais e 343 casos foram diagnosticados como herpes genital pela abordagem sindrômica. Dados de um *screening* molecular realizado nesta mesma Fundação mostram uma prevalência de 55,60% de HSV-2 em pacientes com úlcera genital. Todos estes dados epidemiológicos somados a tantos outros reafirmam uma alta prevalência de HSV-2 em população que não é considerada de risco, tanto na África quanto em outros países em desenvolvimento. Segundo a OMS, enquanto a proporção de cancro mole e sífilis vêm diminuindo, a de úlceras herpéticas aumentou consideravelmente nas pessoas soropositivas e nas soronegativas para HIV. Isto pode ser resultado de acentuada falha no que concerne ao tratamento quando baseado no diagnóstico sindrômico das úlceras genitais, o que acaba gerando outra preocupação que está relacionada à resistência dos Herpes Simplex Vírus (principalmente o HSV-2) aos antivirais. O tratamento de escolha para herpes genital é o aciclovir (ACV), um análogo do nucleosídeo guanosina que necessita ser fosforilado três vezes (pela enzima viral *timidinaquinase*, TK, pelas quinases celulares e pela DNA polimerase viral) para que este fármaco possa ser ativo contra a infecção pelos HSV. Se houver uma perda na atividade da TK ou uma alteração de sua especificidade ao seu substrato ou, ainda, uma alteração na atividade da DNA polimerase viral, fármacos como o ACV acabam não sendo fosforilados, não exercendo sua função. Sabe-se que determinadas mutações nos genes da TK (U_L23) e da DNA polimerase viral (U_L30) são responsáveis pela resistência dos HSV ao aciclovir. Além disso, mutações do gene U_L23 são mais frequentes (aproximadamente 95% dos casos) do que no U_L30. Apesar de a

TK não ser essencial para a replicação viral, estudos apontam que ela se faz necessária para que este consiga se reativar nos neurônios. Segundo alguns poucos estudos, a resistência em pacientes imunocompetentes é rara, chegando a 1% numa das populações pesquisadas na Europa. No Brasil, não existem dados publicados sobre resistência de HSV a este fármaco. Ressalta-se que o gene U_L23 tem uma característica interessante, é um gene bastante polimórfico, havendo, por conseguinte, a possibilidade de se determinar grupos baseados nessas variações polimórficas intratípicas. Os métodos usuais para a detecção do HSV incluem o isolamento do vírus em cultura de células, exame citológico, biópsia de tecido, imunoenaios, sendo que, o padrão-ouro é a cultura do vírus em células, seguida de confirmação por imunofluorescência. Tais técnicas possuem inúmeras limitações por serem bastante laboriosas e serem de baixa sensibilidade quando comparadas às técnicas moleculares. Diversos estudos apontam que a sensibilidade de detecção do HSV em cultura depende diretamente do estágio e da duração da lesão, além de haver a desvantagem quanto à demora na obtenção de resultados. A técnica molecular de amplificação de ácido nucleico, PCR (*polymerase chain reaction*), é bastante sensível na detecção de HSV comparada aos métodos de cultura de célula. A PCR associada a outras técnicas, como o sequenciamento nucleotídico, tem sido bastante utilizada para a discriminação e tipagem de microrganismos, detecção de mutações, filogenia etc. Nesse cenário nos propusemos nesse presente trabalho a caracterizar as sequências nucleotídicas e deduzida de aminoácidos de amostras de HSV-2 coletadas de pacientes com quadro de úlcera genital, de maneira a avaliar possíveis mutações relacionadas à resistência ao aciclovir, principal droga de escolha, bem como avaliar outros polimorfismos que possam atuar como marcadores genéticos para amostras de HSV-2 locais, permitindo futuros estudos de epidemiologia molecular e uma possível correlação aos dados clínicos dos pacientes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Representação esquemática da estrutura dos herpesvírus humanos.....	26
Figura 2	Microscopia eletrônica do vírion HSV-1.....	27
Figura 3	Representação esquemática do arranjo da sequência de DNA do HSV.....	31
Figura 4	Modelo de replicação do genoma do HSV-1, replicação teta (<i>theta replication</i>) e círculo rolante (<i>rolling circle</i>).....	40
Figura 5	Ilustração esquemática da replicação do HSV e liberação dos vírions no meio extracelular.....	41
Figura 6	Latência e reativação do HSV.....	44
Figura 7	Estrutura química e espacial de uma molécula de ACV.....	48
Figura 8	Analogia entre uma molécula do nucleosídeo guanosina e uma molécula de ACV.....	49
Figura 9	Estrutura química de uma molécula de Valaciclovir (pró-droga do ACV).....	49
Figura 10	Estruturas químicas da molécula de Penciclovir e sua pró-droga Fanciclovir.....	50
Figura 11	Cristalografia por raio-X da proteína TK do HSV-1 (cepa “17”-NCBI/ <i>Reference Sequence</i> : NP_044624), resolução 1,9Å, homodímero.....	51
Figura 12	Contexto do gene U _L 23 no genoma do HSV-2 (cepa “HG52”, NCBI <i>Reference Sequence</i> : NC_001798, <i>Gene Id</i> 1487307).....	51
Figura 13	Regiões <i>ATP-binding site</i> (região de ligação de ATP) e <i>nucleoside-binding site</i> (região de ligação de nucleosídeo) na proteína TK do HSV-1 (cepa “17”-NCBI/ <i>Reference Sequence</i> : NP_044624), resolução 1,9Å, homodímero.....	52
Figura 14	Representação esquemática da sequência proteica da TK do HSV-2, com destaque para os sítios de ligação de ATP e nucleosídeo.....	53
Figura 15	Desenho esquemático do mecanismo de ação do ACV.....	54
Figura 16	Mecanismo de ação do ACV mostrando a estrutura química do fármaco e sua forma ativa agindo sobre a DNA polimerase viral.....	54
Figura 17	Etapas da extração por fenol:clorofórmio realizadas pelo “Projeto SUG”.....	64
Figura 18	Iniciadores (<i>primers</i>) utilizados na PCR <i>multiplex</i> do “Projeto SUG”.....	65

Figura 19	Mix de PCR <i>multiplex</i> para um volume final de 25µL (“Projeto SUG”).....	65
Figura 20	Programa da PCR <i>multiplex</i> no termociclador (“Projeto SUG”).....	66
Figura 21	Mix da digestão pela <i>HaeIII</i> , volume final de reação: 20µL (“Projeto SUG”).....	66
Figura 22	Programa da digestão pela <i>HaeIII</i> no termociclador (“Projeto SUG”)..	66
Figura 23	Fluxograma de procedimentos para estudo do gene U _L 23.....	67
Figura 24	Iniciadores desenhados para amplificação do gene U _L 23.....	68
Figura 25	Procedimento de purificação de banda de DNA pelo sistema <i>Wizard SV Gel and PCR Clean-up</i> (Promega Corporation), utilizado para purificação das bandas de DNA do <i>amplicon</i> de 1294pb originado da PCR para o gene U _L 23.....	74
Figura 26	Guia para análise quantitativa das bancas de DNA através do uso do Low DNA Mass Ladder (Invitrogen – <i>Life Technologies</i> TM).....	75
Figura 27	Faixas ideais de quantidade de DNA purificado para reação de seqüenciamento pelo <i>BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit</i> (Applied Biosystems TM by <i>Life Technologies</i> TM).....	76
Figura 28	Procedimento de precipitação/purificação por Etanol/E.D.T.A./Acetato de sódio, após reação de seqüenciamento.....	78
Figura 29	Banda de 1294pb (setas vermelhas) correspondente à amplificação do gene U _L 23 do HSV-2, utilizando-se os iniciadores senso e antissenso TKS e TKAS.....	83
Figura 30	Representação esquemática das nove substituições de aminoácidos detectadas pelo estudo de 67 amostras submetidas ao seqüenciamento nucleotídico para a região codificante (CDS) do gene U _L 23 do HSV-2, frente aos sítios conservados e não conservados da TK.....	90
Figura 31	Avaliação do modelo teórico para TK da cepa-padrão “HG52”, construído através de modelação por homologia.....	94
Figura 32	Estruturas teóricas para proteína TK das amostras Br060AM, Br065AM, Br080AM, Br112AM, Br218AM e Br262AM, construídas através de modelagem por homologia.....	95

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Glicoproteínas de envelope do HSV.....	29
Quadro 2	Tamanho e composição de bases dos genomas do HSV-1 e HSV-2.....	31
Quadro 3	Regiões do genoma do HSV-2 utilizadas no estudo realizado por Martin; Koelle et al. (2006).....	36
Quadro 4	Posição das regiões conservadas, ligação de ATP e de nucleosídeo na sequência de TK (HSV-1/2).....	52
Quadro 5	Compilação de mutações de substituição descritas para o gene da TK (U _L 23) do HSV-2 associadas à resistência ao ACV.....	56
Quadro 6	Compilação de mutações de deleção ou inserção descritas para o gene da TK (U _L 23) do HSV-2 associadas à resistência ao ACV.....	57
Quadro 7	Compilação de mutações de polimorfismo não-associadas à resistência ao ACV, descritas para o gene da TK (U _L 23) do HSV-2.....	58
Quadro 8	Sequência dos iniciadores senso e antissenso para amplificação do gene U _L 23 do HSV-2 com destaque ao tamanho do <i>amplicon</i>	68
Quadro 9	Concentrações finais dos reagentes no mix de PCR para amplificação da CDS do gene U _L 23.....	69
Quadro 10	Concentrações finais de Cloreto de Magnésio (MgCl ₂) testadas na padronização da PCR para amplificação da CDS do gene U _L 23.....	70
Quadro 11	Volume de reagentes e suas concentrações iniciais para PCR do gene U _L 23 do HSV-2.....	71
Quadro 12	Programa para amplificação da CDS do gene UL23 do HSV-2.....	71
Quadro 13	Volume de reagentes e suas concentrações iniciais para reação de sequenciamento, utilizando-se o <i>BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit</i> (Applied Biosystems - <i>Life Technologies</i>) para amostras com quantidade aproximada de 20ng de DNA purificado.....	76
Quadro 14	Volume de reagentes e suas concentrações iniciais para reação de sequenciamento utilizando-se o <i>BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit</i> (Applied Biosystems - <i>Life Technologies</i>) para amostras com quantidade aproximada de 10ng de DNA purificado.....	76
Quadro 15	Programa de reação de sequenciamento para DNA fita dupla.....	77
Quadro 16	Concentrações e pH dos reagentes preparados e utilizados na precipitação após reação de sequenciamento.....	78

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1	Amostras e suas diferenças nas sequências nucleotídica, nos códons correspondentes e na sequência deduzida de aminoácidos em relação à cepa-padrão do HSV-2 “HG52”.....	85
Tabela 2	Mutações de substituição encontradas em 22 sequências nucleotídicas do gene U _L 23 (proteína TK) do HSV-2 em DNA extraído de amostras de úlceras genitais, quando comparadas à sequência nucleotídica do mesmo gene na cepa-padrão “HG52”.....	87
Tabela 3	Mutações e consequentes mudanças no caráter físico-químico dos aminoácidos comparando-se às sequências deduzidas de TK das amostras com a da cepa-padrão “HG52” (NCBI <i>Reference Sequence</i> : NC_001798).....	88
Gráfico 1	Hidrofobicidade da sequência deduzida da TK de oito amostras em comparação com a sequência deduzida da cepa-padrão de HSV-2 “HG52”.....	89
Tabela 4	Substituições de aminoácidos em algumas sequências deduzidas da TK do HSV-2 detectadas por este estudo e ainda não descritas na literatura...	91
Tabela 5	Frequência de amostras que foram submetidas ao sequenciamento nucleotídico do gene U _L 23, cuja sequência deduzida de TK é diferente da cepa-padrão “HG52” – Grupo I.....	97
Tabela 6	Relação entre as variáveis sexo e idade e grupos I e II.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	Adenina
a.a.	Aminoácido
Ac	Anticorpo
a.C.	Antes de Cristo
ACV	Aciclovir
AM	Amazonas
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> (adenosina trifosfato)
α-TIF	<i>α-trans-inducing-factor</i>
Bp	<i>Base-pair</i> (=pb)
C	Citosina
°C	Graus Celsius
CD8⁺	Linfócito T citotóxico
CDS	<i>Coding sequence</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CMV	Citomegalovírus
CS	<i>Chondroitin sulphate</i>
DCR	Programa de Desenvolvimento Científico Regional
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA pol	DNA polimerase
dNTP	<i>Desoxirribonucleosídeos</i>
DS	<i>Dermatan sulphate</i>
dsDNA	<i>Double-strand DNA</i> (DNA fita dupla)
DP	Difosfato
DST	Doença Sexualmente Transmissível
E	Early gene (ou β gene)
EBV	Epstein-Barr vírus
E.D.T.A.	<i>Ethylenediamine tetracetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FAPEAM	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas
<i>f</i>	Frequência

FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUAM	Fundação de Dermatologia Tropical Alfredo da Matta
FCV	Famciclovir
G	Guanina
G	Gramas
G-HCl	Guanidine-HCl
GITC	<i>Guanidine isothiocyanate</i>
GMP	<i>Guanosine 5'-phosphate</i>
H₂O	Água
HCF	<i>Host cell factor</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HHV	<i>Human Herpes virus</i>
HMA	<i>Heteroduplex mobility assay</i>
HS	<i>Heparan Sulphate</i>
HSV	Herpes Simplex Vírus
HVEM	<i>Herpesvirus entry-mediator</i>
ICP	<i>Infected cell protein</i>
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
ID	<i>Identity</i>
IE	<i>Immediate early gene</i> (ou α gene)
IF	Imunofluorescência
IFN-γ	Interferon gama
IST	Infecção(ões) sexualmente transmissível(eis)
Kb	Quilobase
L	<i>Late gene</i> (ou γ gene)
LAT	<i>Latency-associated transcripts</i>
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
mg	Miligrama
Mg²⁺	Íon magnésio
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> , complexo principal de histocompatibilidade

mA	Miliampères
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
MP	Monofosfato
mRNA	RNA mensageiro
NA	Não-aplicável
NC	Não-conservadas
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ND-10	<i>Cellular nuclear domain 10</i>
ng	Nanograma
Nm	Nanômetro
nt	Nucleotídeo
OCT-1	<i>Transcription factor 1</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	<i>Open reading frame</i>
Ori	Origem de replicação
p	“p” valor
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PCV	Penciclovir
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RNA	Ácido ribonucleico
ssDNA	<i>Single strand DNA</i> (DNA de fita simples)
SUG	Síndrome de Úlceras Genitais
Θ	Teta
T	Timina
TAE	Tris-acetato-E.D.T.A.
TK	<i>Thymidine kinase</i> (timidinaquinase/timidinoquinase)
TP	Trifosfato
U	Unidade(s)
UG	Úlceras genitais

U_L	<i>Long unique sequence</i>
U_S	<i>Short unique sequence</i>
V	Volts
v.	Versão
VHS ou vhs	<i>Virion host shut-off protein</i>
VP	<i>Virion polypeptides</i>
VZV	Varicella-zoster
X g	aceleração da gravidade
%	Porcentagem
∞	Infinito

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1 A FAMÍLIA <i>Herpesviridae</i>	23
1.2 HERPES SIMPLEX VIRUS.....	25
1.2.1 Estrutura do vírion HSV.....	26
1.2.1.1 Proteínas do vírion.....	27
1.2.1.2 Cerne (Core).....	27
1.2.1.3 Tegumento.....	28
1.2.1.4 Capsídeo.....	28
1.2.1.5 Envelope.....	29
1.2.2 Genoma do HSV.....	29
1.2.2.1 Genes do HSV.....	32
1.2.2.2 Variações intertípicas e intratípicas.....	33
1.2.2.3 Filogenia e genótipos do HSV.....	34
1.2.3 Replicação do HSV.....	37
1.2.3.1 Entrada do vírus na célula.....	37
1.2.3.2 Replicação do DNA viral e expressão gênica.....	38
1.2.3.3 Aquisição do envelope viral e liberação dos vírions.....	40
1.2.4 Latência e reativação.....	42
1.3 HERPES GENITAL.....	44
1.4 ACICLOVIR E RESISTÊNCIA DOS HSV.....	48
1.4.1 Química do fármaco ACV.....	48
1.4.2 TK viral e mecanismo de ação do ACV.....	50
1.4.3 Mutações de resistência e polimorfismos.....	55
1.5 PESQUISA E DIAGNÓSTICO DO HSV.....	58
1.5.1 <i>Polymerase Chain Reaction</i> – PCR.....	59
1.5.2 Sequenciamento nucleotídico.....	60
2. OBJETIVOS.....	61
2.1 GERAL.....	61
2.2 ESPECÍFICOS.....	61
3. METODOLOGIA.....	62
3.1 MODELO DE ESTUDO.....	62
3.2 UNIDADES DE SAÚDE E PESQUISA PARTICIPANTES.....	62
3.3 PARTICIPANTES, AMOSTRAS E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	62
3.4 “PROJETO SUG”.....	63
3.5 FLUXOGRAMA DE PROCEDIMENTOS.....	66
3.6 DESENHO DOS INICIADORES PARA O GENE U _L 23 DO HSV-2.....	67
3.7 PADRONIZAÇÃO DA PCR PARA O GENE U _L 23 DO HSV-2.....	69
3.8 AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO GENE U _L 23.....	71
3.8.1 PCR para o gene U_L23.....	71
3.8.2 Purificação a partir de bandas de DNA.....	72
3.8.3 Reação de sequenciamento para o gene U_L23.....	75
3.8.4 Precipitação/purificação após reações de sequenciamento.....	77
3.8.5 Análise/interpretação das sequências e construção de estruturas teóricas da proteína TK.....	79

3.9 HISTÓRIA CLÍNICA E VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS E EPIDEMIOLÓGICAS.....	81
3.10 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	82
4. RESULTADOS.....	83
4.1 DESENHO DE INICIADORES E PADRONIZAÇÃO DA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE U _L 23.....	83
4.2 SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO DO GENE UL23 E DEDUÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE TK.....	84
4.2.1 PCR para amplificação do gene UL23.....	84
4.2.2 Sequenciamento nucleotídico do gene UL23, montagem e análise das sequências deduzidas de TK.....	84
4.2.3 Análise do caráter físico-químico das substituições de aminoácidos detectadas nas sequências deduzidas de TK.....	88
4.2.4 Análise e descrição dos polimorfismos detectados nas sequências deduzidas de TK frente aos dados previamente publicados em artigos.....	89
4.2.5 Análise das sequências deduzidas de TK frente às sequências disponíveis em bancos de dados públicos.....	91
4.2.6 Construção de estruturas teóricas da proteína TK através de modelagem por homologia.....	92
4.2.7 História clínica dos pacientes.....	97
5. DISCUSSÃO.....	99
6. CONCLUSÕES.....	111
BIBLIOGRAFIA.....	113
APÊNDICES.....	125
ANEXOS.....	133

1. INTRODUÇÃO

1.1 A FAMÍLIA *Herpesviridae*

A família *Herpesviridae*¹ possui mais de 200 espécies identificadas, sendo que oito destas são descritas como patógenos humanos (PELETT; ROIZMAN, 2007).

No final da década de 70, mesmo antes de se conhecer a sequência de aminoácidos virais, os membros da família *Herpesviridae* foram classificados em três subfamílias, baseando-se em suas propriedades biológicas: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae* (PELETT; ROIZMAN, 2007).

Com o advento das técnicas moleculares, descobriram-se inúmeras espécies desses agentes que foram agrupadas dentro dessas três subfamílias, confirmadas por análise filogenética molecular (NORBERG; BERGSTRÖM et al., 2004).

Os membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* foram assim classificados por possuírem as seguintes características biológicas: propagação rápida em cultura de células, ciclo replicativo curto e tendência a estabelecer infecção latente em neurônios/gânglios sensoriais (BROOKS; BUTEL et al., 2000; PELETT; ROIZMAN, 2007). É formada por quatro gêneros: *Simplexvirus*, *Varicellovirus*, *Mardivirus* e *Iltovirus*. (ICTV, 2009). Os dois primeiros têm os mamíferos como hospedeiros, os dois últimos contemplam vírus aviários.

¹ A família *Herpesviridae* é uma das três famílias classificadas dentro da ordem *Herpesvirales* (DAVISON; ERBELE et al., 2009; ICTV, 2009).

Os representantes da subfamília *Betaherpesvirinae* são vírus de propagação lenta em cultura de células, ciclo replicativo longo, fazendo com que as células infectadas tornem-se gigantes (citomegalia). Mantêm-se latentes nas glândulas secretórias, células linfocitárias, nos rins e em alguns outros tecidos. É formada por quatro gêneros: *Cytomegalovirus*, *Muromegalovirus*, *Roseolovirus* e *Proboscivirus* (MIRANDA, 2002).

Os vírus pertencentes à subfamília *Gammaherpesvirinae* infectam células linfoides, onde se tornam latentes; alguns podem causar infecções líticas em determinados tipos de células fibroblásticas e epitelióides, mas usualmente possuem tropismo pelos linfócitos T ou B. É composta por dois gêneros: *Lymphocryptovirus* e *Rhadinovirus*. Entretanto, conforme descrito por Pellett; Roizman (2007), o gênero *Rhadinovirus* foi expandido para abrigar dois novos gêneros, *Macavirus* e *Percavirus*.

De acordo com o *International Committee on Taxonomy of Viruses-ICTV*² (2009), as espécies de herpesvírus humanos pertencentes à subfamília *Alphaherpesvirinae* são os *Human herpesvirus* ou herpes simplex vírus 1 e 2 (HHV-1 e HHV-2), *Human herpesvirus 3* (HHV-3, Varicella-zoster virus ou VZV); na subfamília *Betaherpesvirinae*, encontram-se o *Human herpesvirus 5* (HHV-5, Cytomegalovirus ou CMV), *Human herpesvirus 6* (HHV-6) e *Human herpesvirus 7* (HHV-7); na subfamília *Gammaherpesvirinae*, estão o *Human herpesvirus 4* (HHV-4, Epstein-Barr virus ou EBV) e o *Human herpesvirus 8* (HHV-8, Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus) (ver Apêndice A).

² O ICTV (2009) reforça que a nomenclatura desses agentes consiste na designação dos herpesvírus por números arábicos seriais, acompanhados da família, subfamília ou ainda o gênero do hospedeiro do vírus (exemplos: *Human herpesvirus 7 Cercopithecine herpes virus 1*). E ainda orienta que o nome das espécies virais seja escrito em itálico, e a primeira letra da primeira palavra do nome é capitalizada (maiúscula).

1.2 HERPES SIMPLEX VIRUS

Os herpesvírus humanos 1 e 2 (*Human herpesvirus 1*, HHV-1 e *Human herpesvirus 2*, HHV-2) foram os primeiros herpesvírus a serem descobertos e são os agentes virais mais extensivamente estudados, com destaque ao HHV-1 (ROIZMAN; KNIPE et al., 2007). Servem como modelos em diversos estudos como, por exemplo, pesquisas relativas à terapia contra câncer, conexões sinápticas no sistema nervoso, regulação e terapia gênica, estrutura de membrana, translocação proteica etc (MIRANDA, 2002).

A nomenclatura vernacular de ambos, aprovada pelo ICTV, é Herpes simplex vírus 1 e 2 ou HSV-1 e HSV- 2 (MIRANDA, 2002; ROIZMAN; KNIPE et al., 2007; ICTV, 2009) e será adotada no decorrer desta dissertação.

Os HSV são agentes incuráveis, penetram no organismo através do contato direto com secreções ou mucosas, infectando células epiteliais via solução de continuidade, visto que não penetram em pele e mucosas íntegras. Causam diversas manifestações clínicas e persistem de forma latente no hospedeiro na raiz dos nervos sensoriais e gânglios dorsais (BROOKS; BUTEL et al., 2000; MIRANDA, 2002; BEAUMAN; MAJ, 2005; BRASIL, 2006; FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007).

A infecção causada por eles pode apresentar-se de forma assintomática ou com sinais que variam de pequenos a severos com alto potencial de complicação (retenção urinária, meningite, morbidade psicológica) (BROOKS; BUTEL et al., 2000; MIRANDA, 2002; WEISS, 2004; BEAUMAN; MAJ, 2005; BRASIL, 2006; FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007).

1.2.1 Estrutura do vírion HSV

Estudos de microscopia eletrônica mostraram que o vírion HSV é uma partícula esférica com diâmetro médio de 186 nm, podendo chegar a 225 nm quando se considera a presença das espículas no envelope viral (ROIZMAN; KNIPE et al., 2007).

O vírion é formado por quatro elementos: um cerne (core) contendo o ácido desoxirribonucleico (DNA) viral, um capsídeo icosaédrico circundando o cerne, uma camada denominada de tegumento envolvendo o capsídeo e um envelope lipídico detentor de espículas glicoproteicas em sua superfície, conforme ilustrado pelas Figuras 1 e 2 (BROOKS; BUTEL et al., 2000; MIRANDA, 2002; MCGEOCH; RIXON et al., 2006; PELLETT; ROIZMAN, 2007; MIRANDA-SAKSENA; BOADLE, 2009).

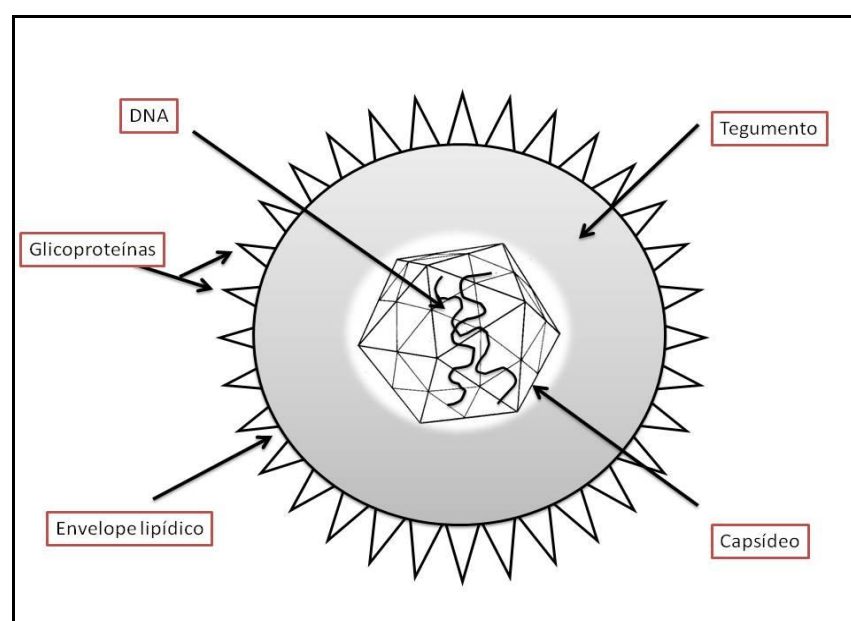


Figura 1 - Representação esquemática da estrutura dos herpesvírus humanos.
FONTE: Adaptado de CLEMENTS; BROWN, 1997.

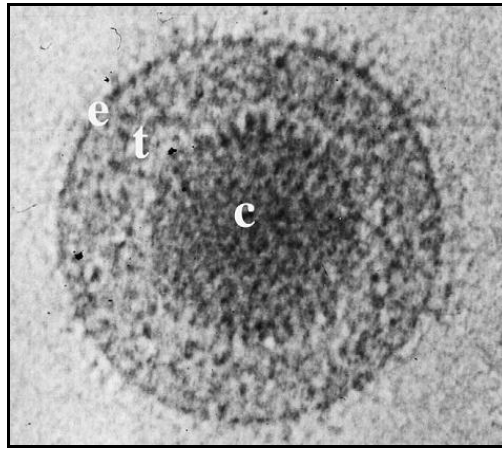


Figura 2 – Microscopia eletrônica do vírion HSV-1
 “c” – nucleocapsídeo icosaédrico; “t” – tegumento; “e” – envelope lipídico com as glicoproteínas de superfície.
 FONTE: Retirado de MCGEOCH; RIXON et al., 2006.

1.2.1.1 Proteínas do vírion

Todas as proteínas do vírion são produzidas após a infecção. Das mais de 30 proteínas conhecidas, 11 delas localizam-se na superfície viral e, por conseguinte, estão acessíveis aos anticorpos (ROIZMAN; KNIPE et al., 2007).

Essas proteínas virais são designadas como *virion polypeptides* (VP), ou proteínas estruturais. Mas, sua nomenclatura também pode ser baseada em uma numeração de acordo com sua apresentação em corrida de eletroforese em gel (exemplo, VP1/2), em fase de leitura aberta (*open reading frame – ORF*) que a codifica (exemplo, U_L8) ou, ainda, como *infected cell proteins* (exemplo, ICP5) (ROIZMAN; KNIPE et al., 2007).

1.2.1.2 Cerne (*Core*)

O cerne do HSV contém DNA fita dupla linear do vírus, enovelado na forma de toróide ou como um carretel (BROOKS; BUTEL et al., 2000; MIRANDA, 2002; BEAUMAN; MAJ, 2005; ROIZMAN; KNIPE et al., 2007).

Não possui proteínas com alta alcalinidade para que haja neutralização das cargas negativas do DNA viral. Entretanto, apresenta espermidina e espermina, duas poliaminas que neutralizam em torno de 40% dos fosfatos presentes na molécula de DNA (ROIZMAN; KNIPE et al., 2007).

1.2.1.3 Tegumento

Estrutura amorfa localizada entre o capsídeo e o envelope do vírus. É composta por cerca de 20 proteínas virais. Dentre estas, destacam-se três proteínas: a *virion transactivator protein* (VP16), também conhecida como *α -trans-inducing-factor* (α -TIF), codificada pela ORF U_L48; a *virion host shut-off* (VHS) *protein*, codificada pela ORF U_L41; e a VP1/2, codificada pela ORF U_L36 (MIRANDA, 2002).

1.2.1.4 Capsídeo

O capsídeo do HSV é composto por 162 capsômeros e possui forma icosaédrica. De acordo com Roizman; Knipe et al. (2007), o capsídeo tem uma camada mais externa, composta por quatro proteínas virais VP5, VP26, VP23 e VP19C, e uma intermediária; todas estão organizadas de uma maneira a formar um poro para passagem do DNA ao exterior do vírion (BROOKS; BUTEL et al., 2000; MIRANDA, 2002; BEAUMAN; MAJ, 2005; ROIZMAN; KNIPE et al., 2007).

1.2.1.5 Envelope

O HSV é um vírus envelopado. Este invólucro é bilaminar, formado por 12 glicoproteínas virais distintas, conforme apresentadas no Quadro 1. Além dessas proteínas, esses agentes patogênicos possuem outras proteínas que não são glicosiladas, conforme o descrito por Roizman; Knipe et al. (2007).

Comprovou-se a presença de lipídio devido à sensibilidade testada dos vírions de HSV aos detergentes e outros solventes lipídicos (GONÇALVES, 2000).

Glicoproteína (g)	Gene
gB ou VP7 e VP8.5	U _L 27
gC ou VP8	U _L 44
gD ou VP17 e VP18	U _S 6
gE ou VP12.3 e VP12.6	U _S 8
gG	U _S 4
gH	U _L 22
gI	U _S 7
gL	U _L 1
gN	U _L 49.5

Quadro 1 – Glicoproteínas de envelope do HSV.
 FONTE: ROIZMAN; KNIPE et al., 2007.

1.2.2 Genoma do HSV

A partir do Projeto Genoma para a família *Herpesviridae* (NCBI Project ID: 16828) e mais especificamente os projetos NCBI ID 15217 para HSV-1 e NCBI ID 15218 para o HSV-2, foram obtidas as sequências genômicas desses agentes (NCBI, 2009).

Os genomas do HSV-1 e HSV-2 são semelhantes quanto à organização com alta similaridade em suas sequências, mas cada tipo dotado de algumas proteínas próprias (MIRANDA, 2002; ROIZMAN; KNIPE et al., 2007). Em um estudo filogenético dos

herpesvírus, Dolan; Jamieson et al. (1998) estimaram que a data de divergência entre essas duas linhagens de HSV era de, aproximadamente, oito milhões de anos.

São vírus que possuem como ácido nucleico DNA fita dupla (dsDNA) disposto, predominantemente, de forma linear, podendo torna-se circular na ausência de síntese proteica assim que adentra o núcleo da célula hospedeira (ROIZMAN; KNIPE et al., 2007; KNIPE; CLIFFE, 2008).

Uma característica interessante do genoma do HSV é sua capacidade de sofrer rearranjos, além de possuir sequências repetidas, terminais e internas (BROOKS; BUTEL et al., 2000).

Estudos físicos (análises da densidade *buoyant*³) e moleculares para caracterização do DNA viral do HSV estimaram a existência de aproximadamente 150.000 pares de bases (pb), com um conteúdo de guanina (G) + citosina (C) de 68.3% e 70.4% dos genomas do HSV-1 e HSV-2 (Quadro 2), respectivamente, bem como uma similaridade gênica em torno de 83% entre esses vírus (DOLAN; JAMIESON et al., 1998; GONÇALVES, 2000; ROIZMAN; KNIPE et al., 2007). A cepa referência para o HSV-1, “17”, possui 152.260 pb (NCBI *Reference Sequence*: NC_001806) e a do HSV-2, denominada “HG52” (NCBI/ *Reference Sequence*: NC_001798), possui 154.746 pb⁴ (MCGEOCH; DALRYMPLE et al., 1988; DOLAN; JAMIESON et al., 1998; ICTV, 2009; NCBI, 2009).

O genoma desses vírus é constituído de dois domínios ligados covalentemente entre si: segmento L (*long*, longo) e segmento S (*short*, curto), formando isômeros lineares: I_L, inverso

³ É a medida da tendência que uma substância tem de flutuar em alguma outra substância; moléculas extensas são distinguidas por suas diferentes densidades *buoyant* em algum fluido padrão, medidas por gradiente de densidade em ultracentrifugação.

⁴ Esses números incluem apenas cópias simples da sequência *a* no final do componente L e não leva em conta a variação quanto ao tamanho das sequências *a* (200 a 500 pb cada) ou o número variável de repetições diretas presentes por todo o genoma, mas especialmente repetições invertidas flanqueando os componentes L e S.

do componente L, e I_S , inverso do componente S (BROOKS; BUTEL et al., 2000, ROIZMAN; KNIPE et al., 2007).

Conforme descrito por Dolan; Jamieson et al. (1998), $TR_L - IR_L$ e $IR_S - TR_S$ são pares de elementos repetitivos (R) e inversos (I) que delimitam as duas regiões, longa e curta, do genoma do HSV (Figura 3) e que tanto o HSV-1 quanto o HSV-2 possuem uma origem de replicação de DNA localizada próxima ao centro da U_L (Ori_S) e, também, uma outra origem (Ori_L) com cópias em IR_S e em TR_S .

	% C+G		Comprimento (pb)	
	HSV-1	HSV-2	HSV-1	HSV-2
TR_L	71,6	75,4	9.212	9.297
U_L	66,9	66,9	107.947	108.689
U_S	64,3	66,2	12.980	14.329
TR_S	79,5	80,1	6.677	6.711
Genoma total	68,3	70,4	152.261	154.746

Quadro 2 – Tamanho e composição de bases dos genomas do HSV-1 e HSV-2.

FONTE: Adaptado de DOLAN; JAMIESON et al., 1998.

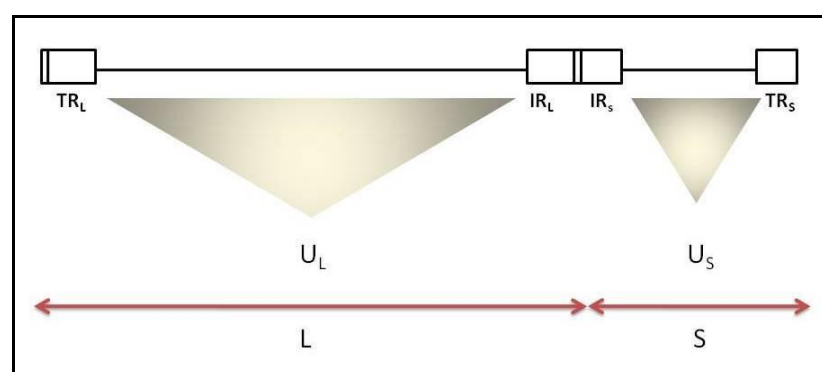


Figura 3 - Representação esquemática do arranjo da sequência de DNA do HSV.

Nota: $TR_L - IR_L$: par de elementos inversamente repetitivos da região longa (L, *long*); $IR_S - TR_S$: par de elementos inversamente repetitivos da região curta (S, *short*); U_L : *long unique sequence*; U_S : *short unique sequence*; L: região L; S: região S.
FONTE: Adaptado de DOLAN; JAMIESON et al., 1998.

1.2.2.1 Genes do HSV

A partir da descrição dos genomas das cepas referência do HSV-1 e 2, sabe-se que tanto um quanto o outro possuem 77 genes, codificando 77 proteínas (ver Apêndice B, onde estão listadas 75 dessas proteínas) (MCGEOCH; DOLAN et al., 1986; MCGEOCH; DALRYMPLE et al., 1988; DOLAN; JAMIESON et al., 1998). Algumas das proteínas codificadas pelos genes do HSV-2 estão representadas no Apêndice B, onde está citado o proteoma desse vírus.

Algumas ORF do genoma desse vírus são antissenso entre si: $\gamma_134.5$ e ORF P, U_L43 e $U_L43.5$ e U_L27 e $U_L27.5$. Ainda não se conhece exatamente todas as origens de transcrição de dessas unidades transcricionais e o acúmulo dessas moléculas na célula é devido ao mecanismo de *splicing* do RNA (ácido ribonucleico).

Dentre os transcritos, existem aqueles que, aparentemente, não codificam proteínas. Estes são conhecidos como *latency-associated transcripts* (LAT) e estão associados ao mecanismo de latência do HSV (ROIZMAN; KNIPE et al., 2007).

Os genes dos HSV são classificados em três classes cinéticas: α ou *immediate early* (IE), β ou *early* (E) e γ ou *late* (L) (MIRANDA, 2002; ROIZMAN; KNIPE et al., 2007).

Os genes α localizam-se perto das terminações dos componentes L e S, sendo que os α_0 e α_4 estão no interior das repetições invertidas desses dois componentes, respectivamente. Os genes β e γ estão dispersos tanto pela U_L quanto pela U_S (ROIZMAN; KNIPE et al., 2007).

A ativação e tradução dos genes β são de responsabilidade dos genes α . Os β , por sua vez, codificam, principalmente, proteínas necessárias à síntese de DNA viral e dos genes da DNA polimerase viral (U_L30) e da *thymidine kinase* (TK, timidina quinase), gene U_L23 . Os genes γ , regulados pelas proteínas originárias dos genes α e β , codificam polipeptídeos estruturais.

Cada transcrito viral codifica apenas uma proteína. Entretanto, existem três exceções: o gene U_L26 codifica um polipeptídeo que cliva a si mesmo em duas proteínas; um transcrito que serve de molde tanto para as proteínas da ORF P quanto da ORF O; e, por fim, um RNA mensageiro (mRNA) de 2.9 Kb que codifica a proteína U_L3 e que contém as ORF de U_L1 , U_L2 e U_L3 , sendo que as proteínas U_L1 e U_L2 são codificadas por um mRNA distinto (ROIZMAN; KINPE et al., 2007).

1.2.2.2 Variações intertípicas e intratípicas

Os genomas desses dois vírus diferem quanto à localização dos sítios de clivagem por endonucleases e pelo tamanho aparente de suas proteínas codificadas. Isso, de acordo com Roizman; Knipe (2007), permitiu a localização aproximada dos genes baseando-se na análise intertípica dos recombinantes do HSV-1 *versus* os do HSV-2.

Como já descrito, existe uma colinearidade em torno de 83%⁵ entre os mapas gênicos do HSV-1 e 2, sendo que ambos possuem uma alta proporção de resíduos de G e C (o HSV-2 possui 2,1% mais G+C que o HSV-1).

Dolan; Jamieson et al. (1998), quando sequenciaram o genoma da cepa “HG52” (cepa padrão, NCBI/ *Reference Sequence*: NC_001798) do HSV-2, relataram o seguinte:

HSV-1 and HSV-2 comprise the most closely related pair of herpesviruses for which complete genome sequences are presently known, but their genomes are nonetheless substantially diverged; in an analysis of herpesvirus phylogeny, we estimated the divergence date of the two HSV lineages as 8 million years ago.

O genoma do HSV-2 é mais extenso que o do HSV-1 e a maior diferença está na região U_S , onde o HSV-2 possui 1.349 pb a mais que o tipo 1. Isto se deve, em boa parte, a uma aparente deleção interna sofrida pelo gene U_S4 do HSV-1. A região U_L é 742 pb maior

⁵ O cálculo dessa porcentagem não incluiu o gene U_S4 , que se apresentou grosseiramente truncado no genoma do HSV-1 (DOLAN; JAMIESON et al., 1998).

no HSV-2 e o tamanho das regiões maiores de repetições são muito similares nas duas espécies. As regiões não-codificantes são muito menos conservadas e ambos os vírus parecem ter transcritos bastante equivalentes entre si (DOLAN; JAMIESON et al., 1998).

As primeiras constatações da existência de variações intratípicas no genoma do HSV surgiram a partir de pesquisas das proteínas estruturais da partícula inteira, quando padrões distintos de corrida das proteínas virais não glicosiladas em gel de eletroforese foram notados. As diferenças entre cepas de HSV-1, por exemplo, podem resultar de uma variabilidade no número de sequências repetidas em determinadas regiões do seu genoma, assim como tais diferenças serem originadas por substituições de bases que podem resultar na adição e/ou deleção dos sítios de clivagem para enzimas de restrição ou até mesmo mudança de aminoácidos (aa) (ROIZMAN; KNIPE et al., 2007).

O polimorfismo nos sítios de endonuclease é usado em inúmeros estudos de transmissão do HSV para os humanos. E, estudos cegos utilizando-se enzimas de restrição vêm sendo usados para estimar e caracterizar o espalhamento da infecção entre pessoas, grupos etc (ROIZMAN; KNIPE et al., 2007).

1.2.2.3 Filogenia e Genótipos do HSV

O principal mecanismo que favorece a acurácia na replicação está na ação exonucleásica 3'→5' da DNA polimerase. De acordo com Norberg; Bergström et al. (2004), essa correção é efetuada pela DNA polimerase do HSV-1, o que contribui de certa forma para uma maior estabilidade do genoma deste vírus. Ainda segundo esses pesquisadores, a taxa total de mutação no genoma do HSV-1 pode ser estimada em $3,5 \times 10^{-8}$ mutações/sítio/ano.

Há alguns anos atrás, não existiam estudos controlados e completos de análise filogenética e nem proposta de classificação dos HSV em genótipos, para que se

aprimorassem estudos desses vírus do campo da epidemiologia molecular em diferentes populações, bem como em isolados clínicos de pacientes. Hoje, algumas poucas, mas importantes pesquisas foram realizadas neste campo, principalmente na Suécia e Estados Unidos da América.

Em 2004, Norberg; Bergström et al., sequenciaram os genes codificadores das glicoproteínas de envelope: gG (U_S4), gI (U_S7) e gE (U_S8), todos os genes localizados na região U_S de isolados de HSV-1 de pacientes com encefalites e úlceras genitais. O estudo filogenético dessas regiões separou os isolados de HSV-1 em três grupos genéticos pelo sequenciamento dos genes das glicoproteínas I e E, e em dois grupos genéticos pela análise do gene da glicoproteína G.

Em 2006, foi publicado um estudo sobre métodos baseados na sequência de DNA para a identificação e caracterização epidemiológica de cepas de HSV-2. Nesta pesquisa, Martin; Koelle et al., compararam o sequenciamento de três regiões codificantes de proteínas do envelope e quatro regiões não-codificantes (Quadro 3) com outros dois métodos de genotipagem: RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) e HMA (*heteroduplex mobility assay*) e, por fim, compararam a amplificação de DNA obtido após passagens do vírus em cultura de célula com a de DNA viral obtido diretamente de lesões clínicas. Eles concluíram que o sequenciamento nucleotídico foi mais poderoso que as técnicas de RFLP e HMA para a distinção de cepas de HSV-2; que as regiões não-codificantes, principalmente a NC1 e NC3, fornecem informações mais robustas (visto que são bastante polimórficas), permitindo uma melhor diferenciação entre amostras não correlacionadas e, além disso, não encontraram diferenças na amplificação do DNA obtido direto de amostras clínicas em comparação com o obtido a partir de passagens por cultura de células.

	Região	ORF
Regiões não codificantes	NC1	Entre U _L 19 e U _L 20
	NC2	Entre U _L 41 e U _L 42
	NC3	Entre U _L 24 e U _L 25
	NC4	Entre U _L 37 e U _L 38
Genes	gB	U _L 27
	gC	U _L 44
	gG	U _S 4

Quadro 3 – Regiões do genoma do HSV-2 utilizadas no estudo realizado por Martin; Koelle et al. (2006).

FONTE: Adaptado de MARTIN; KOELLE et al., 2006.

Um ano depois, em 2007, Norberg; Kasubi et al., publicaram o primeiro estudo sobre a divergência e recombinação⁶ de isolados clínicos de HSV-2, obtidos de úlceras genitais de pacientes da Tanzânia, Suécia e da Noruega. Eles estudaram os genes codificadores das glicoproteínas de envelope: G, I e E (3,5% do genoma do HSV-2), assim como no estudo realizado em 2004 com cepas de HSV-1. Nessa análise filogenética, os resultados demonstraram divergência entre pelo menos dois genogrupos (A e B) e, além disso, esses pesquisadores constataram que a similaridade entre os isolados clínicos de HSV-2 mais distantes filogeneticamente foi de 99,6% contra 98% no HSV-1 do descrito no estudo de Norberg; Bergström et al. em 2004. Esta variabilidade genética mais baixa dos HSV-2 em relação ao HSV-1 talvez seja pelo fato de que, historicamente, a população de HSV-2 seja menor do que a do HSV-1. Por fim, constataram também uma alta taxa de recombinação nesses isolados, o que sugere a importância desse evento na evolução do HSV-2 por,

⁶ Recombinação viral ocorre quando dois vírus de cepas-parentes distintas coinfetam a mesma célula e interagem durante o processo de replicação, gerando progênie, cujo genoma consiste de segmentos gênicos das duas cepas.

teoricamente, aumentar a taxa de adaptação deste vírus ao meio (NORBERG; KASUBI et al., 2007).

1.2.3 Replicação do HSV

1.2.3.1 Entrada do vírus na célula

O HSV pode infectar as células de duas maneiras. Na primeira, há a fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula hospedeira, seguida de um transporte dos capsídeos até os poros nucleares. A segunda maneira, considerada como um caminho auxiliar, acontece via endocitose do capsídeo envelopado e esse processo é receptor-dependente para que aconteça a fusão do envelope viral com a membrana da vesícula endocítica (ROIZMAN; KNIPE et al., 2007).

Em pH neutro, a adsorção do vírion ocorre pela ligação de glicoproteínas virais aos receptores de superfície celular: *heparan sulphate* (HS), *condroitin sulphate* (CS) e *dermatan sulphate* (DS). A glicoproteína C (gC) e glicoproteína B (gB) interagem com glicosaminoglicanos da superfície da célula. Então, a glicoproteína D (gD) estabelece ligação estável (irreversível) com algum dos seguintes receptores: *herpesvirus entry-mediator* (HVEM), nectinas ou HS (MIRANDA, 2002; REY, 2006; ROIZMAN; KNIPE et al., 2007). Há uma alteração conformacional da gD que passa a interagir com um “triplex” formado pelas glicoproteínas B, H e L. Este complexo juntamente faz com que haja a fusão direta do envelope viral com a membrana citoplasmática da célula hospedeira.

1.2.3.2 Replicação do DNA viral e expressão gênica

Após sua entrada na célula, o nucleocapsídeo é levado próximo ao núcleo via proteínas do citoesqueleto celular. O DNA viral penetra no núcleo através dos poros e os capsídeos vazios são deixados no citoplasma. Essa penetração ocorre na presença da proteína α -TIF (VP16). De acordo com Kutluay; DeVos et al. (2009), a α -TIF se liga a uma sequencia-alvo⁷ que está presente em ao menos uma cópia nos promotores do gene IE (α) do HSV e que é sítio de ligação para dois fatores celulares HCF-1 (*host cell factor*) e OCT-1 (*transcription factor*) (PRESTON, 2000). Esse complexo α -TIF/HCF-1/OCT-1 estimula a transcrição dos genes α pela RNA polimerase II (RNAPII) do hospedeiro. Ao mesmo tempo, a proteína *vhs* (U_L41), no citoplasma, degrada RNA viral e celular, bem como desagrega polirribossomos (LEHMAN; BOEHMER, 1999; SMILEY, 2004; ROIZMAN; KINPE et al, 2007).

A expressão gênica do HSV ocorre em cascata e é estimulada pela proteína α -TIF. Nesse processo há ativação de cinco genes com produção de cinco α proteínas que regulam todo o processo de síntese proteica viral: gene α 4 (ICP4), α 0 (ICP0), α 27 (ICP27/U_L54), α 22 (ICP22/U_S1) e α 47 (ICP47/U_S12) (MIRANDA, 2002; ROIZMAN, KNIPE, 2007).

As proteínas α produzidas ativam a transcrição e tradução dos genes β , em torno de quatro a 8 horas pós-infecção. As proteínas β promovem a replicação do DNA viral⁸ e a expressão dos genes γ . Sete destes genes participam do processo de replicação do DNA viral: ICP8 (U_L29), complexo helicase-primase (proteínas U_L5, U_L8 e U_L52), a *ORI binding protein*,

⁷ TAATGARAT, onde "R" é um nucleotídeo da classe das purinas (KUTLUAY; DEVOS et al., 2009).

⁸ Existem diversas proteínas que são codificadas pelo HSV que não são essenciais no processo de replicação em cultura de células. Por outro lado, estudos têm provado que são proteínas indispensáveis na síntese de DNA e no metabolismo nucleotídico em células neuronais (ROIZMAN, KNIPE, 2007; FROBERT; CORTAY et al., 2008).

U_L9, e a DNA polimerase viral com seu fator de processividade, U_L30 e U_L42, respectivamente e o gene U_L23 que codifica a TK. Os genes γ são regulados pelas proteínas α e β e possuem a função de codificar as proteínas virais do tegumento, capsídeo e espículas glicoproteicas (ICP5, glicoproteínas B, C e D, U_L44 etc) (SMILEY, 2004; ROIZMAN, KNIPE, 2007).

Ainda de acordo com o descrito por Roizman; Knipe et al. (2007), o DNA gênomico viral inicia sua replicação próximo ao *cellular nuclear domain* (ND-10). Além disso, os autores comentam sobre estudos demonstrando que, na ausência de síntese proteica ou nos primeiros momentos da infecção, o DNA do HSV circulariza no núcleo.

A replicação do DNA ocorre a partir da ligação da U_L9 às origens de replicação *oriL* (presente entre unidades de transcrição da ICP8 e DNA polimerase) e *oriS* (ligada ao componente S). Essa ligação faz com que haja desnaturação da fita dupla de DNA nesse ponto. Em seguida, a U_L9 conduz a ICP8 até as fitas simples de DNA viral (ssDNA, *single strand* DNA). U_L9-ICP8 atrai à forquilha de replicação, os complexos helicase-primase e DNA polimerase viral-U_L42 para a primeira etapa desse processo conhecida como replicação θ . Ocorre a síntese de *primers* (iniciadores) por uma polimerase celular, a α -primase. A partir daí, a replicação muda sua característica de θ para *rolling circle mode* (mecanismo do círculo rodante), conforme Figura 4, continuando desta maneira até a conclusão de todo o processo (ROIZMAN; KNIPE et al., 2007; KNIPE; CLIFFE, 2008).

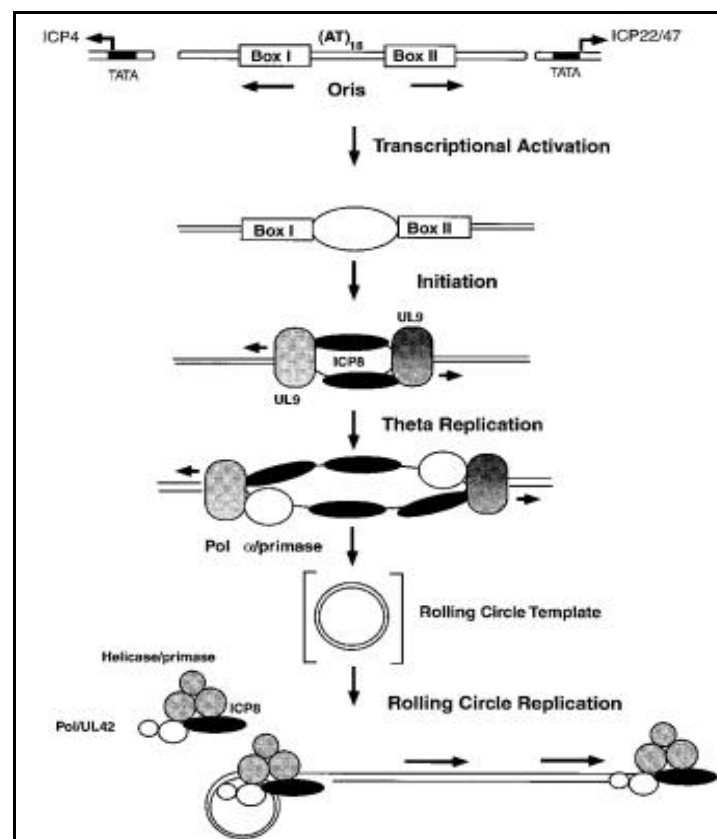


Figura 4 – Modelo da replicação do genoma do HSV-1, replicação teta (*theta replication*) e círculo rolante (*rolling circle*).
 FONTE: Retirado de LEHMAN; BOEHMER, 1999.

1.2.3.3 Aquisição do envelope viral e liberação dos vírions

Após ser sintetizado pelas enzimas codificadas pelos genes β , o DNA viral é empacotado nos capsídeos que estão em diferentes estágios de maturação, formando o nucleocapsídeo viral. Este, por conseguinte, adquire o envelope (KNIPE; CLIFFE, 2008).

Roizman; Knipe et al. (2007) relataram três caminhos propostos em relação à maturação dos capsídeos no núcleo e seu transporte ao exterior das células infectadas: envelopamento duplo, envelopamento único e envelopamento citoplasmático único. No primeiro caminho, os nucleocapsídeos sofrem envelopamento na membrana nuclear interna, perdendo seu envelope na membrana nuclear externa, a partir daí sofrem um segundo

envelopamento na membrana citoplasmática e são transportados, em vesículas, à membrana plasmática, aonde as vesículas irão se fundir para que haja a liberação dos vírions no meio extracelular. No segundo caminho proposto, os nucleocapsídeos são envelopados na membrana nuclear interna, entram em vesículas na membrana nuclear externa e então são transportados à membrana plasmática, onde o vírion é liberado. No terceiro e último caminho hipotetizado, os capsídeos já preenchidos com seu material genético, saem do núcleo através de poros e tornam-se envelopados por meio de brotamento para o interior de vesículas e, a partir daí, são transportados à membrana plasmática onde são liberados (Figura 5).

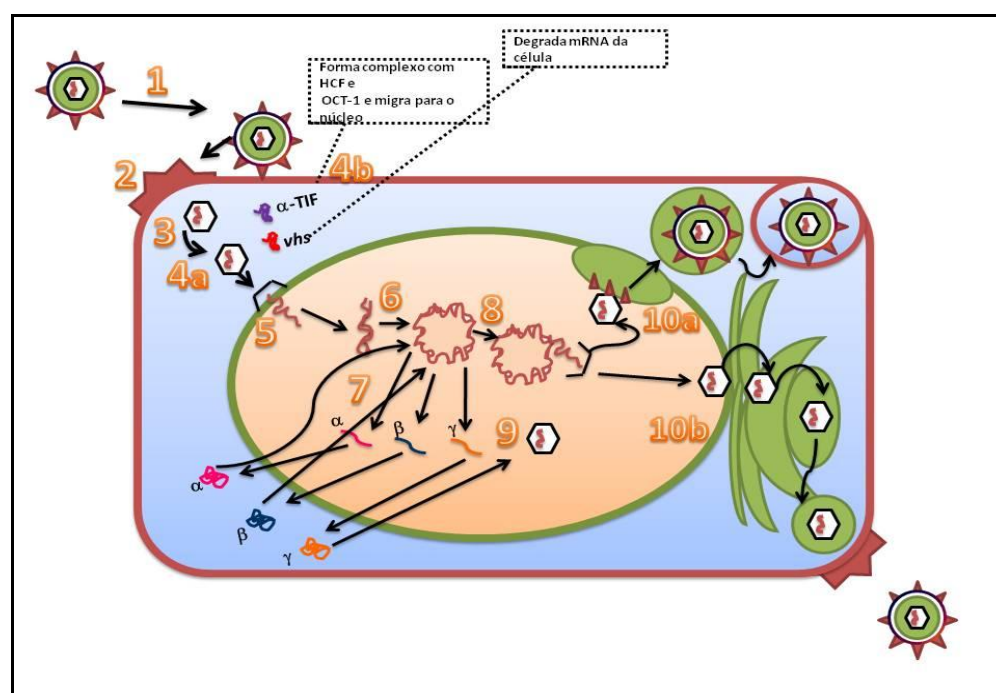


Figura 5 – Ilustração esquemática da replicação do HSV e liberação dos vírions no meio extracelular. 1: Adsorção; 2: Penetração por fusão direta; 3: Liberação do nucleocapsídeo; 4 a.: Migração através do citoesqueleto; 4 b.: Formação de complexo com HCF/OCT-1 e migração para o núcleo; 5: Liberação do DNA viral; 6: Circularização do DNA viral; 7: Transcrição dos genes α em mRNA α , pela RNA polimerase II celular, tradução das proteínas α que, por sua vez, ativam os genes β , cujas proteínas β ativam os genes γ que produzem proteínas estruturais dos vírions; 8: Replacação; 9: Montagem do nucleocapsídeo; 10 a.: O vírus adquire envelope a partir de glicoproteínas de membrana nuclear, sendo liberado por vesículas exocíticas até a membrana celular, onde é exocitado; 10 b.: Nucleocapsídeo é envelopado na membrana nuclear interna e desenvolpado ao atravessar a membrana do núcleo e, em seguida, é reenvelopado na membrana citoplasmática e o vírion é liberado por brotamento. FONTE: Adaptado de MIRANDA, 2002.

1.2.4 Latência e reativação

Assim como todos os membros da família *Herpesviridae*, o HSV-1 e o HSV-2 possuem a capacidade de se tornarem latentes. No caso dessas duas espécies, o estado latente dá-se nos nervos sensoriais (MIRANDA, 2002; ROIZMAN, KNIPE et al., 2007).

Após estabelecer ciclo lítico no sítio primário de infecção, seguido de espalhamento viral no tecido mucoso/epitelial, os vírus penetram nos nervos sensoriais por fusão aos axônios dessas células. Em seguida, os nucleocapsídeos são transportados no sentido contrário ao sinal nervoso (transporte retrógrado) ao núcleo celular neuronal, conforme Figura 6. O DNA viral encontra-se na forma episomal associado a nucleossomos (PRESTON, 2000; KNIPE; CLIFFE, 2008).

Na fase de latência, a expressão de todos os genes líticos encontra-se reprimida, havendo a apenas expressão de inúmeras espécies de RNA oriundos do processo de *splicing*, que compõem uma família de transcritos chamados de *latency-associated transcript* (LAT) (BROOKS; BUTEL et al., 2000; MIRANDA, 2002; FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007; ROIZMAN; KNIPE et al., 2007; KNIPE; CLIFFE, 2008).

Diversos fatores, destacando o *status* imune do hospedeiro, podem ocasionar uma reativação da infecção na forma assintomática ou apresentar lesão recorrente, cuja severidade pode ser variável (BROOKS; BUTEL et al., 2000; MIRANDA, 2002; ROIZMAN; KNIPE, 2007). Essa reativação deve envolver, no mínimo, uma expressão limitada de proteínas virais e alguma replicação do ácido nucleico viral para que haja geração de uma pequena porção de progênie de HSV. Há transporte anterretrogrado dessa nova geração, causando a infecção recorrente no tecido mucoso/epitelial com o espalhamento viral.

Muito pouco se sabe sobre o mecanismo de latência/reativação do HSV nas células neuronais, mas Roizman; Knipe et al., 2007 citam as seguintes hipóteses que tentam justificar,

isoladamente ou em conjunto, como e/ou porque tal mecanismo se estabelece: a primeira defende a existência de uma repressão da expressão dos genes virais líticos por determinados fatores celulares do hospedeiro. A segunda hipótese estaria relacionada a uma baixa nos fatores do hospedeiro que fazem com que haja uma diminuição no estímulo da transcrição dos genes α do vírus e, assim, isso conduziria a uma infecção latente. A terceira defende a inibição da expressão dos genes líticos virais pelas próprias funções do vírus, por existirem estudos em gânglios trigêmeos de murinos que demonstraram que o gene LAT faz com que haja uma queda na expressão dos genes líticos durante infecção aguda e latente. E a quarta e última hipótese está ligada à inibição da replicação viral pela resposta imune do hospedeiro via linfócitos T CD8+ (citotóxicos) e interferon- γ (IFN- γ).

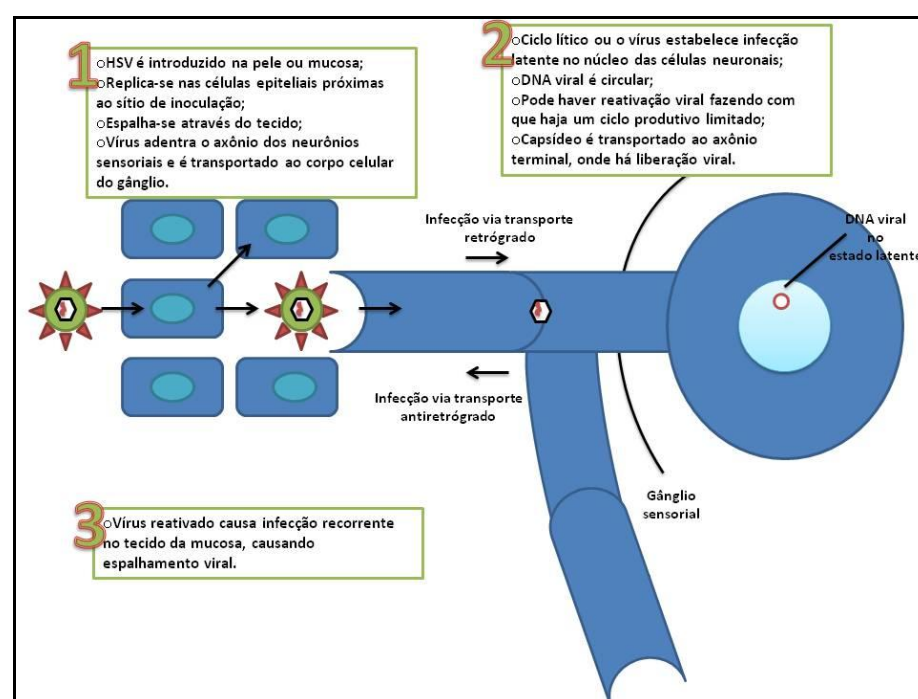


Figura 6 – Latência e reativação do HSV
 FONTE: Adaptado de ROIZMAN; KNIPE et al., 2007.

1.3 HERPES GENITAL

Hipócrates, médico da Grécia Antiga, criou o termo “herpes” (*herpein*= rastejar, réptil) devido à formação de vesículas na pele de pessoas infectadas por esse vírus, sendo o primeiro a descrever tais lesões em, aproximadamente, 460/377 a.C. (MIRANDA, 2002).

O HSV-2 é normalmente associado às infecções genitais e o HSV-1 às orais, mas tanto um quanto o outro podem ser os agentes causadores de úlceras genitais (UG) (BRASIL, 2006).

O período de incubação é de 1 a 26 dias, sendo que, em boa parte dos casos, há manifestação dentro dos oito primeiros dias de infecção (McCORMACK; WALSH et al., 2004).

As manifestações clínicas da herpes genital são variáveis, de quadros assintomáticos a sinais medianos e severos com alto potencial de complicação, e, dentre elas destacam-se: herpes genital primário clássico, herpes genital recorrente, herpes anogenital, lesões cutâneas extragenitais, ceratoconjutivite, gengivostomatite, meningite, encefalite, eczema herpético, eritema multiforme, faringite herpética, proctite herpética, vulvovaginite em crianças, cervicite herpética (BROOKS; BUTEL et al., 2000; MIRANDA, 2002; WEISS, 2004; BEAUMAN; MAJ, 2005; BRASIL, 2006; FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007).

Conforme descrito por Beaman; Maj, 2005, a história natural da infecção pelo HSV começa por uma fase prodrômica que dura de 2 a 24 horas. A pessoa infectada apresenta dor na região afetada, ardência e prurido. Sintomas como dores de cabeça, febre, linfadenopatia inguinal, anorexia podem estar presentes e, com o progresso da doença surgem as vesículas com base eritematosa e sinais de erosão.

São relatadas algumas particularidades quanto à localização das lesões em relação ao sexo. Nas mulheres, elas podem ocorrer no meato uretral, lábios e períneo. Nos homens, as

úlceras aparecem com mais frequência na glândula. Lesões na região perianal, coxas e nádegas foram descritas tanto no sexo feminino quanto no masculino (FATAZADEH; SCHWARTZ, 2007).

Seguindo a infecção inicial, o vírus torna-se latente nos gânglios sensoriais até que haja reativação. Esta pode ser sintomática ou assintomática. A maioria dos pacientes portadores dessa doença não sabe que estão doentes (sem sinais e sintomas) e são, assim, reservatórios em potencial desse vírus (RATNAM; SEVERINI et al., 2007; LOOKER; GARNETT et al., 2008).

São considerados fatores de risco associados a herpes genital: histórico de infecções sexualmente transmissíveis e/ou de lesão genital não diagnosticada, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), múltiplos parceiros sexuais, parceiro (a) diagnosticado com infecção genital por esse mesmo patógeno etc (BEAUMAN; MAJ, 2005).

Além de ser causa de morbidade considerável, essa infecção aumenta o risco de transmissão/contaminação pelo HIV, sendo, também, uma possível causa de complicações neonatais e congênitas, segundo Ratnam; Severini et al., 2007 e Looker; Garnett et al., 2008.

Diversos estudos epidemiológicos (observacionais) e *in vitro* apontam para uma forte sinergia entre o HSV e o HIV-1, onde o HSV é visto como um cofator biológico da transmissão/aquisição do HIV-1, influenciando, também, na replicação deste último (VAN DE PERRE; SEGONDY et al., 2008; ABU-RADDAD; MARGARET et al., 2008).

Ressalta-se a falta de dados quanto à prevalência de HSV-2 em diversos países, principalmente nos da Ásia, África e América do Sul (WHO, 2001).

A prevalência de HSV-2 vem aumentando e, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2008), nos Estados Unidos da América (EUA) 40 a 60 milhões de pessoas estão infectadas pelo Herpes simplex vírus do tipo 2, com uma incidência anual de 600.000 a

800.000 casos, sendo que em países em desenvolvimento, a prevalência pode flutuar entre 2 a 74% dependendo do país e de variáveis como idade, sexo, área urbana, área rural.

Dois estudos de soroprevalência realizados em cidades brasileiras nos anos de 1990/1991 e 1994 e citados nos dados da WHO (2001) mostraram taxas de soroprevalência de 42% e 29%, respectivamente.

A Fundação Alfredo da Matta, centro de referência em venereologia do Estado do Amazonas e localizada em Manaus, atendeu 564 casos de Síndrome de Úlceras Genitais em 2009; um total de 343 casos (60,82%) foi diagnosticado como herpes genital pela abordagem sindrômica, segundo os dados publicados no Boletim Epidemiológico desta Fundação (FUAM, 2010).

Resultados do projeto “Caracterização molecular de agentes de úlceras genitais em pacientes atendidos na Fundação Alfredo da Matta”, mostraram uma prevalência de 55,60% de HSV-2 em amostras de úlceras genitais, sendo que entre as amostras positivas para um dos quatro alvos pesquisados (*T. pallidum*, *H. ducreyi*, HSV-1 e HSV-2), este percentual atingiu quase 83% (NAVECA; ALMEIDA et al., 2009).

Além dos HSV, existem outros quatro agentes etiológicos de Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST) ⁹ que causam o quadro de úlceras genitais: *Treponema pallidum*, sífilis; *Haemophilus ducreyi*, cancro mole; *Klebsiella granulomatis*, donovanose e *Chlamydia trachomatis*, linfogranuloma venéreo (BRASIL, 2006).

Assim, no Brasil, o Ministério da Saúde (2006) enfatiza a necessidade de se estabelecer um diagnóstico diferencial entre os agentes causadores de Síndrome de Úlceras Genitais (SUG). Desta forma, o diagnóstico da SUG é normalmente baseado na apresentação clínica da úlcera. Trata-se de uma abordagem sindrômica preconizada pela WHO (2005) e

⁹ Recomenda-se o uso desta terminologia ao invés de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) para abranger melhor as infecções assintomáticas (WHO, 2005).

adotada por diversos países, visando um tratamento imediato e efetivo das IST/DST nos serviços de atenção primária à saúde.

Segundo as orientações descritas no Manual de Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis do Ministério da Saúde, 2006, o profissional da saúde segue o fluxograma sindrômico (Anexo 1) testado nacional e internacionalmente, tomando as decisões de acordo com os achados clínicos e, utilizando em paralelo, as notas mais específicas que seguem neste documento.

Grande parte dos fármacos utilizados no tratamento da herpes genital são análogos nucleosídicos, como: aciclovir, famciclovir (sua pró-droga penciclovir), ganciclovir, cidofovir e foscarnet (HAYDEN, 2001; MORFIN; THOUVENOT, 2003).

O ACV é o protótipo deste grupo de fármacos, sendo o tratamento de escolha para herpes genital, devido a sua eficácia e baixa toxicidade. No Brasil, são incluídos no tratamento outros dois fármacos desse grupo, valaciclovir e o famciclovir, conforme orientação do Manual de Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis do Ministério da Saúde (2006) (Anexo 2).

Ainda de acordo com esse manual, o diagnóstico etiológico do agente patogênico causador da herpes genital pode ser feito pelo método citológico *Tzanck*, visualizando-se multinucleação e balonização das células fixadas com álcool a 70% em lâmina. A cultura em células, utilizada para o isolamento do vírus, possui sensibilidade razoável nas lesões vesiculosas, mas diminui progressivamente quando já existe ulceração. A sorologia é importante em estudos de soroprevalência ou confirmação, mas não é indicada para rotina. A técnica molecular PCR (*Polymerase Chain Reaction*), no diagnóstico da herpes genital, constitui o método mais sensível, mas ainda não está disponível em muitos laboratórios de referência, sendo geralmente destinada à pesquisa (BRASIL, 2006).

1.4 ACICLOVIR E RESISTÊNCIA DOS HSV

O primeiro fármaco de valor comprovado contra herpesvírus humanos foi aprovado no final da década de 70, a vidarabina. Este, entanto, teve seu uso restrito devido a sua alta toxicidade. Com a descoberta do aciclovir (ACV), cuja aprovação inicial ocorreu em 1982, tem-se, então, o primeiro tratamento efetivo para infecções pelo HSV e VZV (HAYDEN, 2001).

1.4.1 Química do fármaco ACV

O ACV, cujo nome químico é 9-[(2-hydroxy-ethoxy)methyl]-9H-guanine), é um análogo acíclico do nucleosídeo guanidina que não apresenta 3'-hidroxyl em sua cadeia lateral (Figuras 7 e 8). A sua apresentação farmacêutica é em cápsulas e em pó para reconstituição e posterior aplicação intravenosa, existindo também na forma tópica. O valaciclovir (Figura 9) é a pró-droga oral do ACV (HAYDEN, 2001).

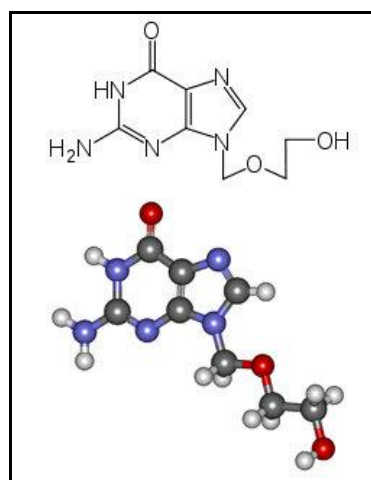


Figura 7 – Estrutura química e espacial de uma molécula de ACV.

FONTE: Retirado de <<http://en.wikipedia.org/wiki/Aciclovir>> Acesso em: 13 de abril, 2009.

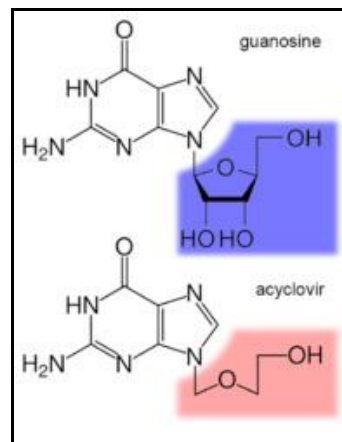


Figura 8 – Analogia entre uma molécula do nucleosídeo guanosina e uma molécula de ACV.
 FONTE: Retirado de <<http://en.wikipedia.org/wiki/Aciclovir>> Acesso em: 13 de abril, 2009.

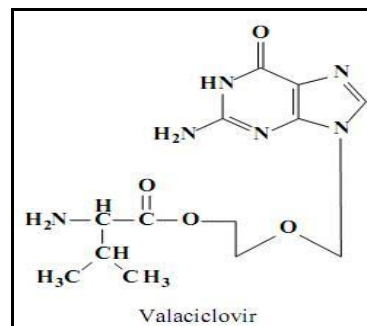


Figura 9 – Estrutura química de uma molécula de Valaciclovir (pró-droga do ACV).
 FONTE: Retirado de CLERCQ, 2004a.

O espectro antiviral do ACV é limitado aos herpesvírus. De acordo com o descrito por Hayden (2001), esse fármaco, *in vitro*, é cerca de duas vezes mais ativo contra HSV-1 do que contra o HSV-2.

O Penciclovir, PCV, e sua pró-droga Famciclovir, FCV (Figura 10) possuem mecanismo de ação similar ao ACV, sendo que o PCV é de uso tópico e o FCV oral (CLERCQ, 2004a).

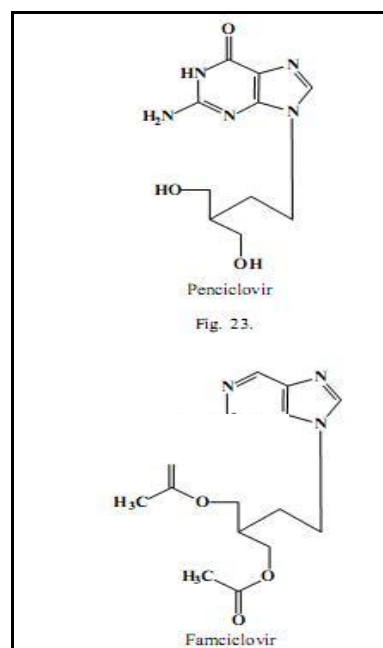


Figura 10 – Estruturas químicas das moléculas PCV e sua pró-droga FCV.
FONTE: Retirado de CLERCQ, 2004a.

1.4.2 TK viral e mecanismo de ação do ACV

A enzima TK¹⁰ do HSV é um complexo homodimérico¹¹ (Figura 11) codificado pelo gene antissenso (-) U_L23 (Figura 12); possui 376 aminoácidos, apresentando seis regiões conservadas, um sítio de ligação de adenosina trifosfato (*ATP-binding site*), um sítio de ligação de nucleosídeo (*nucleoside-binding site*) e, por fim, uma cisteína (no códon 337), conforme Quadro 4 e Figuras 13 e 14 (BALASUBRAMANIAM; VEERISSETTY et al., 1990; DOLAN; JAMIESON, 1998; MORFIN; THOUVENOT, 2003; FROBERT; CORTAY et al., 2008; UNIPROTKB, 2010).

¹⁰ Thymidine kinase/Timidino quinase

¹¹ Proteína composta por duas subunidades idênticas.

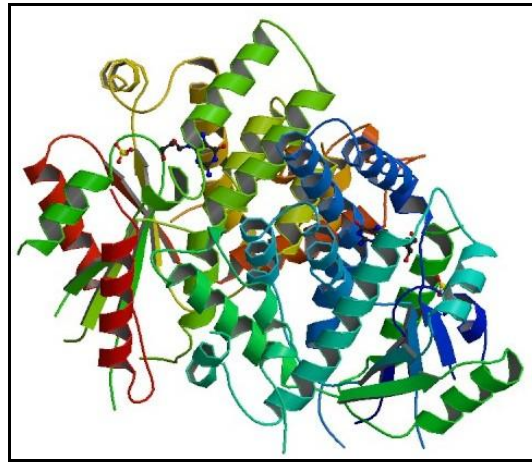


Figura 11 – Cristalografia por raio-X da proteína TK do HSV-1 (cepa “17”- NCBI/*Reference Sequence*: NP_044624), resolução 1,9Å, homodímero.

Nota: bastante similar à TK do HSV-2.

FONTE: Retirado de < <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?pdbId=1e2i>>. Acesso em: 9 de julho, 2010.

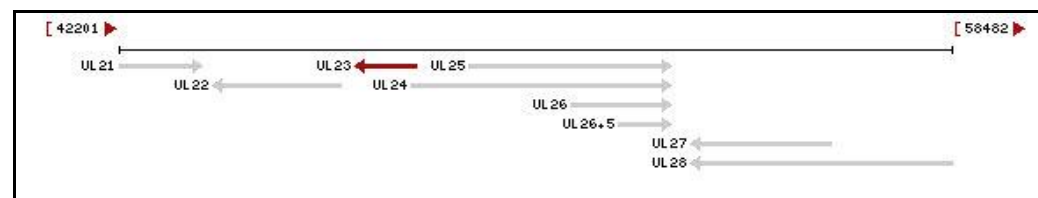


Figura 12 – Contexto do gene U_{L23} no genoma do HSV-2 (cepa “HG52”, NCBI/*Reference Sequence*: NC_001798, *Gene ID* 1487307).

FONTE: Retirado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=1487307> Acesso em: 13 de abril, 2009.

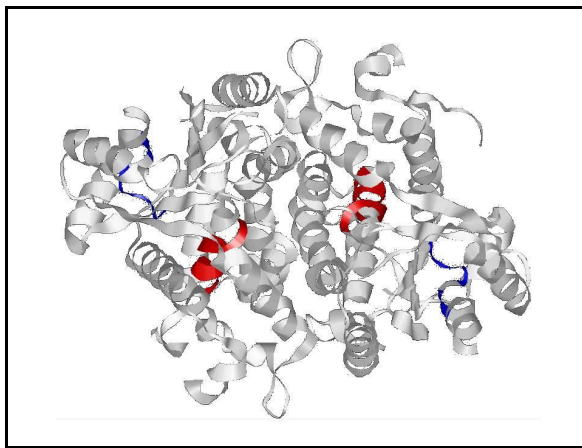


Figura 13 – Regiões *ATP-binding site* (região de ligação de ATP) e *nucleoside-binding site* (região de ligação de nucleosídeo) na proteína TK do HSV-1 (cepa “17” - NCBI/Reference Sequence: NP_044624), resolução 1,9Å, homodímero.

Nota: bastante similar à TK do HSV-2. As regiões de *ATP-binding site*, ligação de ATP (azul) e *Nucleoside-binding site*, ligação de nucleosídeo (vermelho) foram destacadas com auxílio do programa RasMol.

FONTE: Arquivo com as coordenadas atômicas baixado de < <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2KI5>>. Acesso em: 9 de julho, 2010.

Regiões da TK	Posição no HSV-1	Sequência de aa no HSV-1	Posição no HSV-2	Sequência de aa no HSV-2
Região de ligação de ATP	56 - 63	GlyProHisGlyMetGlyLys Thr	56 – 63	GlyProHisGlyValGlyLysT hr
Região conservada I	56 - 62	GlyProHisGly Met GlyLys	56 – 62	GlyProHisGly Val GlyLys
Região conservada II	82 - 88	ProGluProMetThrTyrTrp	83 – 89	ProGluProMetThTyrTrp
Região conservada III	162 - 164	AspArgHis	163 – 165	AspArgHis
Região de ligação de nucleosídeo	168 - 176	Ala Ala LeuLeuCysTyrPro AlaAla	169 – 177	Ala Ser LeuLeuCysTyrPro AlaAla
Região conservada IV	171 - 173	CysTyrPro	172 – 174	CysTyrPro
Região conservada V	216 - 222	ArgLeuAla Lys ArgGlnArg	217 – 223	ArgLeuAla Arg ArgGlnArg
Região conservada VI	284 - 289	Ile Gly AspThrLeuPhe	285 – 290	Ile Glu AspThrLeuPhe

Quadro 4 – Posição das regiões conservadas, de ligação de ATP e de ligação de nucleosídeo na sequência da TK (HSV-1/2).

Nota: Informações obtidas a partir do alinhamento da sequência proteica da TK do HSV-1 (NCBI/ Reference sequence: NP_044624) e do HSV-2 (NCBI/ Reference Sequence: NP_044492), baseando-se nos estudos realizados por Balasubramaniam; Veerisetty et al., 1990. Em negrito-italico: diferenças na sequência de aa entre o HSV-1 e o HSV-2.

FONTE: BALASUBRAMANIAM; VEERISSETTY et al., 1990.



Figura 14 – Representação esquemática da sequência proteica da TK do HSV-2, com destaque para os sítios de ligação de ATP e nucleosídeo.

FONTE: Adaptado de < http://www.uniprot.org/uniprot/P89446#section_ref>. Acesso em: 10 de abril, 2010.

A TK não é necessária à replicação do HSV em cultura de células, mas parece contribuir para a reativação e neurovirulência do HSV (LEE; TANG et al., 1999; BESTMAN-SMITH; SCHMIT et al., 2001; FROBERT; CORTAY et al., 2008).

Por ser um análogo nucleosídico, o ACV necessita ser fosforilado a sua forma trifosfatada (ativa) para que exerça sua função farmacológica sobre a DNA polimerase viral. A primeira fosforilação é feita pela TK viral e as duas outras etapas de fosforilação são realizadas por quinases celulares, conforme ilustrado na Figura 15 (SWAIN; GALLOWAY, 1983; HAYDEN, 2001; BESTMAN-SMITH; SCHMIT et al., 2001; MORFIN; THOUVENOT, 2003; FROBERT; THOUVENOT et al., 2007; FROBERT; CORTAY et al., 2008; SAIJO; SUZUTANI et al., 2007).

A forma trifosfatada do ACV é um inibidor competitivo da DNA polimerase viral, bloqueando a replicação viral. Essa forma ativa do ACV é incorporada, também, ao DNA viral, onde age como uma finalizadora de cadeia, devido à falta do grupo 3'-hidroxila (3'-*hidroxyl*). Por um mecanismo conhecido como *suicide inactivation*, o template de DNA contendo a ligação com o ACV liga-se à DNA polimerase viral (Figura 16) de forma

irreversível (HAYDEN, 2001; MORFIN; THOUVENOT, 2003; FROBERT; THOUVENOT et al., 2007).

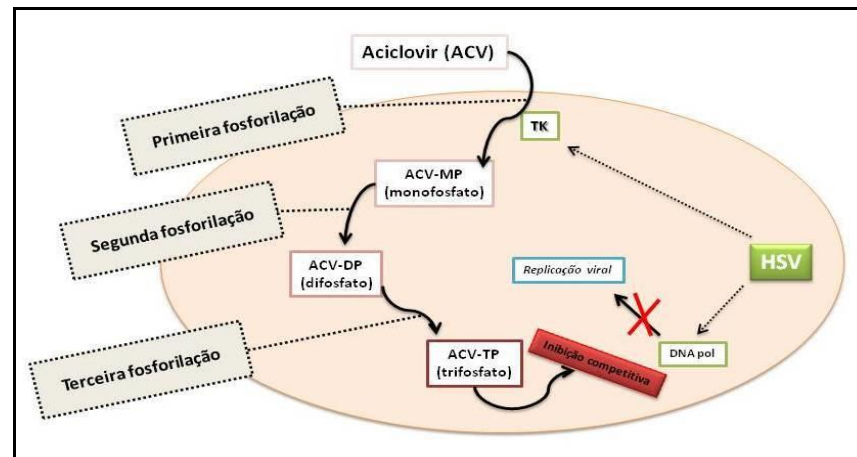


Figura 15 – Desenho esquemático do mecanismo de ação do ACV.
 FONTE: Adaptado de CLERCQ, 2004a.

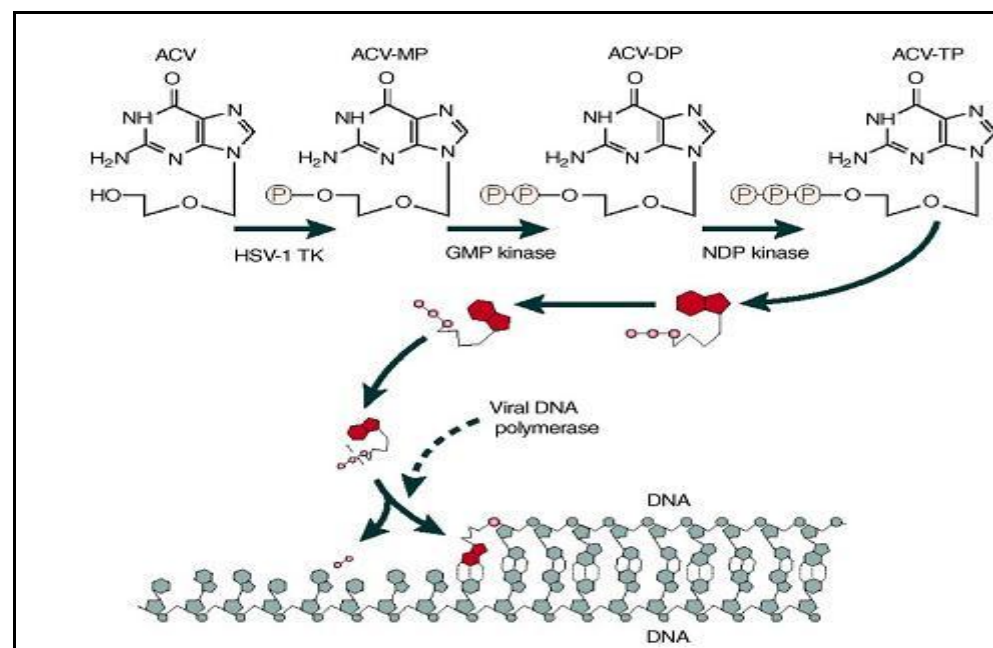


Figura 16 - Mecanismo de ação do ACV mostrando a estrutura química do fármaco e a sua forma ativa agindo sobre a DNA polimerase viral.

Nota: ACV-MP – ACV-mono fosfatado, ACV-DP – ACV-di fosfatado, ACV-TP- ACV trifosfatado.
 Fonte: Retirado de CLERCQ, 2004a.

1.4.3 Mutações de resistência e polimorfismo no gene U_L23 do HSV

Existem três mecanismos que estão envolvidos na resistência do HSV ao ACV: perda da atividade da TK, especificidade alterada da TK ao seu substrato e, ainda, atividade alterada da DNA polimerase viral (KIT; SHEPPARD et al., 1987; BESTMAN-SMITH; SCHMIT et al., 2001; HAYDEN, 2001; HARRIS; COLLINS et al., 2003; MORFIN; THOUVENOT, 2003; FROBERT; OOKA, 2006; CLERCQ, 2004b; FROBERT; THOUVENOT et al., 2007).

Ressalta-se que a presença de DNA polimerase viral funcional é essencial para o HSV, fato que não ocorre com a TK. Isso culmina numa maior probabilidade de se encontrar HSV resistente ao ACV devido à mutação no gene da TK do que no gene da DNA polimerase.

Dessa forma, em torno de 95% da resistência ao ACV é comumente causada por mutações do gene U_L23 do HSV que codifica a TK; os outros 5% são devidos às mutações no gene da DNA polimerase viral, o U_L30 (FROBERT; OOKA, 2006; MORFIN; THOUVENOT, 2003).

A emergência de amostras de HSV resistentes aos antivirais pode ser atribuída ao desenvolvimento espontâneo de vírus mutantes durante o processo de replicação viral que acabam sendo selecionados pelo tratamento, bem como à falha do sistema imunológico em eliminar cepas resistentes (SAUERBREI; DEINHARDT et al., 2010). Segundo Morfin; Thouvenot (2003) e Frobert; Thouvenot et al. (2007), a prevalência de mutações de resistência ao ACV varia entre 0,3% a 1,0% em pacientes imunocompetentes. Em contraste, em pacientes imunocomprometidos, essa frequência pode chegar a 7,1%, de acordo com Sauerbrei; Deinhardt et al., 2010.

Dentre as mutações no gene U_L23 que podem estar associadas à resistência ao ACV, metade delas são causadas por substituições de nucleotídeos. De acordo com Frobert; Thouvenot et al., 2007 e Sauerbrei; Deinhardt et al., 2010, tais alterações estão, em sua

maioria, nos sítios ativos do gene e/ou em regiões gênicas conservadas, que geraram alterações de aminoácidos em sítios catalíticos da enzima TK. A outra metade são inserções ou deleções nas regiões homopoliméricas de C (posições 547-554 e 550-556) ou G (posições 429-437), causando um *frameshift* e, por conseguinte, síntese de TK não funcional, caracterizando esses locais como *mutational hot spots*. Além dessas mutações, uma modificação no aminoácido 337 da TK tem sido encontrada em cepas de HSV (BESTMAN-SMITH; SCHMIT et al., 2001; MORFIN; THOUVENOT, 2003). No Quadro 5, estão descritas as mutações de substituição no gene da TK do HSV-2 associadas à resistência e documentadas até o momento. No Quadro 6 estão descritas as mutações de inserção ou deleção relacionadas à resistência ao aciclovir (ver Apêndice C).

Substituição de aa	Região da TK	Referência
Gly25Ala	Não-conservada	Sauerbrei; Deinhardt et al., 2010
Arg34Cys	Não-conservada	Frobert; Thouvenot et al., 2007
Gly39Glu	Não-conservada	Sauerbrei; Deinhardt et al., 2010
Glu39Gly	Não-conservada	Frobert; Thouvenot et al., 2007
Arg51Trp	Não-conservada	Frobert; Thouvenot et al., 2007
Tyr53Asn	Não-conservada	Sauerbrei; Deinhardt et al., 2010
Asp55Asn	Não-conservada	Gilbert; Bestman-Smith et al., 2002
Gly59Pro	Conservada I/ATP-Binding site	Frobert; Thouvenot et al., 2007; Gilbert; Bestman-Smith et al., 2002
Pro85Ser	Conservada II	Frobert; Thouvenot et al., 2007
Arg86Pro	Conservada II	Sauerbrei; Deinhardt et al., 2010
Asn100His	Não-conservada	Sauerbrei; Deinhardt et al., 2010
Gln105Pro	Não-conservada	Frobert; Thouvenot et al., 2007; Gilbert; Bestman-Smith et al., 2002
Thr131Pro	Não-conservada	Frobert; Thouvenot et al., 2007; Gilbert; Bestman-Smith et al., 2002
Tyr133Phe	Não-conservada	Sauerbrei; Deinhardt et al., 2010
Arg177Trp	Conservada IV/ Nucleoside-Binding site	Frobert; Thouvenot et al., 2007; Gilbert; Bestman-Smith et al., 2002
Ser182Asp/Arg	Não-conservada	Frobert; Thouvenot et al., 2007; Gilbert; Bestman-Smith et al., 2002
Val192Met	Não-conservada	Frobert; Thouvenot et al., 2007
Arg217His	Conservada V	Frobert; Thouvenot et al., 2007
Arg217His+Glu39Gly	Conservada V/Não-conservada	Gilbert; Bestman-Smith et al., 2002
Arg221His	Conservada V	Sauerbrei; Deinhardt et al., 2010
Arg223His	Conservada V	Frobert; Thouvenot et al., 2007; Gilbert; Bestman-Smith et al., 2002
Arg271Val*	Não-conservada	Frobert; Thouvenot et al., 2007; Gilbert; Bestman-Smith et al., 2002
Pro272Ser*	Não-conservada	Frobert; Thouvenot et al., 2007; Gilbert; Bestman-Smith et al., 2002
Asp273Arg*	Não-conservada	Frobert; Thouvenot et al., 2007; Gilbert; Bestman-Smith et al., 2002
Thr287Met	Conservada VI	Frobert; Thouvenot et al., 2007; Gilbert; Bestman-Smith et al., 2002
Cys337Tyr	Não-conservada	Frobert; Thouvenot et al., 2007; Gilbert; Bestman-Smith et al., 2002
Glu39Gly+Stop263	Não-conservada	Gilbert; Bestman-Smith et al., 2002
Tyr239+Stop	Não-conservada	Frobert; Thouvenot et al., 2007

Quadro 5 – Compilação de mutações de substituição descritas para o gene da TK (U_L23) do HSV-2 associadas à resistência ao ACV.

Nota: em negrito – mutação, cuja associação à resistência ao aciclovir não está bem determinada; *- essas posições são em relação à cepa “333” de HSV-2, as posições e trocas de aa corretas em relação à cepa-padrão “HG52” são: Arg272Val, Pro273Ser e Asp274Arg, respectivamente. A classificação quanto à região da TK foi baseada em alinhamento com a sequência proteica da cepa-padrão de HSV-2 “HG52” (NCBI/ Reference sequence: NP_044492).

FONTE: Adaptado de GILBERT; BESTMAN-SMITH et al., 2002; FROBERT; THOUVENOT et al., 2007; SUAERBREI; DEINHARDT et al., 2010.

Del.	Ins.	Região da TK	Stop aa	Referência
		Homopolímero C nt 550-556	NI	Sauerbrei; Deinhardt et al., 2010
		G nt 180	69	Gilbert; Bestman-Smith et al., 2002; Bestman-Smith; Schmit et al., 2001
		C nt 215	86	Gilbert; Bestman-Smith et al., 2002
		G nt 433	227	Gilbert; Bestman-Smith et al., 2002
		2G nt 433	183	Gilbert; Bestman-Smith et al., 2002
		C nt 463	183	Gilbert; Bestman-Smith et al., 2002
		C nt 519	183	Gilbert; Bestman-Smith et al., 2002
		C nt 551	263	Gilbert; Bestman-Smith et al., 2002
		G nt 779	263	Gilbert; Bestman-Smith et al., 2002; Bestman-Smith; Schmit et al., 2001
		T nt 920	348	Gilbert; Bestman-Smith et al., 2002
		17nt	37 ou 39	Gilbert; Bestman-Smith et al., 2002
		G nt 432	82	Bestman-Smith; Schmit et al., 2001
		C nt 463	28	Bestman-Smith; Schmit et al., 2001
		3G nt 175-173C	*G59P	Bestman-Smith; Schmit et al., 2001

Quadro 6 – Compilação de mutações de deleção ou inserção descritas para o gene da TK (U_L23) do HSV-2 associadas à resistência ao ACV.

Nota: “Del.” – deleção; “Ins.” – inserção; “Stop aa” – aa de parada da sequência proteica; * – não houve stop códon nesse caso; “nt” – nucleotídeo; “NI” – não informado.

FONTE: BESTMAN-SMITH; SCHMIT et al., 2001; GILBERT; BESTMAN-SMITH et al., 2002; SUAERBREI; DEINHARDT et al., 2010.

O U_L23 é um gene bastante polimórfico, possuindo diversas mutações que nem sempre estão associadas à resistência ao ACV, e, de acordo com o descrito por Frobert; Thouvenot et al. (2007), esse alto polimorfismo pode estar associado à grande porcentagem de G+C no genoma dos HSV-1 e 2.

As mutações aparentemente associadas ao polimorfismo do gene da TK encontram-se de preferência fora dos sítios ativos e das zonas conservadas deste gene, podendo ser encontradas em HSV sensíveis ou resistentes ao ACV, conforme Quadro 7 (FROBERT; THOUVENOT et al., 2007).

Substituição de nucleotídeo	Substituição de aminoácido	Região da TK
T16G	Cys6Gly	Não-conservada
G122A	Arg41His	Não-conservada
C125T	Pro42Leu	Não-conservada
A232G	Asn78Asp	Não-conservada
G226A	Arg89Gln	Conservada II
G420T	Leu140Phe	Não-conservada
C575T	Ala192Val	Não-conservada
G719A	Gly240Glu	Não-conservada
G751T	Gly251Cys	Não-conservada
G799T	Val267Leu	Não-conservada
C802A	Pro268Thr	Não-conservada
C858A	Asp286Glu	Conservada VI
A1126C	Asn376Pro/His	Não-conservada

Quadro 7 - Compilação de mutações de polimorfismo não associadas à resistência ao ACV, descritas para o gene da TK (U_L23) do HSV-2

FONTE: Adaptado de BESTMAN-SMITH; SCHMIT et al., 2001

1.5 PESQUISA E DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DO HSV

O isolamento/cultivo do vírus em cultura de células ainda é considerado o padrão-ouro para a detecção do HSV. Todavia, trata-se de uma técnica lenta, laboriosa e de sensibilidade moderada (MIRANDA, 2002; McCORMACK; WALSH et al., 2004; RATNAM; SEVERINI et al., 2007).

Diversas linhagens de células são utilizadas no cultivo do HSV, com destaque para fibroblastos diplóides humanos (linhagem MRC-5, por exemplo) ou células de rim de Macaco verde africano (*Vero*) *Vero cells* (HEALTH PROTECTION AGENCY, 2007).

Detecta-se o HSV por meio dos efeitos que a replicação viral causa nas células hospedeiras (efeitos citopáticos). Estes demoram em média de dois a três dias para aparecerem, mas o cultivo deve ser observado até o 14^o dia. Após essa análise, deve-se

confirmar a presença do vírus através da imunofluorescência (IF), utilizando-se anticorpos (Ac) específicos para HSV (McCOMARCK; WALSH, 2004).

Na ausência clínica de lesão, deve-se abrir mão de testes sorológicos: *Western blotting*, *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), imunofluorescência (IF), neutralização e fixação de complemento (MIRANDA, 2002).

As técnicas moleculares possuem uma alta sensibilidade e especificidade, são de execução rápida, podendo ser o método de escolha para a pesquisa do DNA do HSV em casos sintomáticos, substituindo lentamente a cultura do vírus em células na rotina (VARELLA; PIRES et al., 2005; RATNAM; SEVERINI et al., 2007).

Dentre essas técnicas, este presente estudo destaca a PCR e o sequenciamento nucleotídico (*Nucleotide Sequencing*), que podem ser utilizadas tanto no diagnóstico quanto na pesquisa científica para tipar, subtipar, traçar um perfil molecular das amostras numa região e/ou população, com intuito de, por exemplo, se detectar mutações, verificar o grau de polimorfismo de um determinado gene, pesquisar a presença de polimorfismos de resistência genotípica do vírus a um determinado fármaco etc.

1.5.1 *Polymerase Chain Reaction* - PCR

A PCR é uma técnica molecular criada por Kary Mullis (MULLIS; FALOONA et al., 1986; MULLIS, 1990), e é caracterizada pela amplificação *in vitro* de um alvo de DNA, possibilitando a obtenção de um grande número de cópias de um determinado gene ou apenas uma parte do mesmo, a partir de pequenas quantidades de DNA. Para que isto seja possível, faz-se necessário um sistema bem controlado, constituído de uma enzima resistente a considerável variação de temperatura (*Taq* polimerase); os desoxinucleotídeos A, T, C e G em quantidade equimolares (dNTP) a serem acoplados para a construção das fitas-filhas de DNA;

íons bivalentes que funcionam como cofator da reação, sendo o mais utilizado o Mg^{2+} ; uma solução tampão para que o meio não sofra grandes variações de pH e não haja prejuízo na estrutura e funcionalidade da *Taq* polimerase; os iniciadores (*primers*) que sinalizam à enzima onde esta deve começar a incorporar as dNTP e, finalmente, uma pequena quantidade de DNA que se deseja amplificar (MULLIS; FALOONA et al., 1986; MULLIS, 1990). Todo esse sistema é submetido, então, a diversos ciclos de desnaturação da cadeia de DNA, hibridização de iniciadores e extensão da nova cadeia de DNA, num aparelho denominado termociclador.

Após a amplificação, a revelação pode ser feita utilizando-se gel de agarose e/ou poliacrilamida em concentrações adequadas ao tamanho do *amplicon* em estudo, com uso de um padrão de peso molecular e um tampão de corrida (*loading dye*) adequados.

1.5.2 Sequenciamento nucleotídico

O método de sequenciamento nucleotídico, criado por Sanger; Nicklen et al. (1977), baseia-se na criação de fragmentos de DNA de diversos tamanhos (reação de sequenciamento) que começam em um ponto em comum (ou no sentido senso ou no antissenso) e terminam em um dos quatro tipos de nucleotídeos marcados com uma determinada cor (A, T, C ou G). Desta forma, os fragmentos são separados por tamanho em uma eletroforese capilar através do uso de um polímero específico e a cor de cada nucleotídeo é traduzida por meio de um sistema de computador, gerando as sequências nucleotídicas desejadas.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Pesquisar polimorfismos na região codificante do gene U_L23 do HSV-2 a partir de amostras de úlceras genitais.

2.2 ESPECÍFICOS

2.2.1 Desenhar e avaliar iniciadores para a região codificante do gene U_L23 de forma a padronizar uma técnica de PCR para amplificação desses alvos;

2.2.2 Avaliar e descrever polimorfismos da região codificante do gene U_L23 do HSV-2 entre as amostras deste estudo e frente às sequências completas disponíveis em banco de dados públicos;

2.2.3 Verificar a presença de mutações sugestivas de resistência ao aciclovir através do estudo das sequências deduzidas de TK;

2.2.4 Construir modelos teóricos da estrutura terciária da TK das amostras que apresentarem mutações nas sequências deduzidas dessa proteína.

2.2.5 Relacionar a variabilidade genética observada na região codificante do gene U_L23 com a história clínica dos pacientes.

3. METODOLOGIA

3.1 MODELO DE ESTUDO

Estudo descritivo exploratório do tipo série de casos que visou à pesquisa, avaliação e descrição de polimorfismos no gene U_L23 do HSV-2 a partir de amostras de úlceras genitais, objetivando a determinação de sequências deduzidas da enzima TK, detecção de mutações sugestivas ou não de resistência ao aciclovir, bem como descrição dos dados frente à história clínica do paciente.

3.2 UNIDADES DE SAÚDE E PESQUISA PARTICIPANTES

O estudo foi realizado no laboratório de Biologia Molecular da Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia “Alfredo da Matta” (FUAM). Trata-se de uma instituição de referência no Estado do Amazonas (AM) para atendimento, acompanhamento e tratamento de doenças dermatológicas e infecções sexualmente transmissíveis. Está localizada no município de Manaus-AM, no bairro Cachoeirinha.

Em paralelo, alguns procedimentos como reação de sequenciamento e purificação dos produtos de sequenciamento; preparo de reagentes e “testes-piloto” foram realizados nos laboratórios do Instituto Leônidas e Maria Deane / Fundação Oswaldo Cruz (ILMD/FIOCRUZ), localizado em Manaus-AM, no bairro Adrianópolis.

3.3 PARTICIPANTES, AMOSTRAS E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Foram selecionadas, de forma aleatória (sorteio), 80 amostras de pacientes que fizeram parte do Projeto “Caracterização molecular de agentes de úlcera genital em pacientes atendidos na Fundação Alfredo da Matta (“Projeto SUG”) do Programa de Desenvolvimento

Regional (DCR) da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), realizado no período de abril de 2008 a outubro de 2009.

Adotou-se o seguinte critério de elegibilidade: amostras positivas para HSV-2 na PCR multiplex/*HaeIII* pelo “Projeto SUG”.

Este estudo foi realizado a partir dos objetivos contemplados pelo projeto “Projeto SUG” (DCR/FAPEAM), detentor de liberação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia “Alfredo da Matta” (CEP – FUAM), obedecendo às exigências da legislação brasileira (1996), sob Parecer Consubstanciado nº 002/2008, registro no CEP: 013/2007 FR-16552 CAAE – 0015.0.266.000-07 (ver Anexos 3 e 4).

3.4 “PROJETO SUG”

As amostras de úlceras genitais foram coletadas por técnicos treinados da Fundação “Alfredo da Matta”, nos ambulatórios masculino e feminino da Gerência de DST.

As amostras foram colhidas com *swabs* estéreis sendo estes acondicionados em tubos de 1,5mL, contendo 400µL de solução de G-HCl (Guanidina-HCl, Promega #H5383) à 4M, previamente preparados no laboratório. A identificação nos tubos foi feita utilizando-se etiqueta impressa, onde foram registradas as seguintes informações: iniciais do paciente, número do prontuário, data de coleta e código de identificação alfanumérico padronizado. Para que estas anotações não fossem perdidas e/ou apagadas, colocou-se fita adesiva transparente sobre as etiquetas.

Após o procedimento de coleta e identificação, as amostras foram armazenadas em caixas para que ficassem em posição vertical e acondicionadas em freezer a -20°C para posterior processamento.

As amostras coletadas pelo “Projeto SUG” de abril de 2008 a março de 2009 foram submetidas à extração por fenol: clorofórmio (Figura 17) e as coletadas a partir de abril de

2009 foram submetidas à extração de DNA total automatizada, utilizando-se o kit *MagMax Total Nucleic Acid Isolation* (Applied Biosystems – *Life Technologies*) e o robô de extração *MagMax Express* (Applied Biosystems – *Life Technologies*), de acordo com as instruções do fabricante.

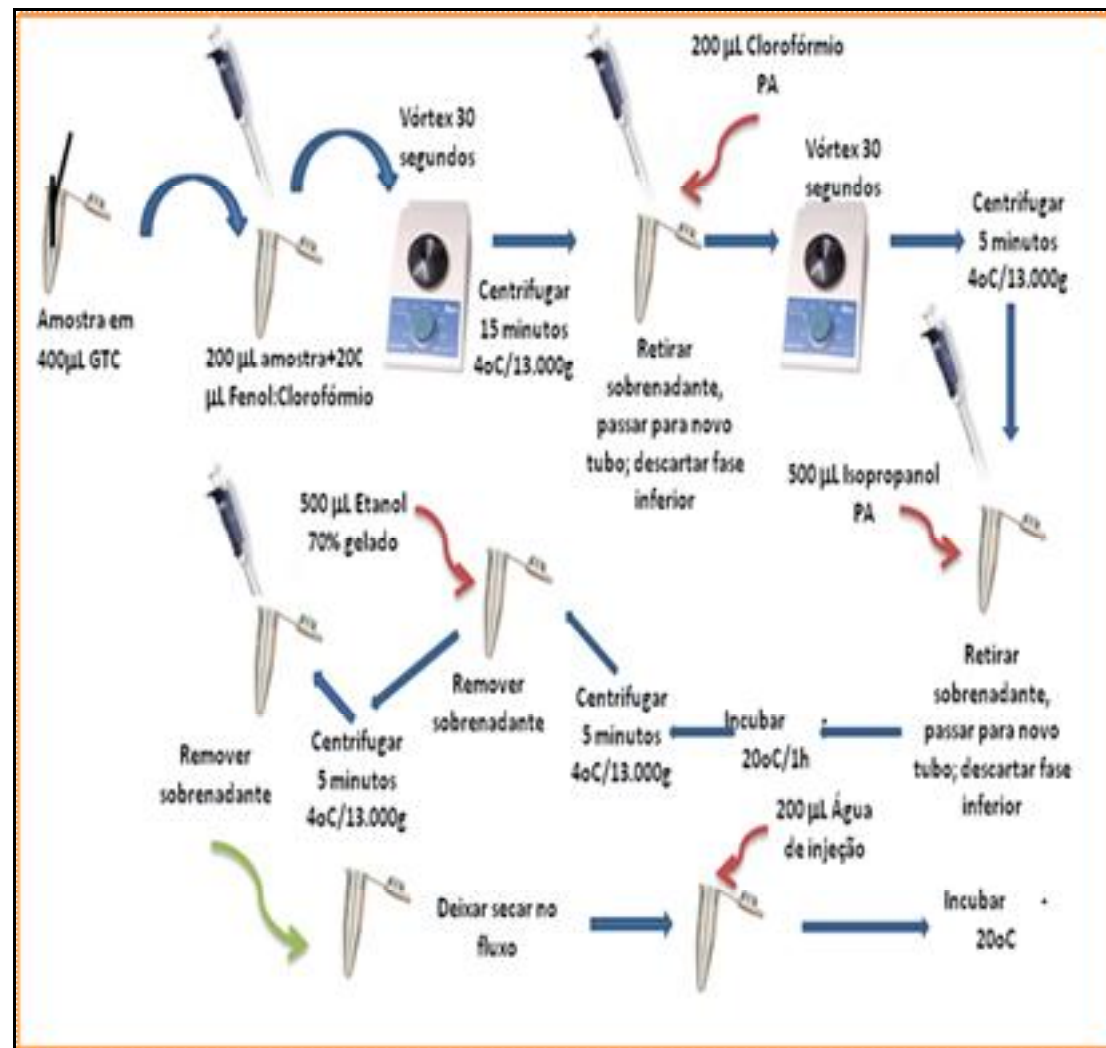


Figura 17 – Etapas da extração por fenol: clorofórmio realizadas pelo “Projeto SUG”.

Nota: GTC corresponde à guanidina-HCl.

FONTE: Retirado de NAVECA; ALMEIDA et al., 2009.

A análise molecular das amostras extraídas foi feita em duas etapas. Na primeira, fez-se uma PCR *multiplex*, cujo objetivo foi a detecção de DNA dos três principais agentes causadores de úlceras genitais: *Herpes simplex virus* - HSV, *Treponema Pallidum*- TP e *Haemophilus ducreyi* – HD (Figuras 18, 19 e 20). Na segunda etapa, todas as amostras que tiveram *amplicons* de 430pb e não apresentavam *amplicon* correspondente ao TP (260pb), foram submetidas à digestão com enzima *HaeIII* (Figuras 21 e 22) para que, de acordo com os produtos de digestão, fosse possível afirmar se eram positivas para HSV-1 e/ou HSV-2 e/ou HD. As amostras que eram de coinfeção (TP mais *amplicon* de 430pb) foram submetidas à PCR *singleplex* para HSV e para HD. As positivas para HSV foram submetidas ao mesmo protocolo de digestão por *HaeIII* (Invitrogen – *Life Technologies*) para se determinar se eram de HSV-1 e/ou HSV-2.

Alvo	Primer	Orientação	Gene	Sequência 5' - 3'	Tamanho	Posição	Amplicon	Referência
<i>Herpes simplex virus</i>	HSV KS30	S	Glicoproteína B	TTCAAGGCCACCATGTACTACAAGACGT	29	460-488	432	Orle; Gates et al., 1996
	HSV KS31	AS	Glicoproteína B	GCCGTAAAACGGGACATGTACACAAAGT	29	863-891		
<i>Treponema pallidum</i>	TP K03A	S	47-kilo dalton antigen gene	GAAGTTTGTC CAGTTGCGGTT	22	564-585	260	Orle; Gates et al., 1996
	TP K04	AS	47-kilo dalton antigen gene	CAGAGCCATCAGCCCTTTCA	21	803-823		
<i>Haemophilus ducreyi</i>	HD K07A	S	16S rRNA	CAAGTCGAACGGTAGCAGCAAG	22	57-78	437	Orle; Gates et al., 1996
	HD K08A	AS	16S rRNA	TTCTGTGACTAACGTCAATCAATTTTG	27	468-494		

Figura 18 – Iniciadores (*primers*) utilizados na PCR *multiplex* do “Projeto SUG”.

FONTE: Retirado de NAVECA; ALMEIDA et al., 2009.

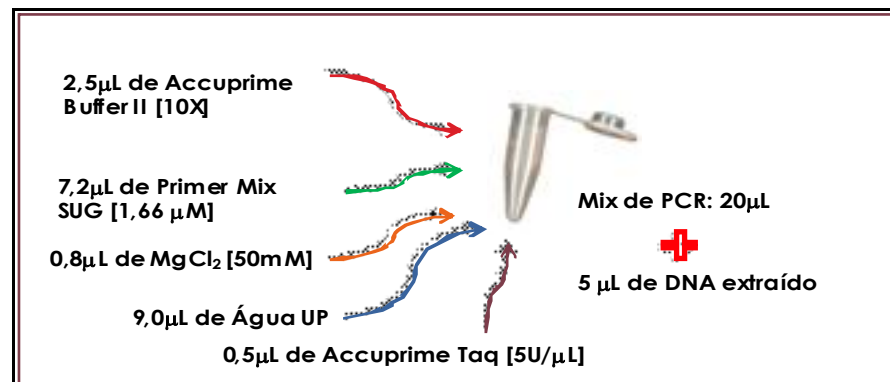


Figura 19 – Mix de PCR *multiplex* para um volume final de reação de 25µL (“Projeto SUG”).

FONTE: Retirado de NAVECA; ALMEIDA et al., 2009.

94°C	94°C	62°C	68°C	68°C	4°C
3 minutos	30 segundos	30 segundos	30 segundos	7 minutos	∞

40X

Desnaturação Hibridização Extensão

Figura 20 – Programa da PCR *multiplex* no termociclador (“Projeto SUG”).
 FONTE: Retirado de NAVECA; ALMEIDA et al., 2009.

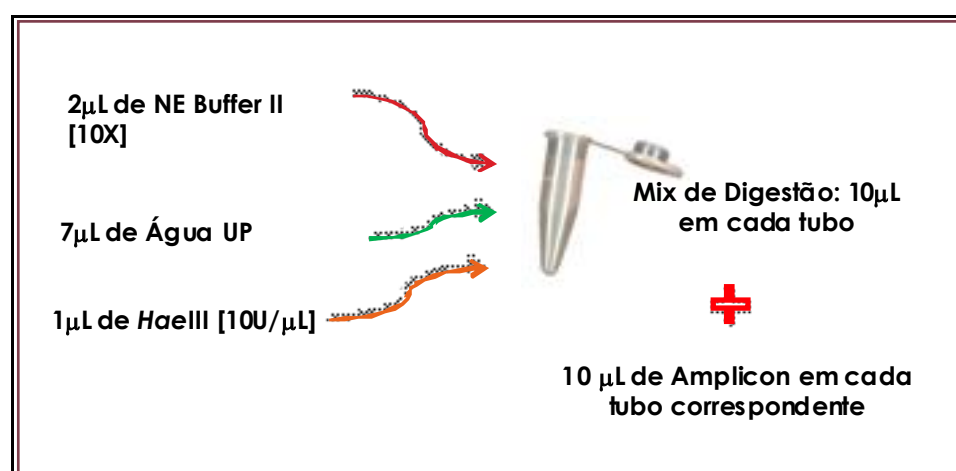


Figura 21 – Mix da digestão pela *HaeIII*, volume final de reação: 20µL (“Projeto SUG”).
 FONTE: Retirado de NAVECA; ALMEIDA et al., 2009.

37°C	80°C	4°C
60 minutos	20 minutos	∞

Figura 22 – Programa da digestão pela *HaeIII* no termociclador (“Projeto SUG”).
 FONTE: Retirado de NAVECA; ALMEIDA et al., 2009.

3.5 FLUXOGRAMA DE PROCEDIMENTOS

O fluxograma de procedimentos adotados por este estudo está representado a seguir, na Figura 23, em que, na primeira parte, estão ilustradas as etapas de padronização da PCR e, na etapa subsequente, as análises moleculares propriamente ditas.

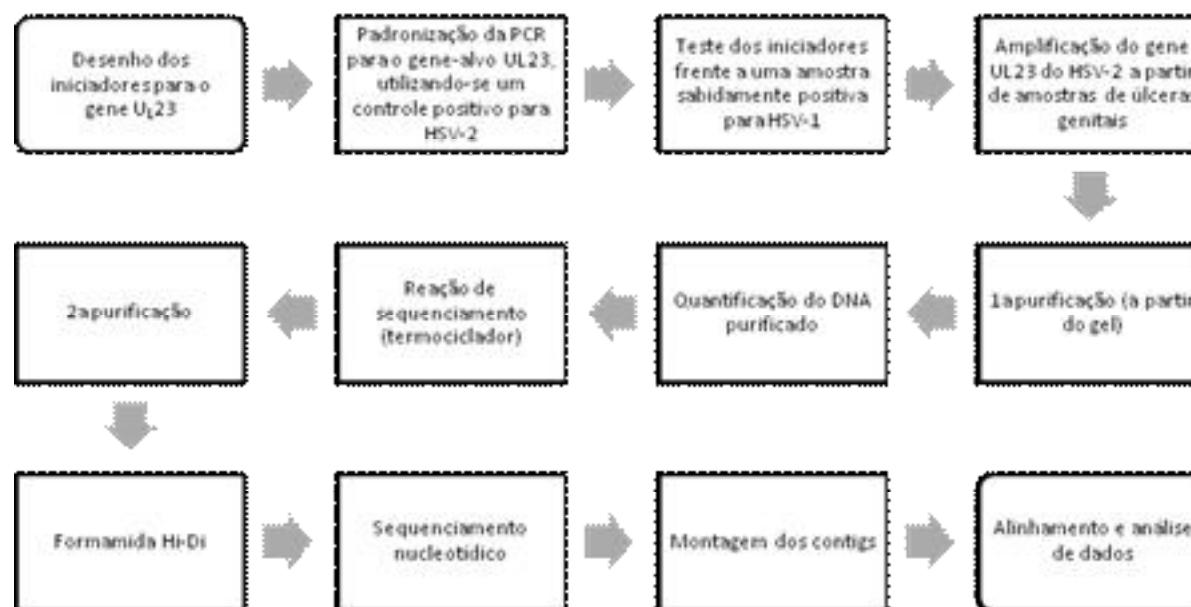


Figura 23 – Fluxograma de procedimentos para estudo do gene U_{L23} .

3.6 DESENHO DOS INICIADORES PARA O GENE U_{L23} DO HSV-2

Para o desenho dos iniciadores senso e antissenso objetivando-se a amplificação do gene U_{L23} , seqüências disponíveis GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Acesso em 02 de agosto, 2008), foram baixadas e alinhadas entre si e com o genoma da cepa-referência “HG52” (NCBI/ *Reference Sequence*: NC_001798, “HG52”), utilizando-se o *software* livre BIOEDIT (*Biological Sequence Alignment Editor v. 7.0.9.0*) (retirado de <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Acesso em: 02 de agosto, 2008).

Regiões conservadas fora da CDS desse gene foram escolhidas para que não se perdesse informação de seqüência codificante quando as mesmas fossem sequenciadas. A partir daí, os iniciadores senso e antissenso (Figura 24 e Quadro 8) foram desenhados, com auxílio dos programas *Primer Express v3.0* (Applied Biosystems - *Life Technologies*), *PrimerSelect* (*Lasergene* – DNASTAR) e da ferramenta livre *on-line Primer-Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), atentando-se para o fato de o gene U_{L23} é

um “gene antissenso”. A escolha dos pares de iniciadores foi realizada a partir daquele par com menor valor de penalidade nos *softwares* analisados. A especificidade do par de iniciadores foi confirmada com a ferramenta *Primer-Blast*.

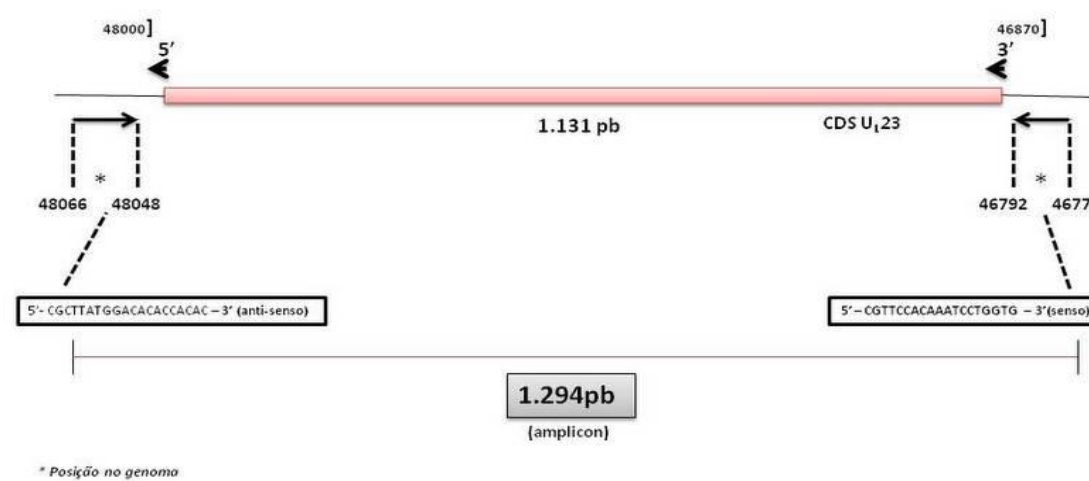


Figura 24 – Iniciadores desenhados para amplificação do gene U_L23.

Alvo	Primer	Orientação	Gene	Seqüência 5' - 3'	Tamanho	Posição	Amplicon
U _L 23 do HSV-2	TKS	S	U _L 23	CGTCCACAAATCCTGGTG	19	46773-46792	1294pb
	TKAS	AS	U _L 23	CGCTTATGGACACACCAC	20	48048-48066	

Quadro 8 – Sequência dos iniciadores senso e antissenso para amplificação do gene U_L23 do HSV-2 e com destaque ao tamanho do *amplicon*.

Os iniciadores (adquiridos da Invitrogen - *Life Technologies*) para a região do U_L23 foram ressuspensos em água ultrapura (Sistema *Milli-Q* Biocel/Elix5, Millipore), na concentração de 100µM.

Para evitar intensa manipulação dos tubos contendo os iniciadores ressuspensos, cada um deles foram aliqüotados e diluídos à concentração de 10µM. Todos esses microtubos foram armazenados à -20°C.

3.7 PADRONIZAÇÃO DA PCR PARA O GENE U_L23 DO HSV-2

Para se padronizar a PCR para o gene U_L23 foram escolhidas inicialmente seis temperaturas-teste para hibridização dos iniciadores de acordo com as características físico-químicas dos mesmos: 42,0°C; 45,0°C; 48,0°C; 53,0°C; 56,0°C e 60,0°C. Além disso, foram testadas cinco concentrações finais de Mg²⁺ (MgCl₂ 50mM, Invitrogen - *Life Technologies*): 1,5mM; 2,0mM; 2,5mM; 3,0mM e 3,5mM. Foram feitos, portanto, cinco mixes com volume final de 50μL, já com o DNA total extraído.

A amostra utilizada para a padronização (UG002) foi uma conhecida positiva para HSV-2 proveniente do “Projeto SUG”, com uma boa concentração de DNA (123,9ng/μL) e uma excelente razão de pureza (260/280 = 1,78), informações estas obtidas por quantificação em espectrofotômetro (*Micro-volume Spectrophotometer ASP-3700*, avans Biotechnology Corp).

A concentração final dos iniciadores (Invitrogen - *Life Technologies*), de dNTP (100mM dNTP, Invitrogen - *Life Technologies*TM), de tampão de PCR sem Mg²⁺ (Invitrogen - *Life Technologies*), da Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen - *Life Technologies*) e de DMSO (Sigma-Aldrich) estão no Quadro 9. As concentrações finais de MgCl₂+ testadas encontram-se no Quadro 10.

Reagente	Concentração final
dNTP	0,2mM
Tampão de PCR sem Mg ²⁺	1X
Platinum® <i>Taq</i> DNA Polymerase	2,5U
DMSO	7%
Mix de iniciadores (TKS/TKAS)	0,5 μM

Quadro 9 – Concentrações finais dos reagentes no *mix* de PCR para amplificação da CDS do gene U_L23.

Concentrações finais de MgCl ₂				
1,5mM	2,0mM	2,5mM	3,0mM	3,5mM

Quadro 10 – Concentrações finais de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) testadas na padronização da PCR para amplificação da CDS do gene U_L23.

Cada mix contendo distinta concentração final de íons Mg²⁺ foi distribuído em quantidades iguais em microtubos de 0,2mL, ou seja, um tubo para cada temperatura de hibridização em teste. A PCR foi realizada no termociclador VERITI™ 96-Well Thermal Cycler 0,2mL (Applied Biosystems - *Life Technologies*) nas seguintes condições: 95,0°C por 5 minutos; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, zona de temperaturas (42,0°C; 45,0°C; 48,0°C; 53,0°C; 56,0°C e 60,0°C) por 15 segundos, 72°C por 2 minutos; 72°C por 7 minutos.

Ao final da reação de PCR, as bandas (1294pb) foram analisadas em gel de agarose (UltraPure Agarose, Invitrogen - *Life Technologies*) a 1% com Sybr® Safe DNA Gel Stain (SKU# S33102, Invitrogen - *Life Technologies*) diluído 10.000 vezes, através de visualização no transiluminador Safe Imager Blue Light Transilluminator (#S37102, Invitrogen - *Life Technologies*). Os volumes de amplicon e de solução de tampão de amostras 6X (*loading dye*, xilenocianol e azul de bromofenol) utilizados foram, respectivamente de 5µL e 2,5µL; o volume de padrão de peso molecular (123bp DNA Ladder 250µg, Invitrogen - *Life Technologies* SKU#15613-029) foi 1,0 µL em 2,5 µL de tampão de corrida 2X. O tampão usado para a eletroforese foi o TAE (DNA Typing Grade 50X TAE Buffer, GIBCO/Invitrogen - *Life Technologies*) diluído a 1X. A eletroforese foi feita em uma cuba horizontal de tamanho 12 X 12cm, modelo DGH12 da DIGEL, com pente de 1mm de espessura, nas seguintes condições de corrida: 80V (aproximadamente 60mA iniciais) por uma hora.

3.8 AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO GENE U_L23

3.8.1 PCR para o gene U_L23

Após a padronização da PCR para amplificação do gene U_L23, as amostras escolhidas aleatoriamente do “Projeto SUG” e positivas para HSV-2 (n=80) foram submetidas à amplificação da região-alvo. Os volumes de reagentes e suas concentrações utilizadas nas reações estão ilustrados no Quadro 11.

dNTP (100mM)	Platinum <i>Taq</i> DNA Polymerase (5,0U)	Tampão de PCR sem Mg ²⁺ (10X)	Mix de iniciadores gene U _L 23 (5μM)	DMSO	Água ultrapura	MgCl ₂ (50mM)	DNA extraído (amostra)
1,0μL	0,5μL	5,0μL	5,0μL	3,5μL	28,5μL	1,5μL	5,0μL

Quadro 11– Volume de reagentes e suas concentrações iniciais para PCR do gene U_L23 do HSV-2.

A PCR foi realizada no termociclador VERITI™ 96-Well Thermal Cycler 0,2mL (Applied Biosystems - *Life Technologies*™) nas condições ilustradas no Quadro 12.

95°C	95°C	60°C	72°C	72°C	4°C
5 minutos	15 segundos	15 segundos	2 minutos	7 minutos	∞
----- 40X -----					

Quadro 12– Programa para amplificação da CDS do gene U_L23 do HSV-2.

Ao final da PCR¹⁰, as bandas (gene U_L23 - 1294pb) foram analisadas em gel de agarose (UltraPure Agarose, Invitrogen - *Life Technologies*) a 1% com Sybr Safe DNA Gel Stain (SKU# S33102, Invitrogen - *Life Technologies*) diluído 10.000 vezes, através de visualização

¹⁰ Caso a eletroforese não fosse realizada imediatamente após a PCR, os microtubos contendo os amplicons eram armazenados a -20°C.

no transiluminador *Safe Imager Blue Light Transilluminator* (Invitrogen - *Life Technologies*). Os volumes utilizados de *amplicon* e de solução de tampão de corrida 2X (*loading dye*) foram, respectivamente, de 5µL e 2,5µL; o volume do padrão de peso molecular (123bp DNA Ladder 250µg, Invitrogen - *Life Technologies*, SKU#15613-029) foi 1,0 µL em 2,5 µL de tampão de corrida 2X. O tampão usado para a eletroforese foi o TAE (DNA *Typing Grade* 50X TAE *Buffer*, GIBCO/Invitrogen - *Life Technologies*) diluído a 1X.

A eletroforese foi feita em uma cuba horizontal de tamanho 12 X 12cm, modelo DGH12 da DIGEL, com pente de 1mm de espessura, na seguinte condição de corrida: 80V (aproximadamente 60mA iniciais) por uma hora.

As amostras, as quais se observaram amplificação correspondente ao alvo pesquisado, foram separadas para posterior purificação.

Em cada grupo de amplificações foram utilizados controles positivos e brancos. Como positivo a amostra que foi usada para a padronização dessa PCR e, como branco, água ultra-pura (Sistema *Milli-Q* Biocel/Elix5, Millipore).

3.8.2 Purificação a partir de bandas de DNA

Para a purificação dos *amplicons* da etapa anterior, foi utilizado o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (# A9282, Promega Corporation), conforme o esquema ilustrado na Figura 25.

As amostras purificadas foram, então, submetidas à eletroforese em gel de agarose (UltraPure Agarose, Invitrogen - *Life Technologies*) a 1% com Sybr Safe DNA Gel Stain (SKU# S33102, Invitrogen - *Life Technologies*) diluído 10.000 vezes, juntamente com o *Low DNA Mass Ladder* (4µL por aplicação, da Invitrogen - *Life Technologies*), para verificação aproximada da quantidade de DNA amplificado/purificado de cada uma das amostras estudadas.

Os volumes utilizados de *amplicon* purificado e de solução de tampão de corrida (*loading dye*) foram, respectivamente, de 4 μ L e 1,0 μ L; o volume do *Low DNA Mass Ladder* foi de 4,0 μ L em 1,0 μ L de tampão de corrida 2X. O tampão usado para a eletroforese foi o TAE (*DNA Typing Grade 50X TAE Buffer*, GIBCO/Invitrogen - *Life Technologies*) diluído a 1X. A eletroforese foi feita em uma cuba horizontal de tamanho 12 cm X 12 cm, modelo DGH12 da DIGEL, com pente de 1 mm de espessura, a 80V por uma hora.

As bandas foram visualizadas e analisadas no transiluminador *Safe Imager Blue Light Transilluminator* (Invitrogen - *Life Technologies*), comparando-se com a orientação presente na bula do *padrão* (Figura 26).

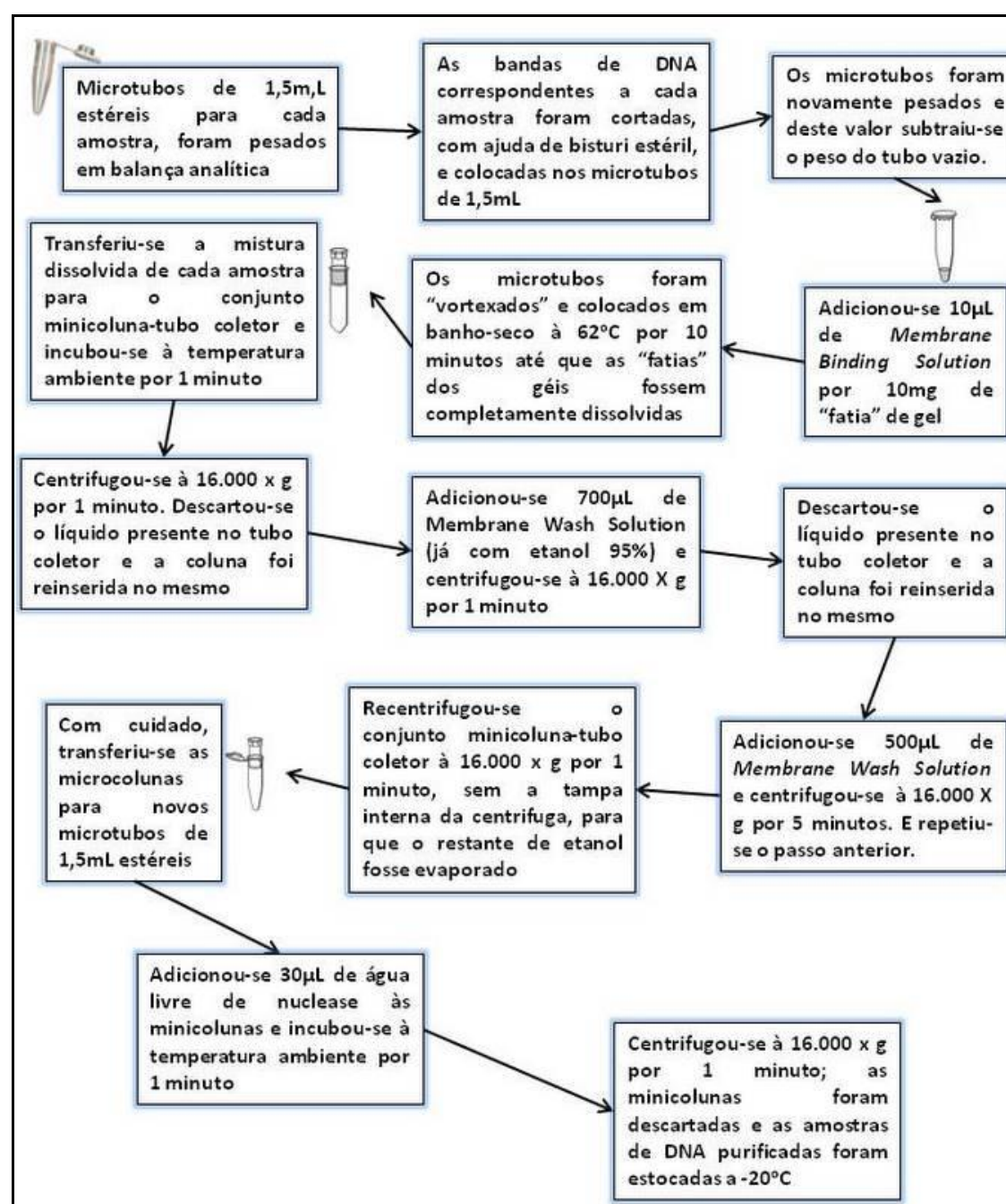


Figura 25 – Procedimento de purificação de banda de DNA pelo sistema *Wizard SV Gel and PCR Clean-up* (Promega Corporation), utilizado para purificação das bandas de DNA do amplicon de 1294pb originado da PCR para o gene U_123 .

FONTE: Adaptado de *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System – Instructions for use of products A9280, A9281, A9282 and A9285 – Quick Protocol* <<http://www.promega.com/protcards/9fb072/fb072.pdf>>. Acesso em 2 mai 2010.

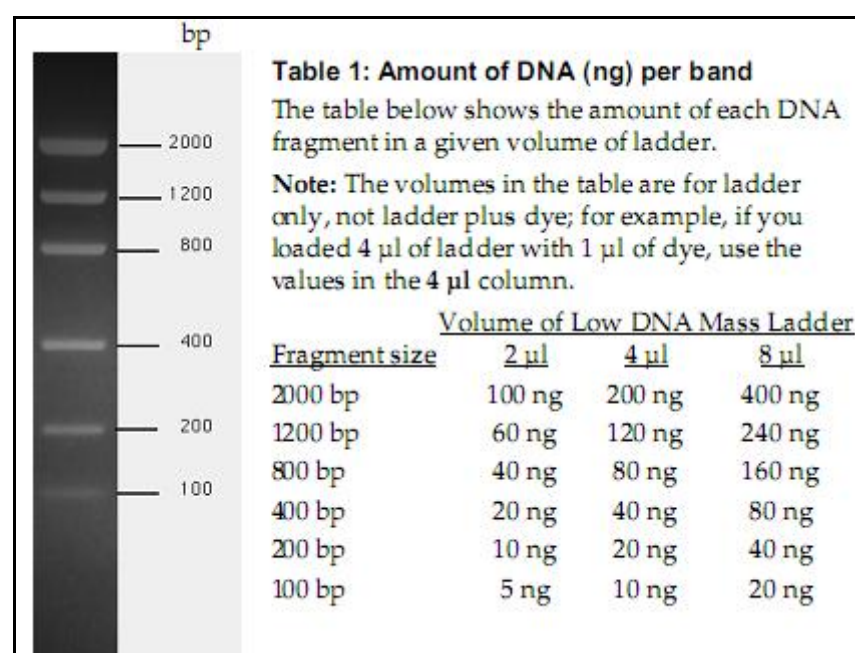


Figura 26 – Guia para análise quantitativa das bandas de DNA, através do uso do *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen - *Life Technologies*TM).

FONTE: Retirado de <<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/10068013.pdf>>. Acesso em: 01 de maio, 2010.

3.8.3 Reação de Sequenciamento para o Gene U_L23

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se o *kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems - *Life Technologies*). De acordo com as recomendações do fabricante, a quantidade de DNA purificado para produto de PCR de 1000-2000pb (U_L23) deveria estar entre 10-40ng (Figura 27). Assim, após quantificação, foram realizadas diluições das amostras amplificadas e purificadas que continham 40ng e 80ng de DNA, para que a quantidade ficasse em, aproximadamente, 20ng

Desta forma, o volume para reação de sequenciamento das amostras que continham 10ng foi de 3,0µL e das com 40ng diluídas 1:2 e 80ng diluídas 1:4 foi de 1,5µL.

O mixes da reação de sequenciamento para o gene U_L23 realizados com o *BigDye* estão ilustrados nos Quadros 13 e 14. Foram feitas reações senso e antissenso para cada uma das amostras, utilizando-se os mesmos iniciadores da PCR. O volume final das reações foi de 10µL.

Template	Quantity
PCR product:	
100–200 bp	1–3 ng
200–500 bp	3–10 ng
500–1000 bp	5–20 ng
1000–2000 bp	10–40 ng
>2000 bp	20–50 ng
Single-stranded	25–50 ng
Double-stranded	150–300 ng
Cosmid, BAC	0.5–1.0 µg
Bacterial genomic DNA	2–3 µg

Figura 27 – Faixas ideais de quantidade de DNA purificado para reação de seqüenciamento pelo *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems - *Life Technologies*).
 FONTE: Retirado de <http://www.ibt.lt/sc/files/BDTv3.1_Protocol_04337035.pdf> . Acesso 03 de junho, 2010.

Para amostras com quantidade aproximada de 20ng de DNA purificado

	Tampão "Save Money" (5X)	Iniciador U _L 23 senso <u>ou</u> antissenso (3.2µM)	BigDye	Água ultrapura	DNA extraído (amostra)
1 x 10µL	2,0µL	1,0µL	1,0µL	4,5µL	1,5µL

Quadro 13 – Volume de reagentes e suas concentrações iniciais para reação de seqüenciamento, utilizando-se o *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems - *Life Technologies*) para amostras com quantidade aproximada de 20ng de DNA purificado.
 FONTE: Adaptado de <http://www.ibt.lt/sc/files/BDTv3.1_Protocol_04337035.pdf> . Acesso 03 de junho, 2010.

Para amostras com quantidade aproximada de 10ng de DNA purificado

	Tampão "Save Money" (5X)	Iniciador U _L 23 senso <u>ou</u> antissenso (3.2µM)	BigDye	Água ultrapura	DNA extraído (amostra)
1 x 10µL	2,0µL	1,0µL	1,0µL	3,0µL	3,0µL

Quadro 14– Volume de reagentes e suas concentrações iniciais para reação de seqüenciamento utilizando-se o *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems - *Life Technologies*) para amostras com quantidade aproximada de 10ng de DNA purificado.
 FONTE: <http://www.ibt.lt/sc/files/BDTv3.1_Protocol_04337035.pdf> . Acesso 03 de junho, 2010.

As reações foram feitas em placas de 96 poços (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plates, #8010560, Applied Biosystems - *Life Technologies*), utilizando-se *strips* para selar os poços (MicroAmp Optical 8-Cap Strip, #4323032, Applied Biosystems - *Life Technologies*).

Após os reagentes e amostras serem adicionados na placa, foi feita uma rápida *centrifugação*. Em seguida, a placa foi colocada no termociclador VERITI 96-Well Thermal Cycler 0,2mL (Applied Biosystems - *Life Technologies*), no programa para reação de *BigDye*, ilustrado no Quadro 15.

96°C	96°C	50°C	60°C	4°C
1 minuto	10 segundos	5 segundos	4 minutos	∞
----- 25X -----				

* Todas as temperaturas em modo de rampa térmica rápida 1°C/seg

Quadro 15 – Programa de reação de sequenciamento para DNA fita dupla.

FONTE: <http://www.ibt.lt/sc/files/BDTv3.1_Protocol_04337035.pdf> . Acesso 03 de junho, 2010.

3.8.4 Precipitação/purificação após reações de sequenciamento

Após a etapa no termociclador, submeteu-se a placa a uma rápida centrifugação em centrífuga apropriada (Eppendorf *Centrifuge* 5810R, rotor A-4-81). Em seguida, fez-se precipitação/purificação com Etanol/E.D.T.A/Acetato de sódio de acordo com o recomendado pelo protocolo do *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems - *Life Technologies*), conforme representado na Figura 28¹¹. As concentrações e pH dos reagentes utilizados nesse procedimento encontram-se no Quadro 16.

¹¹ Para detalhamento deste procedimento, faz-se necessário consultar o protocolo do *kit* em questão.

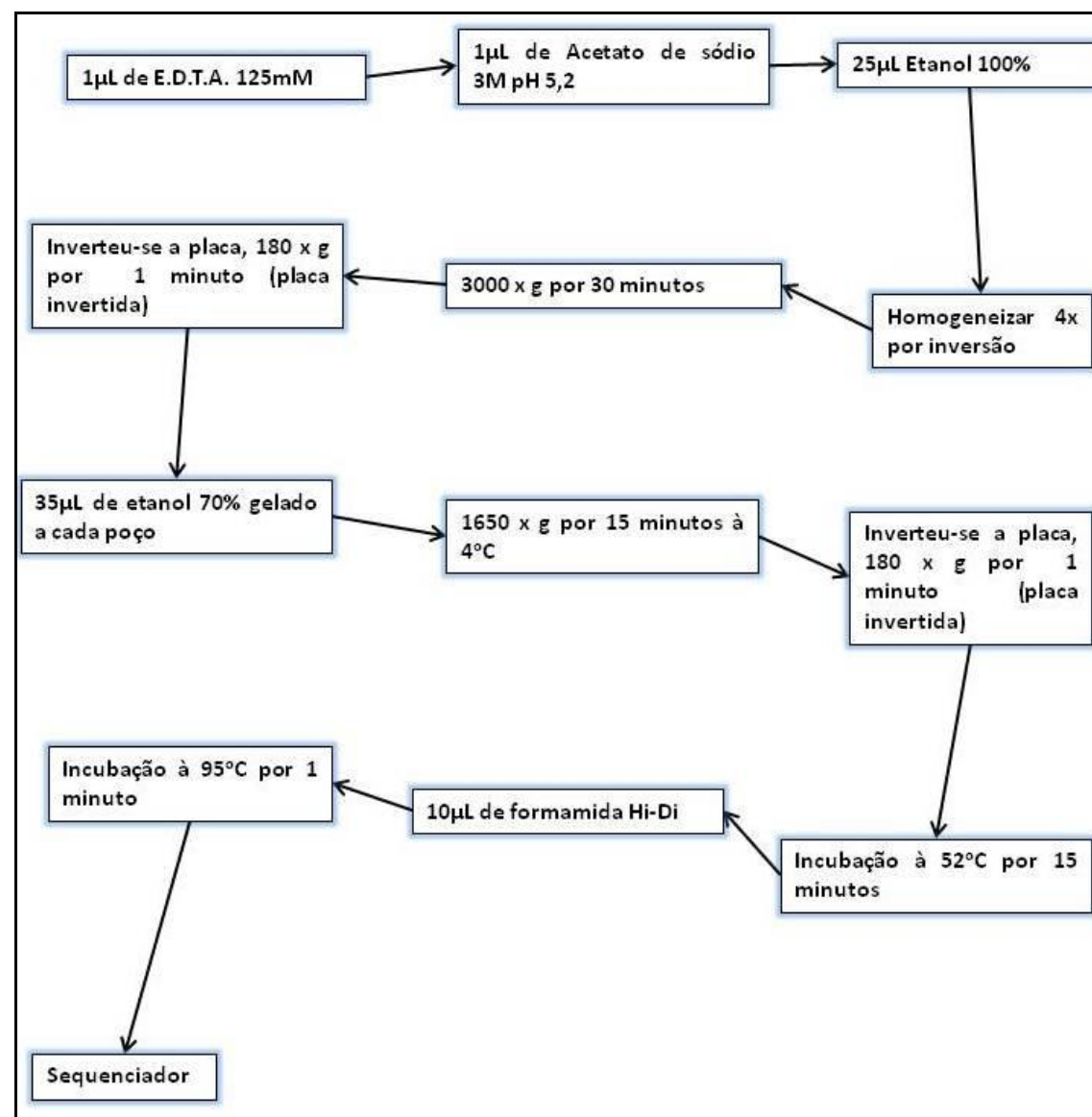


Figura 28 – Procedimento de precipitação/purificação por Etanol/E.D.T.A./Acetato de sódio, após reação de sequenciamento.

FONTE: Adaptado de < http://www.ibt.lt/sc/files/BDTv3.1_Protocol_04337035.pdf >. Acesso 03 de junho, 2010.

Reagente	Concentração	pH
Etanol	100%	~
Etanol gelado	70%	~
E.D.T.A.	125mM	8,0
Acetato de sódio	3M	5,2

Quadro 16 – Concentrações e pH dos reagentes preparados e utilizados na precipitação após reação de sequenciamento.

FONTE: <http://www.ibt.lt/sc/files/BDTv3.1_Protocol_04337035.pdf> . Acesso 03 de junho, 2010.

3.8.5 Análise/interpretação das sequências e construção de estruturas teóricas da proteína TK

A eletroforese capilar foi realizada no aparelho ABI 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems - *Life Technologies*), com conjunto de quatro capilares de 36cm de comprimento (3130/3100-*Avant Genetic Analyzer Capillary Array*, 36cm, #4333464, Applied Biosystems - *Life Technologies*). O polímero utilizado foi o POP-7™ (#4352759 e #4363785, Applied Biosystems - *Life Technologies*) em conjunto com o tampão de corrida para eletroforese capilar 10X (#402824, Applied Biosystems - *Life Technologies*).

A eletroforese foi conduzida sob condições padrão para corrida em capilares de 36 cm (protocolo *rapidseq36*). Quando uma corrida gerou um sinal de baixa intensidade, a mesma foi reinjetada com tempo cinco vezes maior de maneira a minimizar problemas de leitura provavelmente gerados pela pouca quantidade de amostra.

O programa *Data Collection v3.0* (Applied Biosystems - *Life Technologies*) foi utilizado para a coleta de dados de sequenciamento. Posteriormente, foi utilizado o *Sequencing Analysis v5.3.1* (Applied Biosystems - *Life Technologies*) para interpretação dos eletroferogramas, como tamanho, sequência, qualidade etc. Para a montagem dos *contigs* e construção da biblioteca de sequências foi utilizado o *software Seqscape v2.6* (Applied Biosystems - *Life Technologies*). E, por fim, o software livre *online MEGA v4.0* (KUMAR; NEI et al., 2007) para o alinhamento das sequências e tradução.

Os polimorfismos encontrados nas sequências deduzidas da proteína TK das amostras deste estudo foram comparados aos previamente descritos em artigos científicos, publicados em bancos de dados públicos. Além disso, para uma melhor comparação dos dados obtidos, construiu-se um alinhamento frente à sequência do gene *U_L23* da CDS da cepa-referência de

HSV-2 (NCBI/*Reference Sequence*: NC_001798, “HG52”¹²) e às sequências disponíveis no Genbank, entre 2004 e 2008 (oito sequências da África do Sul, uma dos Estados Unidos da América, dezessete do Peru, vinte e quatro da Tanzânia, seis da Zâmbia e nove do Zimbábue).

Para uma análise inicial a respeito do caráter físico-químico das substituições de aminoácidos detectadas, foi realizada uma caracterização da hidrofobicidade com a ferramenta *online* ProtScale (GASTEIGER; HOOGLAND et al., 2005), disponível no servidor ExPASy *Proteomics Server* <<http://expasy.org>>, acesso em 02 de agosto de 2010, utilizando os parâmetros estabelecidos por Kyte; Doolittle, 1982.

A análise e descrição dos polimorfismos encontrados nas sequências deduzidas de TK por este estudo foram comparadas frente aos dados de artigos publicados e às sequências disponíveis em bancos de dados públicos.

A construção de estruturas teóricas da proteína TK (modelos tridimensionais) foi feita através da modelagem por homologia das sequências deduzidas que representaram substituições de aminoácidos aparentemente importantes. Para que isto fosse possível, tais sequências foram submetidas ao servidor *SWISS-MODEL* (disponível em <<http://swissmodel.expasy.org>>, acesso em 02 de agosto de 2010) para que, através de modelagem comparativa, fossem geradas tais estruturas.

As estruturas teóricas tridimensionais destacando os sítios de ligação de ATP e nucleosídeo, bem como as substituições de aminoácidos, foram construídas também com o auxílio do programa VMD v.1.8.7 (disponível em <<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>>).

A qualidade dos modelos gerados pela etapa anterior foi avaliada no Pro-SA *Web* (disponível em <<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>>, acesso em 09 de agosto de 2010).

¹² Nos arquivos do GenBank e na literatura consultada não foi possível confirmar a origem geográfica da “HG52”.

3.9 HISTÓRIA CLÍNICA E VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS E EPIDEMIOLÓGICAS

Ao mesmo tempo em que as amostras utilizadas nesta pesquisa foram escolhidas de forma aleatória dentre as positivas para HSV-2 pertencentes ao “Projeto SUG”, tal seleção foi também “cega”, ou seja, em nenhum momento até que os dados finais das análises das sequências fossem obtidos, procuraram-se informações sobre a história clínica do paciente.

Assim que todos os dados do sequenciamento foram determinados, pesquisou-se a o histórico dos pacientes por meio de análise de prontuários e da “Ficha Clínica de Casos de DST e Testagem Sorológica” (elaborada pela própria Fundação “Alfredo da Matta” e utilizada na rotina de atendimento em DST).

Foram verificadas as variáveis demográficas idade e sexo, e algumas variáveis epidemiológicas, tais como: passado venéreo, sorologia para HIV-1/2, duração dos sintomas, tipo de úlcera (vesiculosa ou não-vesiculosa), solicitação do exame citológico *Tzank*, resultado do *Tzank*, diagnóstico etiológico, quantidade de parceiros fixos, duração dos sintomas, tratamento farmacológico etc.

Para se confrontar as variáveis demográficas com os dados obtidos pela pesquisa de polimorfismos no gene U_L23 , os pacientes foram divididos em dois grupos:

- Grupo I: pacientes, cujas amostras foram submetidas ao sequenciamento nucleotídico do gene U_L23 e que foi verificada uma sequência deduzida de TK diferente da sequência deduzida da cepa-referência “HG52”.

- Grupo II: pacientes, cujas amostras foram submetidas ao sequenciamento nucleotídico do gene U_L23 e que foi verificado uma sequência deduzida de TK idêntica à da cepa-referência “HG52”.

3.10 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados foram apresentados em forma de tabelas e gráficos de frequência, sendo que para as variáveis quantitativas foi calculada a média e o desvio-padrão quando confirmada a hipótese de normalidade e, quando não comprovada esta hipótese, utilizou-se mediana e quartiz. Na comparação das médias foi utilizado o teste T de Student (paramétrico) e o de Mann-Whitney (não-paramétrico). Na análise de associação das variáveis categóricas foi utilizado o Teste exato de Fisher.

Para análise descritiva foram utilizadas, quando conveniente, tabelas, figuras e gráficos (VIEIRA, 2004).

4. RESULTADOS

4.1 DESENHO DE INICIADORES E PADRONIZAÇÃO DA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE U_L23

Amplicons únicos de tamanho compatível com 1294pb e com boa resolução foram visualizados e não houve amplificação do gene U_L23 do HSV-1, conforme Figura 29.

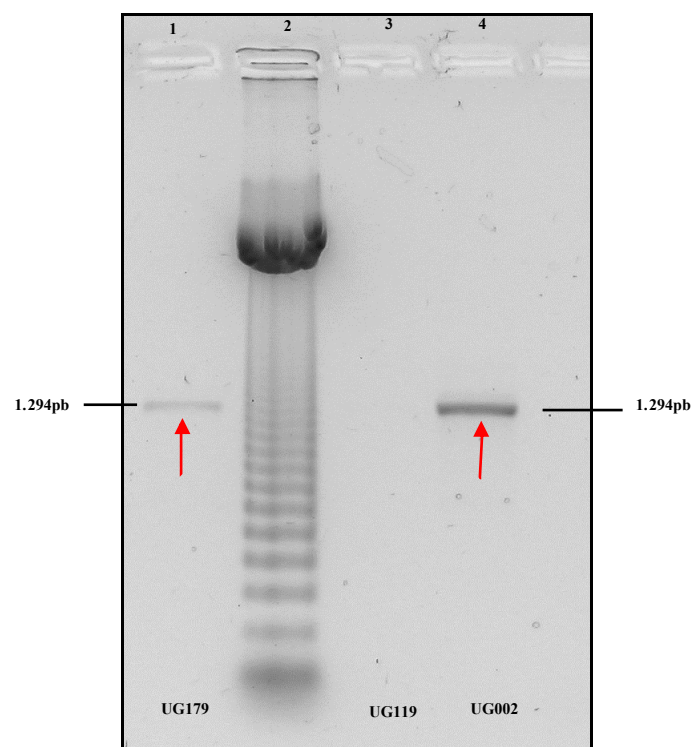


Figura 29 – *Amplicon* de 1294pb (setas vermelhas) correspondente à amplificação do gene U_L23 do HSV-2, utilizando-se os iniciadores TKS e TKAS.

Nota: poço 1- amostra UG179 HSV-2 positiva ([DNA]=63,9ng/μL e 260/280 = 1,67), poço 3- amostra UG119 HSV-1 ([DNA]=120,2/μL e 260/280 = 1,77) positiva e poço 3 – amostra UG002 HSV-2 positiva ([DNA]=123,9ng/μL e 260/280 = 1,78). Padrão de peso molecular de 123pb no poço 2 (123bp DNA Ladder 250μg, Invitrogen - *Life Technologies*TM SKU#15613-029); gel de agarose a 1%, corrida à 80V, aproximadamente 65mA por 1h.

4.2 SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO DO GENE U_L23 E DEDUÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE TK

4.2.1 PCR para amplificação do gene U_L23

Das 80 amostras com DNA extraído, provenientes de participantes do “Projeto SUG” e positivas para HSV-2 na PCR multiplex/*Hae*III escolhidas de forma aleatória, obteve-se amplificação da sequência-alvo (1294pb) em 67 (83,75%).

4.2.2 Sequenciamento nucleotídico do gene U_L23, montagem e análise das sequências deduzidas de TK

Todas as 67 amostras amplificadas por PCR foram submetidas ao sequenciamento nucleotídico (no sentido senso e antissenso) com sucesso, gerando sequências completas do alvo pesquisado, tendo-se como base a sequência da CDS do gene U_L23 da cepa-padrão para HSV-2, “HG52” (NCBI *Reference Sequence*: NC_001798).

Das 67 sequências, 45 apresentaram 100% de similaridade com a cepa-padrão “HG52”: Br003AM, Br005AM, Br015AM, Br055AM, Br068AM, Br082AM, Br109AM, Br146AM, Br149AM, Br163AM, Br178AM, Br191AM, Br255AM, Br279AM, Br293AM, Br314AM, Br324AM, Br325AM, Br330AM, Br336AM, Br337AM, Br338AM, Br342AM, Br348AM, Br351AM, Br352AM, Br354AM, Br358AM, Br361AM, Br363AM, Br366AM, Br368AM, Br371AM, Br379AM, Br380AM, Br382AM, Br401AM, Br405AM, Br407AM, Br410AM, Br411AM, Br417AM, Br424AM, Br433AM, Br434AM.

Dentre o total de sequências obtidas, 22 delas (32,83%) apresentaram pelo menos uma mutação (substituição de nt) quando comparadas à “HG52” e, destas, 19 (86,36%) possuíram substituição de aminoácido (substituição de aa) (Tabela 1).

	Posição da Substituição (nucleotídeo)																
	10	69	116	150	168	209	232	420	435	565	573	734	812	895	1013	1062	1097
HG52*	C	C	G	G	A	T	A	G	G	T	C	A	C	C	G	A	C
Br340AM	T	A	G	G	A	T	A	G	G	T	C	A	C	C	G	A	C
Br060AM	C	C	A	G	A	T	G	G	A	T	C	G	C	C	G	A	C
Br080AM	C	C	A	G	A	T	G	G	G	T	C	A	A	C	G	A	C
Br112AM	C	C	A	G	A	T	G	T	G	T	C	A	C	C	G	A	C
Br218AM	C	C	A	G	A	G	G	G	G	T	C	A	C	C	G	A	C
Br322AM	C	C	A	G	C	T	A	G	G	T	C	A	C	C	G	A	C
Br262AM	C	C	G	G	A	T	G	G	G	C	C	A	C	C	G	A	T
Br065AM	C	C	G	G	A	T	A	G	G	T	T	A	C	C	A	A	C
Br070AM	C	C	A	G	A	T	A	G	G	T	C	A	C	C	G	A	C
Br180AM	C	C	A	G	A	T	A	G	G	T	C	A	C	C	G	A	C
Br181AM	C	C	A	G	A	T	A	G	G	T	C	A	C	C	G	A	C
Br185AM	C	C	A	G	A	T	A	G	G	T	C	A	C	C	G	A	C
Br190AM	C	C	A	G	A	T	A	G	G	T	C	A	C	C	G	A	C
Br196AM	C	C	A	G	A	T	A	G	G	T	C	A	C	C	G	A	C
Br329AM	C	C	A	G	A	T	A	G	G	T	C	A	C	C	G	A	C
Br346AM	C	C	A	G	A	T	A	G	G	T	C	A	C	C	G	A	C
Br347AM	C	C	A	G	A	T	A	G	G	T	C	A	C	C	G	A	C
Br367AM	C	C	A	G	A	T	A	G	G	T	C	A	C	C	G	A	C
Br381AM	C	C	A	G	A	T	A	G	G	T	C	A	C	C	G	A	C
Br264AM	C	C	G	A	A	T	A	G	G	T	C	A	C	C	G	A	C
Br385AM	C	C	A	G	A	T	A	G	G	T	C	A	C	T	G	A	C
Br144AM	C	C	A	G	A	T	A	G	G	T	C	A	C	C	G	G	C
Códons																	
HG52*	cac	acc	gga	ctg	gga	atg	aat	tig	ggg	ttg	ttc	aac	ccg	ctg	cga	aca	gcg
Br340AM	tac	aca	gga	ctg	gga	atg	aat	tig	ggg	ttg	ttc	aac	ccg	ctg	cga	aca	gcg
Br060AM	cac	acc	gaa	ctg	gga	atg	gat	tig	ggg	ttg	ttc	agc	ccg	ctg	cga	aca	gcg
Br080AM	cac	acc	gaa	ctg	gga	atg	gat	tig	ggg	ttg	ttc	aac	cag	ctg	cga	aca	gcg
Br112AM	cac	acc	gaa	ctg	gga	atg	gat	ttt	ggg	ttg	ttc	aac	ccg	ctg	cga	aca	gcg
Br218AM	cac	acc	gaa	ctg	gga	agg	gat	tig	ggg	ttg	ttc	aac	ccg	ctg	cga	aca	gcg
Br322AM	cac	acc	gaa	ctg	ggc	atg	aat	tig	ggg	ttg	ttc	aac	ccg	ctg	cga	aca	gcg
Br262AM	cac	acc	gga	ctg	gga	atg	gat	tig	ggg	ctg	ttc	aac	ccg	ctg	cga	aca	gtg
Br065AM	cac	acc	gga	ctg	gga	atg	aat	tig	ggg	ttg	ttt	aac	ccg	ctg	caa	aca	gcg
Br070AM	cac	acc	gaa	ctg	gga	atg	aat	tig	ggg	ttg	ttc	aac	ccg	ctg	cga	aca	gcg
Br180AM	cac	acc	gaa	ctg	gga	atg	aat	tig	ggg	ttg	ttc	aac	ccg	ctg	cga	aca	gcg
Br181AM	cac	acc	gaa	ctg	gga	atg	aat	tig	ggg	ttg	ttc	aac	ccg	ctg	cga	aca	gcg
Br185AM	cac	acc	gaa	ctg	gga	atg	aat	tig	ggg	ttg	ttc	aac	ccg	ctg	cga	aca	gcg
Br190AM	cac	acc	gaa	ctg	gga	atg	aat	tig	ggg	ttg	ttc	aac	ccg	ctg	cga	aca	gcg
Br196AM	cac	acc	gaa	ctg	gga	atg	aat	tig	ggg	ttg	ttc	aac	ccg	ctg	cga	aca	gcg
Br329AM	cac	acc	gaa	ctg	gga	atg	aat	tig	ggg	ttg	ttc	aac	ccg	ctg	cga	aca	gcg
Br346AM	cac	acc	gaa	ctg	gga	atg	aat	tig	ggg	ttg	ttc	aac	ccg	ctg	cga	aca	gcg
Br347AM	cac	acc	gaa	ctg	gga	atg	aat	tig	ggg	ttg	ttc	aac	ccg	ctg	cga	aca	gcg
Br367AM	cac	acc	gaa	ctg	gga	atg	aat	tig	ggg	ttg	ttc	aac	ccg	ctg	cga	aca	gcg
Br381AM	cac	acc	gaa	ctg	gga	atg	aat	tig	ggg	ttg	ttc	aac	ccg	ctg	cga	aca	gcg
Br264AM	cac	acc	gga	cta	gga	atg	aat	tig	ggg	ttg	ttc	aac	ccg	ctg	cga	aca	gcg
Br385AM	cac	acc	gga	ctg	gga	atg	aat	tig	ggg	ttg	ttc	aac	ccg	ttg	cga	aca	gcg
Br144AM	cac	acc	gga	ctg	gga	atg	aat	tig	ggg	ttg	ttc	aac	ccg	ctg	cga	acg	gcg
Posição da substituição (aminoácido)																	
	4	23	39	50	56	70	78	140	145	189	191	245	271	299	338	354	366
HG52*	His	Thr	Gly	Leu	Gly	Met	Asn	Leu	Gly	Leu	Phe	Asn	Pro	Leu	Arg	Thr	Ala
Br340AM	Tyr	Thr	Gly	Leu	Gly	Met	Asn	Leu	Gly	Leu	Phe	Asn	Pro	Leu	Arg	Thr	Ala
Br060AM	His	Thr	Glu	Leu	Gly	Met	Asp	Leu	Gly	Leu	Phe	Ser	Pro	Leu	Arg	Thr	Ala
Br080AM	His	Thr	Glu	Leu	Gly	Met	Asp	Leu	Gly	Leu	Phe	Asn	Gln	Leu	Arg	Thr	Ala
Br112AM	His	Thr	Glu	Leu	Gly	Met	Asp	Phe	Gly	Leu	Phe	Asn	Pro	Leu	Arg	Thr	Ala
Br218AM	His	Thr	Glu	Leu	Gly	Arg	Asp	Leu	Gly	Leu	Phe	Asn	Pro	Leu	Arg	Thr	Ala
Br322AM	His	Thr	Glu	Leu	Gly	Met	Asn	Leu	Gly	Leu	Phe	Asn	Pro	Leu	Arg	Thr	Ala
Br262AM	His	Thr	Gly	Leu	Gly	Met	Asp	Leu	Gly	Leu	Phe	Asn	Pro	Leu	Arg	Thr	Val
Br065AM	His	Thr	Gly	Leu	Gly	Met	Asn	Leu	Gly	Leu	Phe	Asn	Pro	Leu	Gln	Thr	Ala
Br070AM	His	Thr	Glu	Leu	Gly	Met	Asn	Leu	Gly	Leu	Phe	Asn	Pro	Leu	Arg	Thr	Ala

Continuação...

Br180AM	His	Thr	Glu	Leu	Gly	Met	Asn	Leu	Gly	Leu	Phe	Asn	Pro	Leu	Arg	Thr	Ala
Br181AM	His	Thr	Glu	Leu	Gly	Met	Asn	Leu	Gly	Leu	Phe	Asn	Pro	Leu	Arg	Thr	Ala
Br185AM	His	Thr	Glu	Leu	Gly	Met	Asn	Leu	Gly	Leu	Phe	Asn	Pro	Leu	Arg	Thr	Ala
Br190AM	His	Thr	Glu	Leu	Gly	Met	Asn	Leu	Gly	Leu	Phe	Asn	Pro	Leu	Arg	Thr	Ala
Br196AM	His	Thr	Glu	Leu	Gly	Met	Asn	Leu	Gly	Leu	Phe	Asn	Pro	Leu	Arg	Thr	Ala
Br329AM	His	Thr	Glu	Leu	Gly	Met	Asn	Leu	Gly	Leu	Phe	Asn	Pro	Leu	Arg	Thr	Ala
Br346AM	His	Thr	Glu	Leu	Gly	Met	Asn	Leu	Gly	Leu	Phe	Asn	Pro	Leu	Arg	Thr	Ala
Br347AM	His	Thr	Glu	Leu	Gly	Met	Asn	Leu	Gly	Leu	Phe	Asn	Pro	Leu	Arg	Thr	Ala
Br367AM	His	Thr	Glu	Leu	Gly	Met	Asn	Leu	Gly	Leu	Phe	Asn	Pro	Leu	Arg	Thr	Ala
Br381AM	His	Thr	Glu	Leu	Gly	Met	Asn	Leu	Gly	Leu	Phe	Asn	Pro	Leu	Arg	Thr	Ala
Br264AM	His	Thr	Gly	Leu	Gly	Met	Asn	Leu	Gly	Leu	Phe	Asn	Pro	Leu	Arg	Thr	Ala
Br385AM	His	Thr	Gly	Leu	Gly	Met	Asn	Leu	Gly	Leu	Phe	Asn	Pro	Leu	Arg	Thr	Ala
Br144AM	His	Thr	Gly	Leu	Gly	Met	Asn	Leu	Gly	Leu	Phe	Asn	Pro	Leu	Arg	Thr	Ala

Tabela 1 – Amostras e suas diferenças nas sequências nucleotídica, nos códons correspondentes e na sequência deduzida de aminoácidos em relação à cepa-padrão do HSV-2 “HG52” (NCBI *Reference Sequence*: NC_001798).

Nota: em negrito – nucleotídeos diferentes em cada códon. Aminoácidos diferentes foram coloridos de acordo com suas características (HALL, 1999).

Foram detectadas 17 substituições de nt distintas nesta pesquisa e, dessas, nove (52,94%) resultaram em substituição de aa (His4Tyr, Gly39Glu, Asn78Asp, Asn245Ser, Pro271Gln, Leu140Phe, Met70Arg, Ala366Val e Arg338Gln), alterando a sequência deduzida de 22 amostras testadas.

As seguintes amostras deste estudo apresentaram mutações silenciosas: Br340AM (C69A), Br060AM (C435A), Br322AM (A168C), Br262AM (T565C) e Br065AM (C573T). Das 17 substituições de nt, quatro (23,53%) foram em 1ª posição do códon, seis (35,29%) em 2ª posição e sete (41,18%) em 3ª posição; além disso, cinco (29,41%) das 17 substituições de nt foram transversões: duas C → A, uma A → C, uma T → G e uma G → T. Das cinco transversões encontradas, três (T209G, G420T e C812A) geraram substituição de aa (Tabela 2).

Amostra	Substituição de Nucleotídeo	Tipo	Códon	Posição no códon	Substituição de aminoácido
Br340AM	C10T	Transição	4	1ª	His4YTyr
	C69A	Transversão	23	3ª	Silenciosa
Br60AM	G116A	Transição	39	2ª	Gly39Glu
	A232G	Transição	78	1ª	Asn78Asp
	G435A	Transição	145	3ª	Silenciosa
	A734G	Transição	245	2ª	Asn245Ser
Br80AM	G116A	Transição	39	2ª	Gly39Glu
	A232G	Transição	78	1ª	Asn78Asp
	C812A	Transversão	271	2ª	Pro271Gln
Br112AM	G116A	Transição	39	2ª	Gly39Glu
	A232G	Transição	78	1ª	Asn78Asp
	G420T	Transversão	140	3ª	Leu140Phe
Br218AM	G116A	Transição	39	2ª	Gly39Glu
	T209G	Transversão	70	2ª	Met70Arg
	A232G	Transição	78	1ª	Asn78Asp
Br322AM	G116A	Transição	39	2ª	Gly39Glu
	A168C	Transversão	56	3ª	Silenciosa
Br262AM	A232G	Transição	78	1ª	Asn78Asp
	T565C	Transição	189	1ª	Silenciosa
	C1097T	Transição	366	2ª	Ala366Val
Br65AM	C573T	Transição	191	3ª	Silenciosa
	G1013A	Transição	338	2ª	Arg338Gln
Br70AM	G116A	Transição	39	2ª	Gly39Glu
Br180AM	G116A	Transição	39	2ª	Gly39Glu
Br181AM	G116A	Transição	39	2ª	Gly39Glu
Br185AM	G116A	Transição	39	2ª	Gly39Glu
Br190AM	G116A	Transição	39	2ª	Gly39Glu
Br196AM	G116A	Transição	39	2ª	Gly39Glu
Br329AM	G116A	Transição	39	2ª	Gly39Glu
Br346AM	G116A	Transição	39	2ª	Gly39Glu
Br347AM	G116A	Transição	39	2ª	Gly39Glu
Br367AM	G116A	Transição	39	2ª	Gly39Glu
Br381AM	G116A	Transição	39	2ª	Gly39Glu
Br264AM	G150A	Transição	50	3ª	Silenciosa
Br385AM	C895T	Transição	299	1ª	Silenciosa
Br144AM	A1062G	Transição	354	3ª	Silenciosa

Tabela 2 – Mutações de substituição encontradas em 22 sequências nucleotídicas do gene U_L23 (proteína TK) do HSV-2 em DNA extraído de amostras de úlceras genitais, quando comparadas à sequência nucleotídica do mesmo gene na cepa-padrão “HG52” (NCBI Reference Sequence: NC_001798).

4.2.3 Análise do caráter físico-químico das substituições de aminoácidos detectadas nas sequências deduzidas de TK

Das nove substituições de aa distintas, uma (Met70Arg) culminou em mudança simultânea de hidrofobicidade e de carga do aminoácido; quatro (His4Tyr, Gly39Glu, Asn78Asp e Arg338Gln) levaram apenas à alteração de carga; uma apenas à mudança de hidrofobicidade (Pro271Gln) e as outras três restantes (Leu140Phe, Asn245Ser e Ala366Val) não resultaram em mudança de classe química (Tabela 3).

Mutação	Característica Físico-química	Observação	Amostras
Met70Arg	Apolar -> Polar básico	Alteração de carga e hidrofobicidade	Br218 AM
His4Tyr	Polar básico -> Polar neutro	Alteração de carga	Br340 AM
Gly39Glu	Polar neutro -> Polar ácido	Alteração de carga	Br060 AM, Br070 AM, Br080 AM, Br112 AM, Br180 AM, Br181 AM, Br185 AM, Br190 AM, Br196 AM, Br218 AM, Br322 AM, Br329 AM, Br346 AM, Br347 AM, Br367 AM, Br381 AM
Asn78Asp	Polar neutro -> Polar ácido	Alteração de carga	Br060 AM, Br080 AM, Br112 AM, Br218 AM, Br262 AM
Arg338Gln	Polar básico -> Polar neutro	Alteração de carga	Br065 AM
Pro271Gln	Apolar -> Polar neutro	Alteração de hidrofobicidade	Br080 AM
Leu140Phe	Apolar -> Apolar	NA	Br112 AM
Asn245Ser	Polar neutro -> Polar neutro	NA	Br060 AM
Ala366Val	Apolar -> Apolar	NA	Br262 AM

Tabela 3 – Mutações e consequentes mudanças no caráter físico-químico dos aminoácidos comparando-se as sequências deduzidas de TK das amostras com a da cepa-padrão do HSV-2 “HG52” (NCBI Reference Sequence: NC_001798).

Nota: NA – não aplicável.

Utilizando-se a ferramenta *online* ProtScale (GASTEIGER; HOOGLAND et al., 2005) no servidor ExPASy Proteomics Server <http://expasy.org/> (parâmetros estabelecidos

por Kyte; Doolittle, 1982), foi possível constatar ligeiras mudanças no grau de hidrofobicidade das oito¹ sequências testadas frente à cepa-padrão (Gráfico 1).

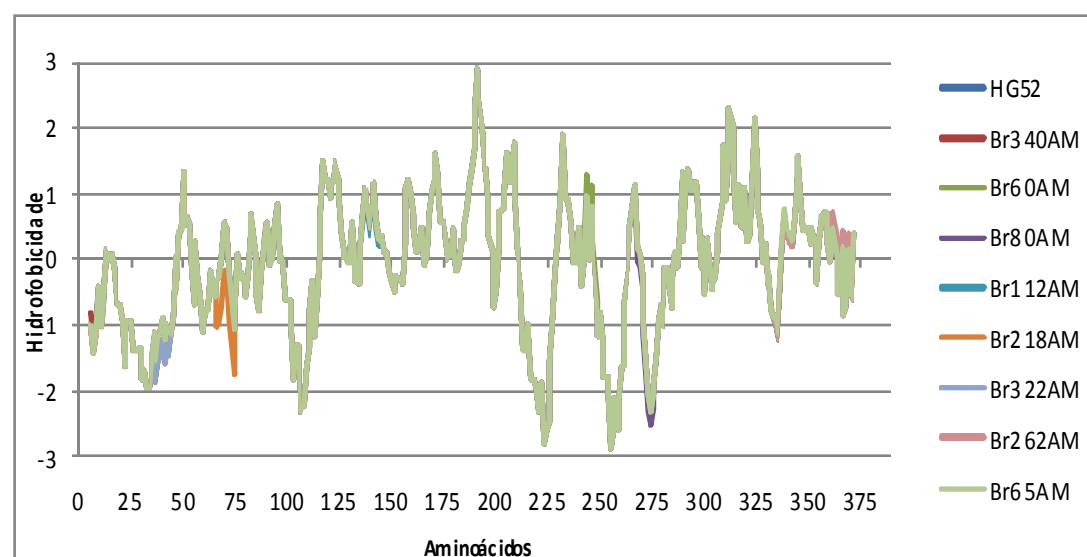


Gráfico 1 – Hidrofobicidade da sequência deduzida da TK de oito amostras em comparação com a sequência deduzida da cepa-padrão de HSV-2 “HG52”, representando as nove substituições de aa.

Nota: As alterações de hidrofobicidade estão destacadas por cores diferentes de acordo com a legenda. Análise de hidrofobicidade com a ferramenta ProtScale (GASTEIGER; HOOGLAND et al., 2005) no servidor ExPASy Proteomics Server <<http://expasy.org/>>, utilizando os parâmetros estabelecidos por KYTE; DOOLITTLE, 1982).

4.2.4 Análise e descrição dos polimorfismos detectados nas sequências deduzidas de TK frente a dados previamente publicados em artigos

As substituições de aa encontradas nas amostras deste estudo foram todas em sítios não conservados da TK do HSV-2 (Figura 30) e não foram encontrados polimorfismos ou mutações por inserções ou deleções nas regiões homopoliméricas G ou C do gene da TK.

¹ É importante salientar que a amostra Br322AM representa as outras amostras que tiveram Gly39Glu como única mutação (Br70AM, Br180AM, Br181AM, Br185AM, Br190AM, Br196AM, Br329AM, Br346AM, Br347AM, Br367AM e Br381AM).

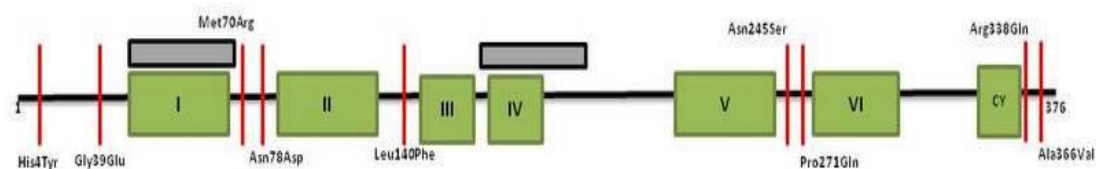


Figura 30 – Representação esquemática das nove substituições de aminoácidos detectadas pelo estudo de 67 amostras submetidas ao sequenciamento nucleotídico para a região codificante (CDS) do gene U_L23 do HSV-2, frente aos sítios conservados e não conservados da TK.

Nota: 1- aa 1 da TK, 376 – aa 376 da TK, em retângulos verdes – sítios conservados da TK, modificados de Balasubramaniam; Veerisetty et al., 1990 (I-aa56-62, II-aa83-89, III-aa163-165, IV-aa172-174, V-aa217-223, VI-aa285-290 e aa cisteína), retângulos cinzas – sítio de ligação de ATP (aa56-63) e sítio de ligação de nucleosídeo (aa169-177), respectivamente e as barras vermelhas – substituições de aa detectadas por este estudo.

Não foram detectadas mutações sugestivas de resistência genotípica do HSV-2 ao aciclovir, quando comparados os dados desta pesquisa com os publicados por diversos trabalhos entre 1996 e 2010. Foram detectadas duas substituições de aa já descritas na literatura como resultados de polimorfismos do gene U_L23, mas que não foram associadas à resistência ao aciclovir: Asn78Asp e a Leu140Phe (BESTMAN-SMITH; SCHMIT et al., 2001).

Quatro substituições de aa, ainda não descritas em literatura, foram detectadas por este estudo (Tabela 4).

A mutação Gly39Glu foi a de maior frequência, aparecendo em 16 amostras (Br060AM, Br070AM, Br080AM, Br112AM, Br180AM, Br181AM, Br185AM, Br190AM, Br196AM, Br218AM, Br322AM, Br329AM, Br346AM, Br347AM, Br367AM e Br381AM), seguida pela Asn78Asp em cinco amostras (Br060AM, Br080AM, Br112AM, Br218AM e Br262AM). as amostras Br060AM, Br080AM, Br112AM e Br218AM apresentaram as mutações Gly39Glu e Asn78Asp simultaneamente.

Substituição de aminoácido	Substituição de Nucleotídeo	Amostra
His4Tyr	C10T	Br340AM
Asn245Ser	A734G	Br60AM
Met70Arg	T209G	Br218AM
Ala366Val	C1097T	Br262AM

Tabela 4 – Substituições de aminoácidos em algumas sequências deduzidas da TK do HSV-2 detectadas por este estudo e ainda não descritas na literatura.

4.2.5 Análise das sequências deduzidas de TK frente às sequências disponíveis em bancos de dados públicos

Ao se analisar o alinhamento das sequências deduzidas de TK deste estudo frente à sequência da cepa-referência “HG52” e a todas as 66 sequências completas, corrigidas e classificadas corretamente, disponíveis no Genbank, observou-se a existência de 23 sítios variáveis localizados nas posições 4 (His/Tyr); 18 (Arg/Cys); 27 (Ala/Thr); 29 (Ser/Ala); 39 (Gly/Glu); 67 (Ala/Thr); 70 (Met/Arg); 78 (Asn/Asp); 86 (Met/Leu); 96 (Glu/Lys); 103 (Asn/Asp); 140 (Leu/Phe); 150 (Gly/Asp); 159 (Thr/Ile); 215 (Ala/Thr); 228 (Leu/Ile); 245 (Asn/Ser); 271 (Pro/Thr ou Gln); 281 (Ser/Cys); 338 (Arg/Gln); 347 (Gly/Arg); 355 (Thr/Ala); e 366 (Ala/Val),

As mutações: Gly39Glu com 74 substituições em 133 sequências (8/8 África do Sul; 1/1 dos EUA; 14/17 do Peru; 23/24 da Tanzânia; 6/6 de Zâmbia e 6/9 do Zimbábue, além das 16 descritas nesta dissertação), Asn78Asp com 33 substituições em 133 sequências (4/8 África do Sul; 1/1 dos EUA; 7/17 do Peru; 11/24 da Tanzânia; 3/6 de Zâmbia e 2/9 do Zimbábue, além das cinco descritas nessa dissertação) e Leu140Phe com 11 substituições em 133 sequências (1/8 África do Sul; 1/1 dos EUA; 3/17 do Peru; 4/24 da Tanzânia; 1/6 de Zâmbia e nenhuma no Zimbábue, além de uma descrita nessa dissertação – Br112AM) foram aquelas de maior frequência. Em paralelo, confirmou-se mais uma vez que as substituições

descritas na Tabela 4 só foram, de fato, encontradas nas amostras sequenciadas no presente estudo.

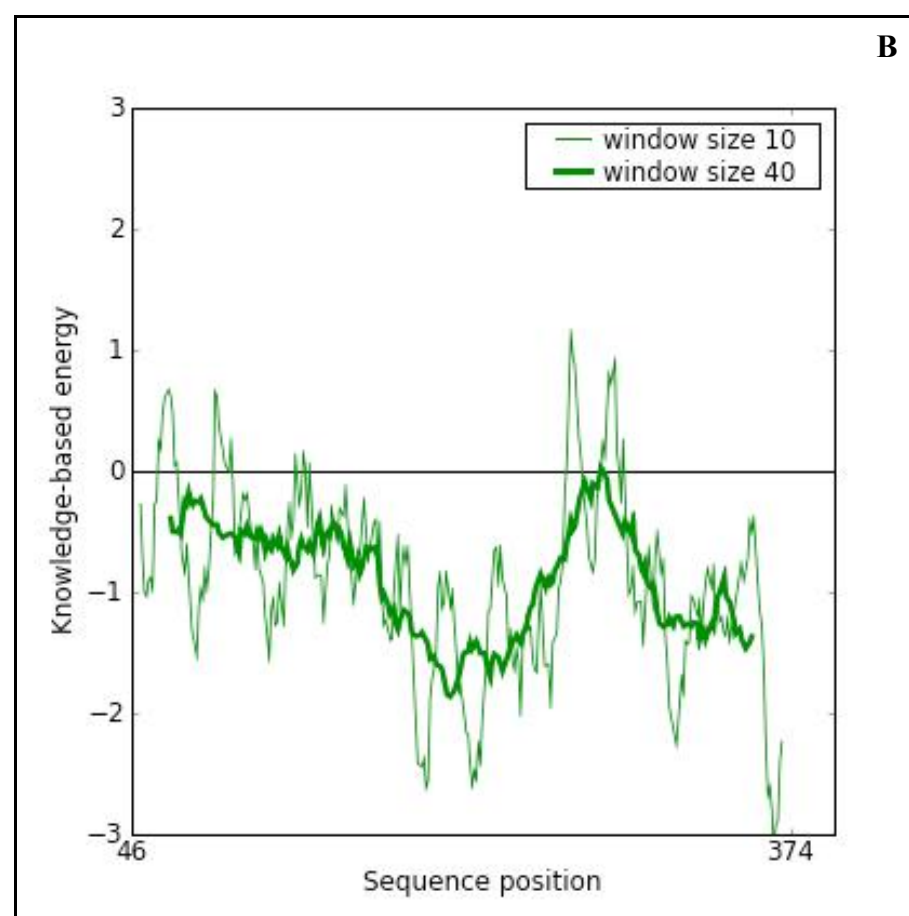
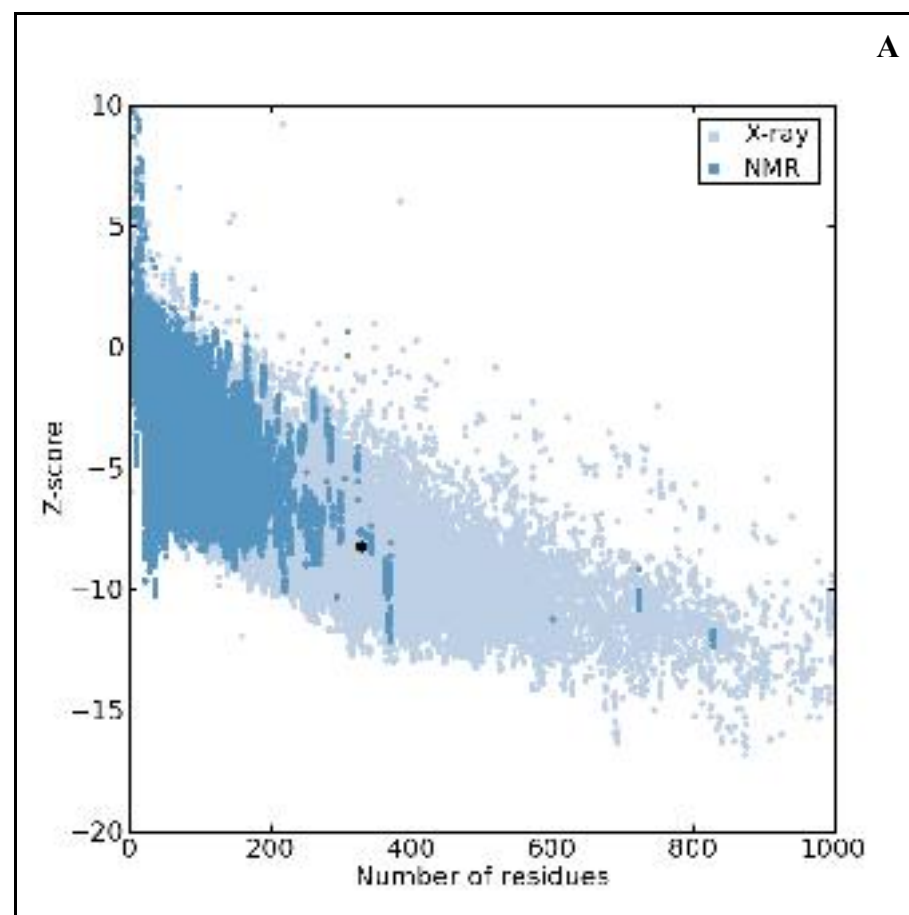
A divergência entre as sequências de nt analisadas para cada grupo geográfico (África do Sul = 0,25%; Brasil = 0,08%; Peru = 0,24%; Tanzânia = 0,20%; Zâmbia = 0,17% e Zimbábue 0,19%) mostrou uma maior similaridade entre as amostras brasileiras, o que possivelmente reflete o fato das amostras terem sido isoladas na mesma cidade em um período inferior a dois anos.

4.2.6 Construção de estruturas teóricas da proteína TK através de modelagem por homologia

Ao se submeter as sequências deduzidas das amostras que mostraram alterações, consideradas por nós, mais importantes (Br060AM, Br065AM, Br080AM, Br112AM, Br218AM e Br262AM), juntamente com a da cepa-referência “HG52” ao servidor SWISS-MODEL, foram obtidos valores de identidade entre 76,9% (Br065AM) e 77,5% (por exemplo, Br080AM e Br218AM).

A qualidade dos modelos avaliada no servidor Pro-SA *Web* gerou primeiramente dois gráficos: um de avaliação global pelo *score-Z* e um de energia, Figuras 31A e 31B, respectivamente. Um terceiro gráfico (Figura 31C) gerado pelo mesmo servidor destacou em vermelho as regiões com valores positivos de energia (desfavoráveis).

De acordo com os modelos teóricos gerados (Figura 32), verifica-se que as substituições de aa foram todas fora dos sítios ativos da TK, e a maioria distante espacialmente desses locais.



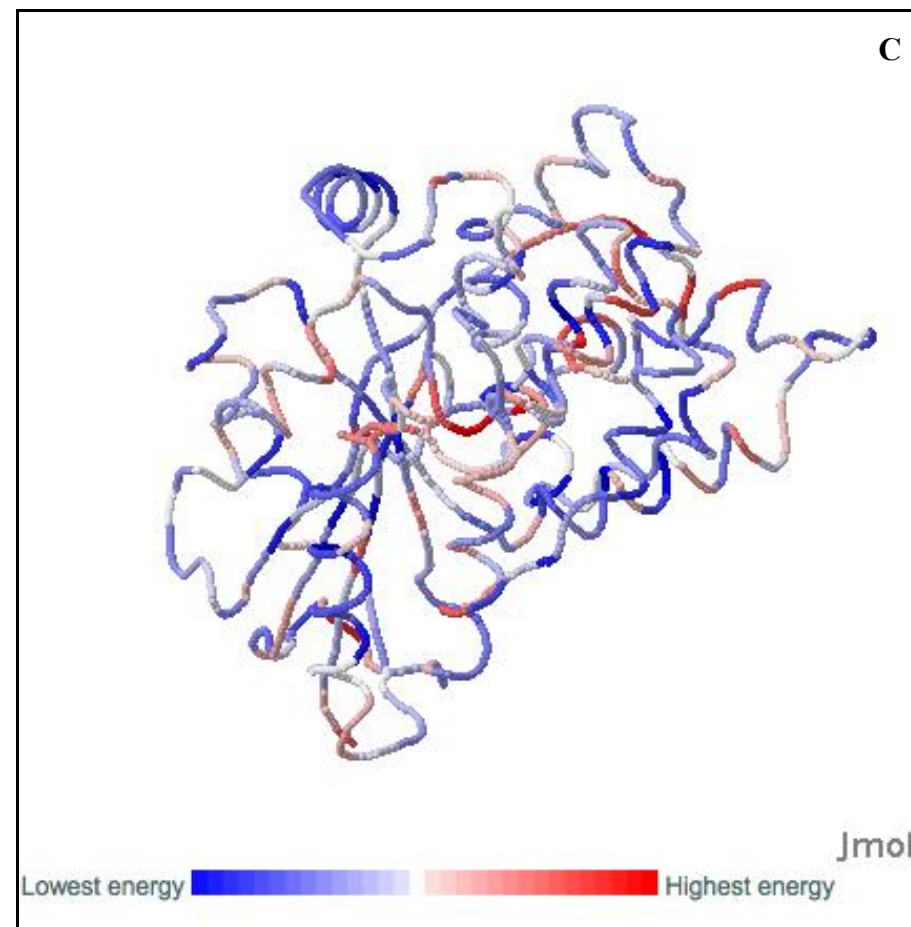
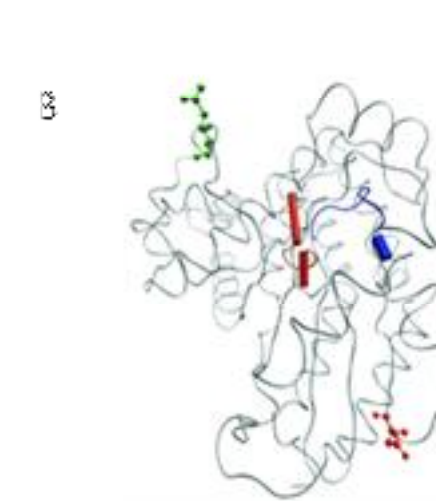
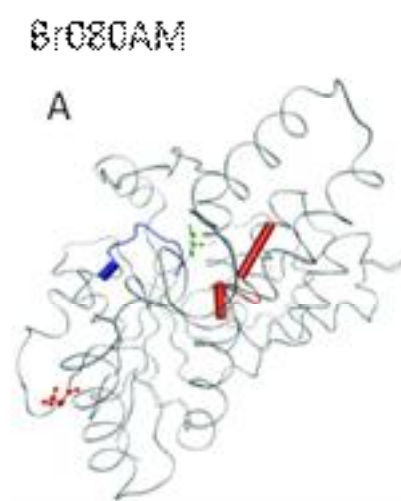
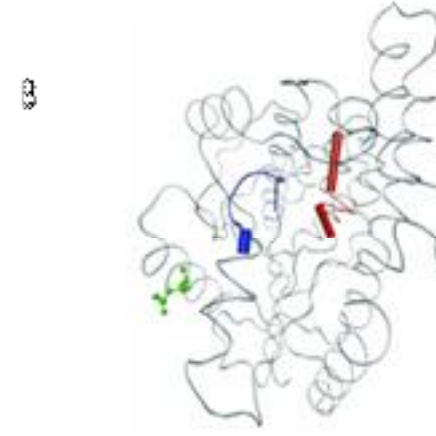
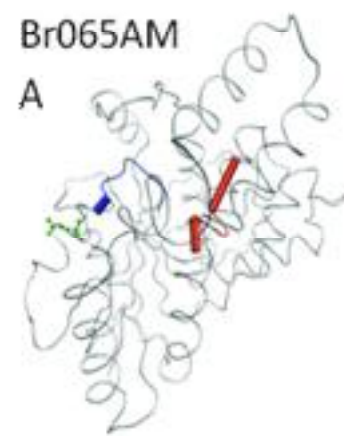
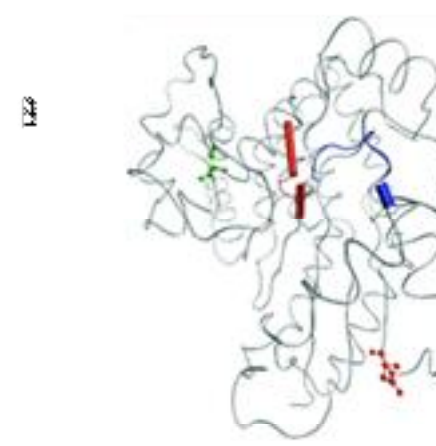
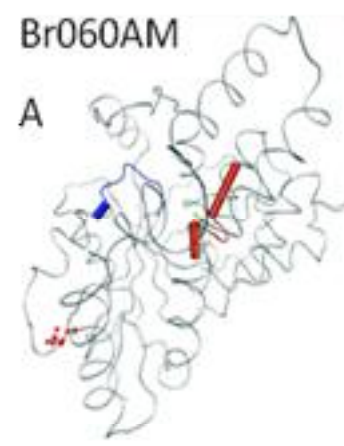


Figura 31 – Avaliação do modelo teórico para TK da cepa-padrão “HG52”, construído através de modelação por homologia.

Nota: Todas as análises acima foram realizadas no servidor Pro-SA *Web*. A- Comparação do *score-Z* frente às proteínas com tamanho similar no PDB (disponível em < >. Acesso em 09 de agosto de 2010). B- Gráfico de energia local (valores negativos assinalam posições favoráveis). C- Estrutura tridimensional da cepa-padrão “HG52”, com escala de energia. FONTE: Pro-SA *Web* (disponível em < <https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>>. Acesso em 09 de agosto de 2010).



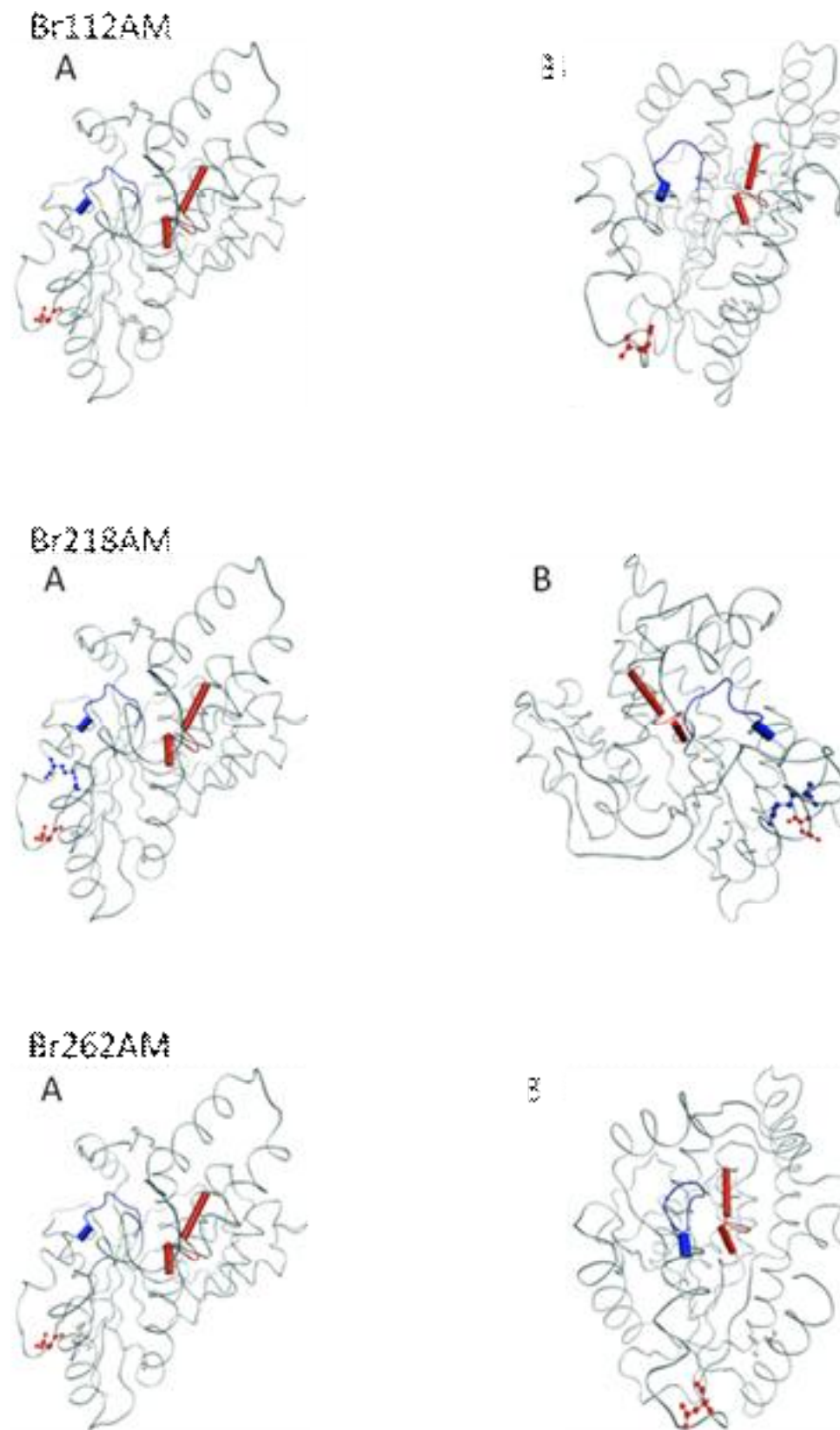


Figura 32 – Estruturas teóricas para proteína TK das amostras Br060AM, Br065AM, Br080AM, Br112AM, Br218AM e Br262AM, construídas através de modelagem por homologia.

Nota: Todos os modelos estão representados por sobreposição das estruturas da cepa-padrão “HG52” e a amostra cujo nome é apresentado. As substituições de aa estão representadas no modelo “CPK”, sendo a cor de cada aminoácido representativa ao tipo do mesmo. A- Vista frontal; B- Vista lateral otimizada para visualizar a posição das substituições de aminoácidos em

relação aos sítios de ligação de ATP (modelo de representação: *ribbons* em cor azul) e nucleosídeo (modelo de representação: *ribbons* em cor vermelha). As representações foram criadas com o auxílio do programa VMD v.1.8.7 (disponível em <<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>>. Acesso em 09 de agosto de 2010)
 FONTE: HUMPHREY; DALKE et al., 1996.

4.2.7 História clínica dos pacientes

As frequências entre os grupos de pacientes (I e II), descritos na metodologia, estão na Tabela 5.

Grupo	<i>fi</i>	%
I	19	28,4
II	48	71,6

Tabela 5 – Frequência de amostras que foram submetidas ao sequenciamento nucleotídico do gene U_123 , cuja sequência deduzida de TK é diferente da cepa-padrão “HG52” – Grupo I.
 Nota: IC=95%

A respeito dos dados demográficos relativos aos pacientes, cujas amostras foram selecionadas para este estudo, verificou-se que não houve relação entre as variáveis sexo e idade *versus* os grupos I e II, conforme Tabela 6.

Variáveis	Grupo I		Grupo II		
	<i>Fi</i>	%	<i>fi</i>	%	
<i>Sexo</i>					
Feminino	14	73,7	38	79,2	p= 0,426*
Masculino	5	26,3	10	20,8	
<i>Idade</i>	27,63 +/- 9,75		28,19 +/- 10,89		p= 0,847**

Tabela 6 – Relação entre as variáveis sexo e idade e grupos I e II.
 Nota: * Teste exato de Fisher; ** Teste T de Student.

Por meio da análise das fichas clínicas de casos de DST da Fundação “Alfredo da Matta”, constatou-se que 100% dos pacientes possuíam sorologia negativa para HIV 1/2. De

acordo com essas fichas, todos os pacientes foram diagnosticados como portadores de síndrome de úlceras genitais (SUG), possuindo lesões ulceradas e/ou histórico de lesões vesiculosas e submetidos ao tratamento farmacológico de acordo com o fluxograma de abordagem sindrômica para úlceras genitais do Ministério da Saúde (BRASIL, 2006).

Do total de prontuários (n=67), foi possível o acesso a 51 deles (76,12%), entretanto não houve a possibilidade de se resgatar informações clínico-epidemiológicas de maneira confiável e que permitissem a aplicação de algum estudo estatístico.

5. DISCUSSÃO

De acordo com a metodologia estabelecida neste estudo, sequências flanqueando o gene U_L23 foram obtidas de bancos de dados públicos e alinhadas a fim de escolher regiões-alvo para o desenho dos iniciadores (TKS e TKAS) visando à amplificação da CDS desse gene. Os *amplicons* obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose para a confirmação da amplificação dos produtos com o tamanho esperado. Testou-se simultaneamente uma amostra positiva para HSV-1 também pertencente ao “Projeto SUG”, como prova de que os iniciadores desenhados para o HSV-2 não amplificam o gene U_L23 do HSV-1. Desta forma, obteve-se sequência compatível com 1.294pb, sem que houvesse amplificação cruzada desse gene em amostra HSV-1 positiva.

A não amplificação da região-alvo em 13 das 67 amostras pode estar diretamente relacionada a três fatores (isolados ou somados): ressuspensão do DNA extraído em água de injeção não comprovadamente livre de DNases; intensa manipulação das amostras (congelamento e descongelamento excessivos) e, por fim, mutação em sítio essencial para ligação eficiente dos iniciadores.

Lee; Tang et al. (1999) detectaram uma frequência de 34,2% de polimorfismos no gene da TK em 200 cepas de HSV-1 (n=102) e HSV-2 (n=98) submetidas ao sequenciamento nucleotídico do gene U_L23 , o que vai de encontro aos dados obtidos pelo presente estudo, cuja frequência de polimorfismos nesse gene foi de 32,83%.

O código genético é degenerado, ou seja, um determinado aminoácido pode ser codificado por mais de um códon, desta forma, algumas mutações de nt podem não gerar mudança de aa (mutações silenciosas), fato observado nas amostras Br340AM, Br060AM, Br322AM, Br262AM e Br065AM, Essas mutações, por conseguinte, não representam

consequências graves, mas são importantes em relação à questão da variabilidade genética (BROWN, 1999).

Das 17 substituições de nt, apenas cinco foram do tipo transversão, que é caracterizada pela substituição de uma base nitrogenada purínica por uma pirimidínica e vice-versa. Normalmente, tal fenômeno é mais raro de acontecer quando comparado à transição (purina por purina ou pirimidina por pirimidina).

A sequência de aa é o principal ponto que determina a conformação tridimensional das proteínas que, por conseguinte, influencia diretamente na atividade catalítica da mesma. E tal forma espacial depende, por sua vez, do caráter físico-químico dos aa que a compõem (NAVECA, 2006). Desta forma, fez-se primeiramente uma análise teórica do caráter físico-químico das substituições de aa detectadas nas sequências deduzidas de TK do presente estudo.

Além disso, para uma melhor caracterização da hidrofobicidade em relação às mutações listadas na Tabela 3, as sequências foram submetidas à análise na ferramenta *online* ProtScale (GASTEIGER; HOOGLAND et al., 2005) no servidor ExPASy Proteomics Server <<http://expasy.org/>>, utilizando os parâmetros estabelecidos por Kyte; Doolittle, 1982.

Desta forma, a partir das sequências deduzidas da proteína TK de oito amostras com substituições de aa (Br060AM, Br65AM, Br080AM, Br112AM, Br218AM, Br262AM, Br322AM e Br340AM) em relação à sequência deduzida da proteína TK da cepa-referência “HG52”, o ProtScale gerou resultados que foram ilustrados no Gráfico 1. E, como já constatado na análise teórica, houve ligeiras mudanças em relação ao caráter físico-químico quando da substituição de aa gerada por mutação por substituição de nt nas sequências estudadas que, possivelmente, não seriam capazes de gerar alterações estruturais na TK. Esse tipo de apontamento é interessante se considerarmos que uma das forças importantes para a

manutenção da estrutura conformacional de uma proteína é a interação hidrofóbica devido aos aminoácidos apolares.

Todos os polimorfismos descritos por este estudo foram devidos às mutações por substituição de nt e todas estas foram localizadas fora dos sítios conservados da enzima em questão. De acordo com Frobert; Thouvenot et al. (2007) e Sauerbrei; Deinhardt et al., 2010, além de inserções ou deleções em homopolímeros de G ou C, outra causa bastante comum de resistência ao aciclovir são substituições que acontecem, em sua maioria, em sítios conservados do gene U_L23 que acabam por gerar substituições de aa em sítios catalíticos da TK.

Lee; Tang et al. (1999) também não encontraram polimorfismos ou mutações por inserções ou deleções nas regiões homopoliméricas G ou C do gene da TK, diferentemente da maioria dos artigos publicados sobre esse assunto (KIT; SHEPPARD et al., 1987; SASADEUSZ; TUFARO et al., 1997; BESTMAN-SMITH; SCHMIT et al., 2001; SCHMIT; BOIVIN, 1999). Ressalta-se que neste presente trabalho, diferentemente dos estudos previamente citados, as sequências de TK foram caracterizadas sem o conhecimento prévio do fenótipo.

Conforme descrito por Morfin; Thovenout (2003), os estudos genotípicos de cepas sensíveis e/ou resistentes ao aciclovir mostraram um alto grau de polimorfismo no gene U_L23 e, ainda de acordo com eles, a maioria dessas mutações não está relacionada à resistência e está localizada fora dos sítios ativos da TK (boa parte em regiões não conservadas). Isto não quer dizer que substituições fora dos sítios conservados dessa enzima não possam ser passíveis de originarem resistência a esse fármaco, tal como descrito por Frobert; Thouvenot et al. (2007). Estes mesmos pesquisadores reforçam ainda que tais mutações precisam ser confirmadas por mais experimentos (genotípicos e fenotípicos) para que se possa estabelecer

um banco de dados confiável de mutações de resistência desse vírus ao ACV e outros análogos nucleosídicos.

É interessante ressaltar mais uma vez que as amostras Br060AM, Br080AM, Br112AM e Br218AM apresentaram as mutações Gly39Glu e Asn78Asp simultaneamente, fato que, até o momento, não fora descrito em nenhum outro trabalho. A mutação Asn78Asp detectada por este estudo também foi encontrada por Bestman-Smith; Schmit et al. (2001) em isolados clínicos de pacientes imunocomprometidos.

A mutação Gly39Glu foi relatada publicamente pela primeira vez em março de 2010 por Sauerbrei; Deinhardt et al., como a única mutação no gene da TK detectada na pesquisa com quatro isolados de HSV-2 provenientes de pacientes imunocomprometidos com infecção mucocutânea recorrente por HSV. Esses pesquisadores afirmaram que esta mutação ainda possui significado obscuro, visto que verificaram que a mesma foi atribuída a um isolado sensível e a dois isolados de HSV-2 resistentes ao aciclovir, sendo que em um destes (isolado de HSV-2 de paciente com herpes recorrente) a mutação Gly39Glu era a única presente. No entanto, em paralelo, Sauerbrei; Deinhardt et al. (2010) destacam que encontraram novas mutações no gene da DNA polimerase (U_L30) nesses isolados e uma destas mutações pode estar relacionada à resistência ao fármaco. É sabido que mutações no gene U_L30 do HSV-2, apesar de bastante raras, podem tornar cepas de HSV-2 resistentes ao aciclovir (FROBERT; OOKA, 2006; MORFIN; THOUVENOT, 2003).

Ainda em relação à mutação Gly39Glu faz-se necessário determinar se a mesma, de fato, apresenta ou não algum papel na resistência de cepas de HSV-2 ao ACV, já existem bons indicativos que se trata apenas de um polimorfismo. Mas, será que tal mutação em associação com outra não seja corresponsável por cepas resistentes ao ACV?

Durante a comparação dos dados obtidos por este estudo com os dados de outras pesquisas realizadas com o gene da TK e revisões bibliográficas sobre esse tema

(GAUDREAU; HILL et al., 1998; BESTMAN-SMITH; SCHMIT et al., 2001; GILBERT; BESTMAN-SMITH et al., 2002 THOUVENOT; MORFIN, 2007), foi verificado um conflito de informações um tanto preocupante, principalmente em relação às mutações de substituição de aa nas posições 39, 271, 272 e 273.

Tanto a pesquisa publicada em 1998 por Gaudreau; Hill et al., quanto por Bestman-Smith; Schmit et al., em 2001, descreveram a troca do aa Glu pelo Gly na posição 39. Os artigos de revisão realizados por Gilbert; Bestamn-Smith et al., 2002 e por Thouvenot; Morfin, 2007, listaram esses achados atribuídos à pesquisas entre 1998 e 2001. O presente estudo relata uma troca Gly por Glu na posição 39 e não Glu por Gly, como descrito por esses artigos. Ao procurar a posição 39 na sequência deduzida de TK da cepa-referência “HG52”, verificou-se que, de fato, nesta cepa, existe o aa Gly na posição 39 e não Glu, portanto a troca de aa deveria partir de uma glicina (Gly) e não de um ácido glutâmico (Glu), confirmando os achados desta dissertação.

Entretanto, as pesquisas descritas nos artigos de 1998 e 2001 relatam a comparação de seus achados com a sequência do gene U_L23 do HSV-2 da cepa “333” (NCBI/*Accession Number*: X01712), consideradas por eles como padrão (DOLAN; JAMIESON et al., 1998).

Dessa forma, foi necessário se fazer um alinhamento das sequências deduzidas da cepa-referência “HG52” com a cepa “333”. A partir disso, foram verificadas as seguintes situações, além do conflito de informações na posição do aa 39:

- a. Na descrição da cepa “333” na página do NCBI (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/X01712.1>>, acesso em 17 de julho de 2010), existe um link de conflito (*conflict*), que alerta que a cepa “333” possuía um *gap* nas posições genômicas 1141...1142 quando de sua primeira publicação (SWAIN; GALLOWAY, 1983), sendo corrigido posteriormente com a publicação por Kit; Kit et al., 1983.

b. Em relação ao aa 271, verificou-se a partir da sequência corrigida da cepa “333” que as mutações ora descritas como Arg271Val, Pro272Ser e Asp273Arg (listadas como mutações de resistência ao aciclovir) são, na verdade, Arg272Val, Pro273Ser e Asp274Arg.

A posição 271 chamou a atenção, pois houve mudança importante de aa (Pro271Gln) em uma amostra deste presente estudo: Br080AM. Sabe-se que o aa prolina (Pro) está relacionado às dobras na estrutura proteica, visto que sua natureza cíclica força o grupo carbonila, que está ligado ao nitrogênio presente nessa molécula, a se colocar em um arranjo conformacional diferente do necessário para a α -hélice, o que a difere dos demais aminoácidos. Portanto, faz-se sempre necessário uma análise mais cuidadosa quando há substituição Pro por outro aa qualquer (vice-versa) devido a essa importância estrutural que a prolina representa para estrutura secundária de uma proteína (ALLINGER; CAVA et al., 1976).

Por mais que as mutações His4Tyr, Met70Arg, Asn245Ser, Ala366Val (Tabela 4) sejam todas em regiões não conservadas da TK e que grande parte dos achados apontem as substituições em sítios ativos e/ou conservados da enzima como de potenciais provocadoras de resistência, mais isolados de HSV-2 devem ser submetidos à análise de polimorfismo do gene U_L23, aliada à determinação de resistência fenotípica ao aciclovir e/ou outros análogos nucleosídicos, permitindo, assim, uma melhor caracterização das mutações que são, de fato, responsáveis pela perda de sensibilidade de certas cepas de HSV-2 à ação do fármaco (ou grupo de fármacos) em questão.

Com relação aos 23 sítios variáveis encontrados a partir do alinhamento das 67 sequências deste estudo com a sequência da cepa-referência “HG52” e mais 66 sequências estrangeiras obtidas a partir de consulta aos bancos de dados públicos, três grandes regiões conservadas foram encontradas entre as posições 104-139 (36 resíduos), 160-214 (55

resíduos) e 282-337 (56 resíduos). Ao se comparar essas regiões aos sítios conservados de ligação de ATP e de nucleosídeo estabelecidas por Balasubramaniam; Veerisetty et al., 1990 e cujas posições foram corrigidas por este presente estudo para o HSV-2 (alinhando-se à “HG52”), verificou-se que a região conservada (160- 214), encontrada no alinhamento de todas essas sequências retiradas dos bancos de dados públicos, compreende as regiões conservadas III, região de ligação de nucleosídeo e região conservada IV da TK; a região conservada VI está contida na região entre 282-337, esta última verificada como região não variável pelo alinhamento realizado.

A baixa divergência encontrada entre as amostras brasileiras, possivelmente reflete o fato das amostras terem sido isoladas na mesma cidade em um período inferior a dois anos. Como não existem, até a presente data, estudos brasileiros publicados sobre o assunto, bem como sequências brasileiras do gene UL23 do HSV-2 publicadas em bancos de dados públicos, não se pode determinar com maior afinco tal informação.

As mutações não devem ser apenas analisadas de forma linear (“estrutura primária”), é de extrema importância que seja considerada a probabilidade de interação espacial entre os aminoácidos (estrutura terciária), visto que por mais que haja distância entre determinados aa na sequência da proteína, os mesmos podem estar interagindo entre si quando da conformação espacial da molécula proteica.

Desde quando as primeiras estruturas cristalográficas da proteína TK foram publicadas (BROWN; VISSE et al., 1995; WILD; BOHNER et al., 1997; PILGER; PEROZZO et al., 1999), interações específicas envolvendo tanto os aa localizados dentro de sítios ativos quanto fora deles vêm demonstrando o quanto elas são necessárias para a boa funcionalidade desta enzima. Desta forma, estudos sobre a estrutura dessa proteína são importantes para a compreensão do comportamento funcional da TK, principalmente em relação às substituições

de aa ocorridas fora dos sítios ativos e/ou conservados dessa enzima (FROBERT; CORTAY et al., 2008).

Nesse sentido e com a finalidade de avaliar em maior detalhe as substituições de aa e as possíveis contribuições na alteração da estrutura terciária da TK, resolveu-se construir modelos teóricos tridimensionais das amostras cujas sequências deduzidas dessa enzima mostraram as alterações mais importantes.

Para tanto, as sequências deduzidas das amostras Br060AM, Br065AM, Br080AM, Br112AM, Br218AM e Br262AM, além da cepa-padrão HG52, foram submetidas ao servidor SWISS-MODEL (disponível em <<http://swissmodel.expasy.org/>>), para geração de estruturas baseadas na metodologia de modelagem por homologia (modelagem comparativa) utilizando a abordagem *Automatic Modelling* (SCHWEDE, T; KOPP et al., 2003). A modelagem por homologia realiza um primeiro passo de busca, através do alinhamento de sequências primárias, uma estrutura resolvida por cristalografia de raios-X (*X-Ray*) ou por Ressonância Magnética Nuclear de prótons (NMR) depositada no banco de dados públicos do PDB (*Protein Data Bank*, disponível em <www.pdb.org>) que possa servir como base (*template*) para construção do modelo *in silico*. Alinhamentos com identidade maior que 40% normalmente são suficientes para a construção de um bom modelo. Obviamente, quanto maior essa identidade, maior o sucesso na construção do modelo. No caso desta dissertação, os alinhamentos retornaram valores de identidade entre 76,9% (por exemplo, Br065AM) e 77,5% (por exemplo, Br080AM e Br218AM), o que é considerado excelente.

Os modelos monoméricos construídos utilizaram como base as coordenadas atômicas da estrutura “1p7cB” da TK do HSV-1 resolvida por Raio-X com resolução de 2,10 Å (GARDBERG; SHUVALOVA et al., 2003).

Uma vez que a estrutura resolvida utilizada como molde mostra as coordenadas dos resíduos 46 até 374, todos os modelos gerados possuem o mesmo tamanho e, desta forma, as

mutações anteriores ao resíduo 46 não puderam ser avaliadas.

Em relação aos gráficos de qualidade gerados pelo Servidor PROSA-Web, é possível observar, na Figura 31A, que o *score-Z* da estrutura da cepa-referência “HG52” foi -8,26, ou seja, valor que está dentro da média dos valores encontrados para estruturas similares disponíveis no *site* PDB, fato este que sinaliza para um bom modelo. Na Figura 31B, o gráfico de energia para a janela de 40 aminoácidos mostra valores negativos o que também reflete para um bom modelo. Mesmo na janela que analisa 10 aa por vez, poucas são as regiões com valores positivos, reforçando a conclusão anterior.

As regiões em vermelho na Figura 31C (principalmente entre o aa 213 e aa 230) não significam erros na estrutura teórica analisada, apenas que se faz necessário maior refinamento da estrutura nessas regiões. Todavia, em função dos objetivos da modelagem por homologia para esta dissertação, os modelos obtidos foram considerados bastante satisfatórios.

Os modelos teóricos (Figura 32) mostraram que as substituições de aa estão em sua maioria voltadas para uma mesma região da estrutura, afastadas dos sítios de ligação de ATP e nucleosídeo, aparentemente uma região mais propensa a mudanças de aminoácidos (resíduo 78).

Uma mudança em especial chamou a atenção a partir da visualização das estruturas teóricas (Arg338Gln, amostra Br065AM) pela maior proximidade ao sítio de ligação ao ATP, além desta mutação representar uma mudança de carga e hidrofobicidade simultâneas do aa.

Entretanto, a contribuição dessas mudanças só poderá ser melhor avaliada através da simulação do comportamento estrutural dos modelos por dinâmica molecular, etapa que esta dissertação propõe para estudos posteriores. Esse tipo de simulação juntamente com a análise de *docking* permitirá avaliar a ligação do aciclovir na estrutura quaternária da TK, contribuindo para uma melhor compreensão das alterações estruturais observadas nessa

enzima do HSV-2.

Na tentativa de se caracterizar melhor os aspectos clínicos dos pacientes participantes deste estudo, tentou-se recuperar algumas informações relevantes a partir da consulta aos prontuários clínicos dessas pessoas.

Após uma análise minuciosa de cada um dos prontuários disponíveis, constatou-se a impossibilidade de se resgatar todas as informações clínico-epidemiológicas de maneira confiável, que permitiria a aplicação de algum estudo estatístico, visto que muitas vezes os dados foram tratados de maneira subjetiva, utilizando termos e abordagens que variavam de acordo o profissional de saúde responsável pelo preenchimento dos prontuários. Isto leva a algumas reflexões importantes, como por exemplo: a importância de uma anamnese bem descrita e detalhada e da padronização do preenchimento das informações clínicas e/ou termos médicos, a necessidade de uma impressão diagnóstica clara, bem descrita e justificada, bem como a anotação de outras informações que sejam relevantes ao diagnóstico, prognóstico e controle, colaborando para uma melhor condução do tratamento dos pacientes.

É sabido que a maioria das pessoas com infecção pelo HSV-2, principalmente nas recorrências, apresentam manifestações subclínicas, ou seja, os sinais e sintomas podem passar despercebidos (WHITLEY; ROIZMAN, 2001; GUPTA; WARREN et al., 2007), fato este que dificulta o controle médico-sanitário e contribui ainda mais a dispersão do vírus na população.

As definições para “primeiro episódio de herpes genital” ou “infecção genital primária”, bem como para “casos recorrentes” e “casos recidivantes” é um tanto obscura e muitas vezes contraditória na literatura. Gupta; Warren et al. (2007) definem que uma pessoa com infecção genital primária por HSV é aquela que adquiriu HSV-2 e não possuía imunidade pré-existente ao HSV-1 ou que seja soronegativa para HSV-1; já a pessoa que adquiriu HSV-2 possuindo imunidade ao HSV-1 é classificada como caso de infecção não-

primária ao HSV-2. O Manual de Controle de Doenças Sexualmente Transmissíveis do Ministério da Saúde do Brasil (2006), baseado nas orientações da WHO (2005), estratifica o tratamento farmacológico em “primeiro episódio de herpes genital”, “recorrências de herpes genital” e “casos recidivantes (seis ou mais episódios por ano)” e, em paralelo, orienta que esse tratamento seja conduzido baseado em um fluxograma de abordagem sindrômica que, muitas vezes, não permite o diagnóstico etiológico, que dirá a definição de “primeira infecção”, “recorrências” e “recidivas”.

Tudo isso configura um paradigma, visto que se sabe que o diagnóstico puramente clínico é o que dirige o tratamento farmacológico para herpes genital, mesmo sem a confirmação laboratorial, pois quanto antes a medicação for iniciada, sabe-se que há maior chance de controle na disseminação do HSV-2 (ver Anexos 1 e 2), bem como da disseminação do vírus da imunodeficiência humana (HIV).

Em paralelo, em casos de infecções subclínicas por HSV-2, o diagnóstico sindrômico “cai por terra”, não limitando a transmissão desse vírus e, por consequência, não reduzindo a transmissão do HIV, colaborando para o estabelecimento da sinergia HSV-2/HIV (ABU-DADDAD; MARGARET et al., 2008; VAN DE PERRE; SEGONDY et al., 2008).

Ressalta-se ainda que, de acordo com Gupta; Warren et al. (2007), a frequência de reativação viral que culmina em casos clínicos e subclínicos da infecção pelo HSV-2 varia bastante e isto parece estar mais ligado a fatores do hospedeiro que aos virais. Posavad; Huang et al. (2000) estudaram a persistência de linfócitos T CD8+ específicos para HSV em três indivíduos apresentando frequentes infecções genitais recorrentes por HSV-2 e constataram que o HSV recorre na presença persistente de linfócitos T CD8+, sem evidências de mutações em genes do HSV-2 que codificam epítomos para tais linfócitos ou exaustão clonal (ainda mantém propriedades citolíticas) como mecanismos de persistência viral.

As infecções herpéticas podem levar a consequências muito graves, principalmente em pacientes que apresentem algum tipo de imunossupressão, sendo que este grupo possui uma grande chance de desenvolver resistência ao fármaco ACV.

No Brasil, fazem-se necessários investimentos em pesquisa em Herpesvírus humanos, principalmente o HSV-2; desde estudos de prevalência/incidência, passando por estudos de transmissibilidade desses agentes, da sua interação com o HIV, bem como caracterização molecular das cepas circulantes no país e, finalmente, estudos de resistência genotípica e fenotípica aos fármacos utilizados no tratamento da herpes genital e fornecidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

Desta forma, num futuro próximo, esses conhecimentos poderão contribuir para a construção de um banco de dados de HSV que possa ser compartilhado e alimentado pela comunidade médico-científica, como já existe para outros agentes infecciosos, como HIV, HBV (vírus da hepatite B) e HCV (vírus da hepatite C).

Enfim, o conhecimento das variações gênicas, genótipos e/ou subtipos dos agentes infecciosos circulantes em uma determinada região geográfica ou população de estudo, contribui para um conhecimento mais detalhado da epidemiologia das doenças. Desse modo, as rotas de transmissão, a dispersão e a resistência do HSV aos antivirais podem ser caracterizadas, permitindo um controle e prevenção mais eficazes por parte das autoridades de saúde. Neste contexto, o presente trabalho reforça a importância e a necessidade de se conduzir um estudo semelhante a este, no estilo de uma coorte, mais detalhado do ponto de vista clínico e que acompanhe a evolução da infecção/doença nos pacientes imunocompetentes e imunossuprimidos, com diagnóstico de herpes genital.

6. CONCLUSÕES

O protocolo construído para amplificação e sequenciamento do gene U_L23 do HSV-2, demonstrou-se bastante eficaz, amplificando o alvo em 83,75% das amostras submetidas a esse estudo.

Todos os 67 *amplicons* submetidos ao sequenciamento nucleotídico do gene U_L23 bilateral tiveram suas sequências concluídas com sucesso.

O U_L23 caracterizou-se, de fato, como um gene bastante polimórfico.

Nenhuma substituição de aminoácido foi localizada dentro de sítios ativos e/ou conservados da enzima TK.

Não foram encontradas mutações sugestivas de resistência genotípica do HSV-2 ao aciclovir.

Foram encontradas pelo presente estudo quatro mutações que ainda não haviam sido descritas: His4Tyr, Asn245Ser, Met70Arg e Ala336Val.

A mutação por substituição de aminoácido de maior frequência observada neste estudo foi a Gly39Glu.

Verificou-se alta frequência da mutação Gly39Glu em sequências da Tanzânia, Zâmbia, Zimbábue, África do Sul e Peru.

Faz-se necessário uma melhor caracterização fenotípica em relação às mutações descritas pela primeira vez por este presente trabalho, bem como da Gly39Glu, para se confirmar se, de fato, são casos apenas de polimorfismos do gene U_L23, ou se são responsáveis e/ou corresponsáveis por resistência do HSV-2 ao ACV.

Não foram encontradas mutações por deleção ou inserção nas regiões de homopolímeros G e/ou C.

De acordo com as estruturas teóricas da TK, verificou-se que as substituições de

aminoácidos estão afastadas dos sítios ativos da enzima, com exceção da mutação Arg338Gln.

Não houve relação entre as variáveis sexo e idade entre os pacientes que apresentaram sequência deduzidas de TK idênticas à da cepa-referência frente aos que apresentaram a sequência distinta da sequência de aminoácidos da TK.

Não foi possível a obtenção de dados epidemiológicos confiáveis e que fossem passíveis de serem analisados estatisticamente.

Mais estudos minuciosos e controlados para caracterizar genotípica e fenotipicamente o HSV-2, bem como acompanhar a evolução da doença no paciente são necessários para se estabelecer com maior precisão quais mutações são referentes à resistência ao ACV e quais são apenas casos de polimorfismos.

BIBLIOGRAFIA

1. Referências Bibliográficas

PELLETT, Philipe; ROIZMAN, Bernard. The family *Herpesviridae*: a brief introduction. In: KNIPE, David M.; HOWLEY, Peter M. **Fields virology**. 5. ed,v.2. United States of America: Lippincett Williams & Wilkins, 2007.

NORBERG, Peter; BERGSTRÖM, Tomas; REKABDAR, Elham; LINDH, Magnus; LILJEQVIST, Jan-Ake. Phylogenetics analysis of clinical herpes simplex virus type 1 isolates identified three genetic groups and recombinant virus. **Journal of Virology**, v.78, n.19, p.10755-64, 2004.

BROOKS, Geo F.; BUTEL, Jante S.; MORSE, Stephen A. **Jawetz, Melnick & Adelberg Microbiologia Médica**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses – **Virus Taxonomy List 2009**. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2008>>. Acesso em: 05 jul. 2009.

DAVISON, Andrew J.; ERBELE, Richard; EHLERS, Bernhard; HAYWARD, Gary S.; McGEOCH, Duncan J.; MINSON, Anthony C.; PELLETT, Philip E.; ROIZMAN, Bernard; STUDDERT, Michael J.; THIRY, Etienne. The order *Herpesvirales*. **Archives of Virology**, v.154, p.171-7, 2009.

MIRANDA, Mônica Maria Fonseca Souza de. Víroses dermatotrópicas. In: SANTOS, Norma Suely de Oliveira; ROMANOS, Maria Teresa Villela; WIGG, Márcia Dutra. **Introdução à virologia humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

ROIZMAN, Bernard; KNIPE, David M; WHITLEY, Richard J. Herpes simplex viruses. In: KNIPE, David M.; HOWLEY, Peter M. **Fields virology**. 5. ed,v.2. United States of America: Lippincett Williams & Wilkins, 2007.

BEAUMAN, John G.; MAJ, M.C.. Genital herpes: a review. **American Family Physician**, v.72, n.8, p.1527-34, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Manual de Controle Doenças Sexualmente Transmissíveis DST Série Manuais nº 68 / Ministério da Saúde**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. 4. ed. Brasília, 2006.

FATAHZADEH, Mahnaz; SCHWARTZ, Robert A. . Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 57, n. 5, p.737-63, 2007.

WEISS, Helen. Epidemiology of herpes simplex virus type 2 infection in the developing world. **Herpes**, v.11, n.1, p.24A-35A, 2004.

McGEOCH, Duncan J.; RIXON, Frazer J.; DAVISON, Andrew J.. Topics in herpesvirus genomics and evolution. **Virus Research**, v.117, p.09-104, 2006.

MIRANDA-SAKSENA, Monica; BOADLE, Rossa A.; AGGARWALL, Anupriya; TIJONO, Bibing; RIXON, Frazer J.; DIENFENBACH, Russell J.; CUNNINGHAM, Anthony L. Herpes Simplex Virus Utilizes the Large Secretory Vesicle Pathway for Anterograde Transport of Tegument and Envelope Proteins and for Viral Exocytosis from Growth Cones of Human Fetal Axons. **Journal of Virology**, n.7, v.83, p. 3187-99, 2009.

CLEMENTS, J. Barklie; BROWN, S. Moira. Herpesviruses. **Principles of Medical Biology**, v. 9B, n.24, p.393-414, 1997.

GONÇALVES, Ângela. Propriedades gerais dos herpesvírus. In: LUPI, Omar; SILVA, Ângela Gonçalves da; PEREIRA, Antônio Carlos. **Herpes clínica, diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000.

NCBI. **Herpes simplex virus type 2 (strain "HG52"), complete genome**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/6572414?report=genbank>>. Acesso em: 10 mar. 2009.

DOLAN, Aidan; JAMIESON, Fiona E.; CUNNINGHAM, Charles; BARNETT, Barbara C.; McGEOCH, Duncan J.. The genome sequence of herpes simplex virus type 2. **Journal of Virology**, v.72, n.3, p.2010-2021, 1998.

KNIPE, Davida M.; CLIFFE, Anna. Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. *Nature Reviews Microbiology*, v.6, p. 211-21, 2008.

McGEOCH, D.J.; DALRYMPLE, M. A.; DAVISON, A. J.; DOLAN, A.; FRAME, M. C.; McNAB, D.; PERRY, L. J.; SCOTT, J. E.; TAYLOR, P. The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. **Journal of General Virology**, v. 69, p. 1531-74, 1988.

McGEOCH, D. J.; DOLAN, A.; DONALD, S.; BRAUER, D. H. Complete DNA sequence of the short repeat region in the genome of herpes simplex virus type 1. **Nucleic Acids Research**, n.14, v.4, p. 1727-45, 1986.

MARTIN, Emily Toth; KOELLE, David M.; BYRD, Benjamin; HUANG, Meei-Li; VIEIRA, Jeffrey; COREY, Lawrence; WALD, Anna. Sequence-based methods for identifying Epidemiologically linked herpes simplex virus type 2 strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n.7, p.2541-6, 2006.

NORBERG, Peter; KASUBI, Mabula J.; HAARR, Lars; BERGSTRÖM, Tomas; LILJEQVIST, Jan-Ake. Divergence and recombination of clinical herpes simplex virus tupe 2 isolates. **Journal of Virology**, v.81, n.23, p.13158-67, 2007.

REY, Félix A. Molecular gymnastic at the herpesvirus surface. **European Molecular Biology Organization Reports**, v. 7, n.10, p. 1000-5, 2006.

KUTLUAY, Sebla B.; DeVOS, Sarah L.; KLOMP, Jennifer E.; TRIEZENBERG, Steven J. Transcriptional coactivators are not required for herpes simplex virus type 1 immediate-early gene expression in vitro. **Journal of Virology**, n.83, v.8, p. 3436-49, 2009.

PRESTON, Chris M.. Repression of viral transcription during herpes simplex virus latency. **Journal of General Virology**, v.81, p.1-19, 2000.

LEHMAN, I. R.; BOEHMER, Paul E.. Replication of HSV virus DNA. The **Journal of Biological Chemistry**, v.274, n.40, p.28059-82, 1999.

SMILEY, James R. Herpes simplex virus vírion host shutoff protein: immune evasion mediated by a viral RNase?. **Journal of Virology**, n. 3, v. 78, p. 1063-68, 2004.

FROBERT; Emilie; CORTAY, Jean-Claude; OOKA, Tamadasa; NAJIOULLAH, Fatiha; THOUVENOT, Danielle; MORFIN, Florence. Genotypic detection of acyclovir-resistant HSV-1: characterization of 67 ACV-sensitive and 14 ACV-resistant viruses. **Elsevier Antiviral Research**, v.79, p. 28-36, 2008.

McCORMACK, Sheena; WALSH, John C.; BARTON, Simon E.; KIFFER, Carlos Roberto Veiga. Herpes simples. In: VERONESI, Ricardo; FOCACCIA, Roberto. **Tratado de infectologia**. São Paulo: Atheneu, 2004.

RATNAM, S.; SEVERINI, A.; ZAHARIADIS, G; PETRIC, M.; ROMANOWSKI, B.. Th e diagnosis of genital herpes – beyond culture: an evidence-based guide for the utilization of polymerase chain reaction and herpes simplex virus type-specific serology. **Canadian Journal of Infectious Diseases Medical Microbiology**, v. 18, n.4, p.233-40, 2007.

LOOKER, Katharine J.; GARNETT, Geoffrey P.; SCHMID, George P.. An estimate of the global prevalence and incidence of herpes simplex type 2 infection. **Bolletim of the World Health Organization-Public Health Reviews**, v.86, n.10, p.805-13, 2008.

VAN DE PERRE, P.; SEGONDY, M.; FOULONGNE, V.; OUEDRAOGO, A.; KONATE, I.; HURAU, J.M.; MAYAUD, P.; NAGOT, N. Herpes simplex virus and HIV-1: deciphering viral synergy. **Lancet Infectious Diseases**, v. 8, n. 8, p.490-7, 2008.

ABU-HADDAD, L. J.; MARGARET, A. S.; CELUM, C.; WALD, A.; LONGINI, I.M.; SELF, S. G.; COREY, L. Genital herpes has played a more important role than any other sexually transmitted infection in driving HIV prevalence in Africa. **Plos One**, v. 3, n. 5, p.e2230.

WHO. World Health Organization. Herpes simplex virus type 2 programmatic and research priorities in development countries. WHO; UNAIDS; LSHTM. In: **Report of WHO/UNAIDS/LSHTM Workshop in London**. Geneva: WHO, 2001.

WHO. World Health Organization. **Sexually Transmitted Diseases**. Disponível em: <http://www.who.int>. Acesso em: 22 dez 2008.

FUAM. **Boletim epidemiológico 2009**. Ano XI, n. 17. Manaus, Subgerência de informação em saúde, 2010.

NAVECA, Felipe G.; ALMEIDA, Tatiana A.; VERAS, Elaine A.; BENZAKEN, Adele S. Etiology of genital ulcer disease in a STI reference Center in Amazonas, Brazil. In: 18TH International Society for STD Research 18th in conjunction with BASHH Congress. **Pôster**. Londres: ISSTD/ BASHH, 2009.

WHO. World Health Organization. **Sexually transmitted and other reproductive tract infections – a guide to essential practice**. WHO; STDI/RTI Care for Reproductive Health. Geneva, 2005.

HAYDEN, Frederick G.. Antimicrobial agents (Antiviral agents – nonretroviral). In: HARDMAN, Joel G.; LIMBIRD, Lee E.; GILMAN, Alfred Goodman. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 10. ed. United States of America: The McGraw-Hill Companies, 2001.

MORFIN, Florence; THOUVENOT, Danielle. Herpes simplex vírus resistance to antiviral drugs. **Journal of Clinical Virology**, v.26, p. 29-37, 2003.

WIKIPEDIA. **Aciclovir**. Disponível em: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Aciclovir>>. Acesso em: 5 abr. 2009.

CLERCQ, Erik de. Antiviral drugs in current clinical use. **Journal of Virology**, v.30, p.115-133, 2004a.

BALASUBRAMANIAM, Nandha Kumar; VEERSETTY, Venkat; GENTRY, GLENN A. Herpesviral deoxythymidine kinases contain a site analogous to the phosphoryl-binding arginine-rich region of porcine adenylate kinase; comparison of secondary structure predictions and conservation. **Journal of General Virology**, v.71, p. 2979-87, 1990.

UNIPROTKB. **Thymidine kinase Human Herpesvirus 2 (strain HG52/HHV-2)**. Disponível em: < <http://www.uniprot.org/uniprot/P89446>>. Acesso em: 20 mai. 2010.

RCSB PDB. **Herpes simplex type 1 thymidine kinase in complex with the drug acyclovir at 1.9 Å resolution**. Disponível em: < <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2K15>>. Acesso em: 09 jul 2010.

NCBI. **Contexto do gene UL23 no genoma do HSV-2**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=1487307>. Acesso em: 13 abr 2009.

UNIPROTKB. **Thymidine kinase Human Herpesvirus 2 (strain HG52/HHV-2)**. Disponível em: < http://www.uniprot.org/uniprot/P89446#section_ref>. Acesso em: 10 abr. 2010.

LEE, N. Y.; TANG, Y. W.; ESPY, M. J.; KOLBERT, C. P.; RYS, P. N.; MITCHELL, P. S.; DAY, S.P.; HENRY, S.L.; PERSING, D.H.; SMITH, T. F.. Role of genotypic analysis of the thymidine kinase gene of herpes simplex virus for determination of neurovirulence and resistance to acyclovir. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.10, p.3171-4, 1999.

BESTMAN-SMITH, Julie; SCHMIT, Isabelle; PAPADOPOULOU, Barbara; BOIVIN, Guy. Highly reliable heterologous system for evaluating resistance of clinical herpes simplex virus isolates to nucleoside analogues. **Journal of Virology**, v.75, n.7, p. 3105-10, 2001.

SWAIN, Margaret A.; GALLOWAY, Denise A. Nucleotide sequence of the herpes simplex virus type 2 thymidine kinase gene. **Journal of Virology**, v.46, n.3, p. 1045-50, 1983.

FROBERT, E.; THOUVENOT, E.; LINA, B.; MORFIN, F.. Détection par génotypage de la résistance des virus herpes simplex à l'aciclovir. **Elsevier Masson Pathologie Biologie**, v. 55, p. 504-11, 2007.

SAIJO, M.; SUZUTANI, T.; MIZUTA, K.; KURANE, I.; MORIKAWA, S. . Characterization and susceptibility to antiviral agents of herpes simplex virus type 1 containing a unique thymidine kinase gene with an amber codon between the first and the second initiation codons. **Archives of Virology**, v.153, p. 303-14, 2007.

KIT, S.; SHEPPARD, M.; ICHIMA, H.; NUSINOFF-LEHRMAN, S.; ELLIS, M. N.; FYFE, J. A.; OTSUKA, H. Nucleotide sequence changes in thymidine kinase gene of herpes simplex

virus type 2 clones from an isolate of a patient treated with acyclovir. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 31, p. 1777-82, 1987.

HARRIS, Wendy; COLLINS, Peter; FENTON, Rob J.; SNOWDEN, Wendy; SOWA, Mike; DARBY, Graham. Phenotypic and genotypic characterization of clinical isolates of herpes simplex virus resistant to acyclovir. **Journal of General Virology**, v.84, p.1393-1404, 2003.
 FROBERT, Emilie; OOKA, Tamadasa; CORTAY, Jean-Claude; LINA, Bruno; THOUVENOT, Danielle; MORFIN, Florence. Resistance of herpes simplex virus type 1 to acyclovir: thymidine kinase gene mutagenesis study. **Elsevier Antiviral Research**, v.73, p. 147-50, 2006.

CLERCQ, Erik de. Antivirals and antiviral strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p. 704-20, 2004b.

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

GILBERT, Christian; BESTMAN-SMITH, Julie; BOIVIN, Guy. Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. **Drug Resistance Updates**, v.5, p.88-114, 2002.

HEALTH PROTECTION AGENCY. **Isolation of herpes simplex virus associated with herpes genitalis**. National Standard Method VSOP, v. 17, n. 4, 2007.

VARELLA, Rafael B.; PIRES, Ivone L.; SARAIVA, Carlos Alberto; GUIMARÃES, Antônio Carlos C.; GUIMARÃES, Maria Angélica A.M. . Diagnóstico laboratoriais da infecção pelo vírus herpes simples (HSV) em pacientes transplantados e não-transplantados. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.41, n.4, p. 257-62, 2005.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v.51, p. 263-73, 1986.

MULLIS, Kary B. The unusual origin of polymerase chain reaction. **Scientific American**, p. 57-65, 1990.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, n.74, v.12, p.5463-7, 1977.

APPLIED BIOSYSTEMS. **MagMax™ total nucleic acid isolation kit protocol**. Disponível em: < http://www.ambion.com/techlib/prot/fm_1840.pdf >. Acesso em: 05 jan. 2009.

NCBI. **GenBank**. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> >. Acesso em: 02 ago 2008.

BIOEDIT. **Biological sequence alignment editor v.7.0.9.0**. Disponível em: < <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html> >. Acesso em: 02 ago 2008.

NCBI. **Primer-blast** Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> >. Acesso em: 2 ago 2009.

PROMEGA. **Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System – Instructions for use of products A9280, A9281, A9282 and A9285 – Quick Protocol**. Disponível em: <http://www.promega.com/protcards/9fb072/fb072.pdf> >. Acesso em: 02 mai. 2010.

INVITROGEN. **Low DNA Mass Ladder Manual**. Disponível em: < <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/10068013.pdf> >. Acesso em: 01 mai. 2010.

APPLIED BIOSYSTEMS. **BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol**. Disponível em: <http://www.ibt.lt/sc/files/BDT_v3.1_Protocol_04337035.pdf>. Acesso em: 03 jun. 2010.

APPLIED BIOSYSTEMS. **BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol**. Disponível em: <http://www.ibt.lt/sc/files/BDT_v3.1_Protocol_04337035.pdf>. Acesso em: 03 jun. 2010.

KUMAR, S.; NEI, J.; DUDLEY, J.; TAMURA, K. MEGA4: molecular evolutionary genetic analysis(MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p.1596-99, 2007.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R.P.; BIROCH, A. Protein identification and analysis tools on the ExPasy Server. In: WALKRE, I. M. **Humana Press**, p. 571-607, 2005.

EXPASY. Disponível em: < <http://expasy.org/> >. Acesso em: 02 ago. 2010.

KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 157, p. 105-132, 1982.

SWISS-MODEL. Disponível em: <<http://swissmodel.expasy.org/>>. Acesso em 02 ago. 2010.

PROTEIN DATA BANK. Disponível em: <<http://www.pdb.org/>>. Acesso em: 03 ago. 2010.

GARDBERG, A.; SHUVALOVA, L.; MONNERJAHN, C.; KONRAD, M.; LAVIE, A. Structural basis for the dual thymidine kinase activity of herpes thymidine kinase. **Structure**, v.11, n.10, p.1265-77, 2003.

WIEDERSTEIN; SIPPL. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p.W407-W410, 2007.

HUMPHREY, W., DALKE, A.; SCHULTEN, K., VMD: visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v.14, p. 33-38, 1996.

POSAVAD, C. M.; HUANG, M. L.; BARCY, S.; KOELLE, D.; COREY, M.. Long term persistence of herpes simplex virus-specific CD8+ CTL in persons with frequently recurring genital herpes. **Journal of Immunology**, v.165, n.2, p.1146-52, 2000.

VMD. Disponível em: <<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>>. Acesso em: 03 ago. 2010.

PRO-AS WEB. Disponível em: <<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>>. Acesso em: 09 ago. 2010.

VIEIRA, Sonia. **Introdução à Bioestatística**. 2.ed. Rio de Janeiro: Campus, 2004.

LEE, N. Y.; TANG, Y. W.; ESPY, M. J.; KOLBERT, C. P.; RYS, P. N.; MITCHELL, P.S.; DAY, S.P.; HENRY, S.L.; PERSING, D.H.; SMITH, T.F. Role of genotypic analysis of the thymidine kinase gene of herpes simplex virus for determination of neurovirulence and resistance to acyclovir. **Journal of Clinical Microbiology**, n.10, v. 37, p. 3171-74, 1999.

HALL, T.A. **BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**. Nuclei Acids Symposium, v.41, p. 95-98, 1999.

BROWN, T.A. **Genética: um enfoque molecular**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999

NAVECA, Felipe G. **Bases moleculares da atenuação viral: modelo reovírus aviário**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2006, Tese (Doutorado em Ciências-Microbiologia), Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

SASADEUSZ; Joseph J.; TUFARO, Frank; SAFRIN, Sharon; SCHUBERT, Kathryn; HUBINETTE, Maria M.; CHEUNG, Peter K.; SACKS, Stephen L. Homopolymer mutational hot spots mediate herpes simplex virus resistance to acyclovir. **Journal of Virology**, n. 5, v.71, p.3872-78, 1997.

SCHMIT, Isabelle; BOIVIN, Guy. Characterization of the DNA polymerase and thymidine kinase genes of herpes simplex virus isolates from AIDS patients in whom acyclovir and foscarnet therapy sequentially failed. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, p. 487-90, 1999.

GAUDREAU, A.; HILL, E.; BALFOUR, H.; ERICE, A.; BOIVIN, G. Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant herpes simplex virus from immunocompromised patients. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 178, p. 297-303, 1998.

NCBI. **Herpes simplex virus type 2 (strain 333) thymidine kinase gene**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X01712.1> >. Acesso em: 17 jul. 2010.

KIT, S.; KIT, M.; QAVI, H.; TRKULA, D.; OTSUKA, H. Nucleotide sequence of the herpes simplex virus type 2 (HSV-2) thymidine kinases gene and predicted amino acid sequence of thymidine kinases polypeptide and its comparison with HSV-1 thymidine kinases gene. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v.2, p. 158-70, 1983.

ALLINGER, NORMAN L.; CAVA, MICHAEL P.; JONGH, DON C.; LEBEL, NORMAN A.; STEVENS, CALVIN, I. **Química orgânica**. 2.ed. Rio de Janeiro:LTC, 1976.

BROWN, D.G.; VISSE, R.; SANDHU, G.; DAVIES, A.; RIZKALLAH, P. J.; MELITZ, C.; SUMMERS, W. C.; SANDERSON, M. R. Crystal structures of the thymidine kinase from herpes simplex virus type 1 in complex with deoxythymidine and ganciclovir. **Nature Publishing Group**, v.2, n.10, p. 876-81, 1995.

WILD, K.; BOHNERT, T.; FOLKERS, G.; SCHULZ, G. E. The structures of thymidine kinase from herpes simplex virus type 1 in complex with substrates and a substrate analogue. **Protein Science**, v. 6, p. 2097-2106, 1997.

PILGER, B.; PEROZZO, R.; ALBER, F.; WURTH, C.; FOLKERS, G.; SCAPOZZA, L. Substrate diversity of herpes simplex virus thymidine kinase: impact of the kinematics of the enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v.274, v.45, p.31967-73, 1999.

SCHEWEDE, T.; KOPP, J.; GUEX, N.; PEITSCH, M. C. SWISS:MODEL: an automated protein homology-modeling server. **Nucleic Acids Research**, v.31, n.13, p.3381-5, 2003.

WHITLEY, R.; ROIZMAN, P. Herpes simplex virus. **Clinical Virology**, p.375-410, 2001.

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

2. Obras Consultadas

ABBA, Martín C.; GOLIJOW, Carlos D.. Herpes simplex vírus genotyping: multiple optional PCR-based RFLP systems and non-isotopic single-strand conformation polymorphism method. **Journal of Virological Methods**, v.118, p.73-6, 2004.

ANURANDA, K.; SINGH, Maan H.; GOPAL, K. V. T.; RAO, Raghu Rama; RAMANI, T. V.; PADMAJA, Jyothi. Herpes simplex virus 2 infection: a risk factor for HIV infection in heterosexuals. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprosy**, v. 74, n. 3, p. 230-33.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Glossário temático DST e Aids / Série A Normas e Manuais Técnicos**. Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Prevalências e freqüências relativas de doenças sexualmente transmissíveis em populações selecionadas de seis capitais brasileiras**. MOHERDAUI, Fábio;

BENZAKEN, Adele; ONAGA, Elisabete Taeko; ASSIS, Isolina de Lourdes Rios; MELO, Letícia Nolde; CROMACK, Luiza; MARTINS, Telma Alves. Brasília, 2006.

BROWN, T. A. **Genética um enfoque molecular**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999.

CDC. **Centers for Disease Control and Prevention**. Disponível: <http://www.cdc.gov/>. Acesso em: 15 jan. 2009.

DAVISON, Andrew J.. Evolution of the herpesviruses. **Veterinary Microbiology**, v.86, p.69-88, 2002.

ExpASy. **ViralZone**. Disponível em: <<http://www.expasy.ch/viralzone/>>. Acesso em: 20 abr. 2009.

FIELD, Hugh J.. Herpes simplex virus antiviral drug resistance – current trends and future prospects. **Journal of Clinical Virology**, v.21, p.261-9, 2001.

FISHER, S.G.; LERMAN, L. S. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melt theory. **Proceedures of the National Academy of Science Biochemistry**, v. 80, p. 1579-83, 1982.

FLETCHER, Robert H.; FLETCHER, Suzanne W.; WAGNER, Edward H. **Epidemiologia clínica: elementos essenciais**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1996.

FURASTÉ, P. A. **Normas Técnicas para o trabalho científico com explicitação das normas da ABNT**. 15 ed. Dáctilo-Plus. Porto Alegre, 2010.

HOFFMAN, R. A. **Wikigenes UL23 thymidine kinase**. Disponível em: <<http://www.wikigenes.org/e/gene/e/1487307.html>>. Acesso em: 20 abr. 2009.

KOELLE, D. M.; WALD, A.. Herpes simplex virus: the importance of asymptomatic shedding **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.45, topic T3, p.1-8, 2000.

LERMAN, Leonard. **Test of melt**. Disponível: <<http://web.mit.edu/osp/www/melt.html>>. Acesso em: 10 mai. 2009.

LODISH, Harvey; BERK, Arnold; ZIPURSKY, Harvey; MATSUDAIRO, Paul; BALTIMORE, David; DARNELL, James. **Biologia celular e molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.

MACKAY, Ian M.; HARNETT, Gerry; JEOFFREYS, Neisha; BASTIAN; Ivan; SRIPRAKASH, Kadaba S.; SIEBERT, David; SLOOTS, Theo P. Detection and discrimination of herpes simplex viruses, *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum* and *Calymmatobacterium (Klebsiella) granulomatis* from genital ulcers. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, p. 1431-8, 2006.

MURRAY, Robert K.; GRANNER, Daryl K.; MAYES, Peter A.; RODWELL, Victor W. **Harper: bioquímica**. 8.ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

MYERS, Richard M.; FISHER, Stuart G.; MANIATIS, Tom; LERMAN, Leonard S. Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, v. 13, n. 9, p. 3111-29, 1985.

NORBERG, Peter; BERGSTRÖM, Tomas; LILJEQVIST, Jan-Ake. Genotyping of clinical herpes simplex virus type 1 isolates by use of restriction enzymes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.12, p.4511-4, 2006.

ORLE, Karina A.; GATES, Carol A.; MARTIN, David H.; BODY, Barbara A.; WEISS, Judith B.. Simultaneous PCR detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, and Herpes simplex virus type 1 and 2 from genital ulcers. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.1, p.49-54, 1996.

RATCLIFF, Rodney M.; CHANG, Grace; KOK, TuckWeng SLOOTS, Theo P.. Molecular diagnosis of medical viruses. **Current Issues on Molecular Biology**, v.9, p.87-102, 1999.

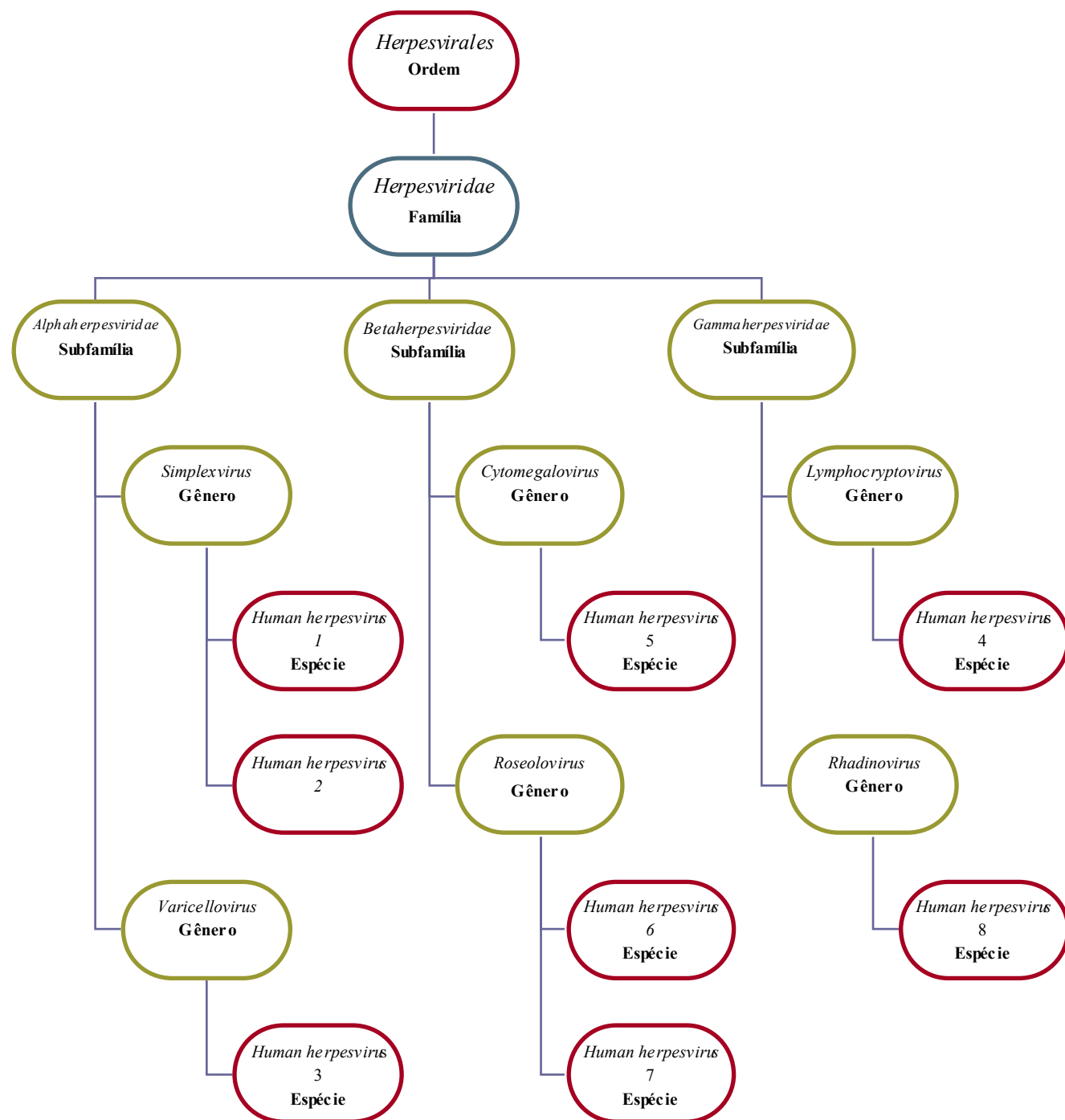
SERVERINO, J. A. **Metodologia do trabalho científico**. 22 ed. São Paulo. Cortez, 2002.

VERNET, Guy. Molecular diagnostics in virology. **Journal of Clinical Virology**, v.31,p. 239-47, 2004.

VIEIRA, Sônia. **Como escrever uma tese**. 6. ed. São Paulo: Atlas, 2008.

VIROLOGY JOURNAL. **All the virology on the www**. Disponível em: <<http://www.virology.net/>>. Acesso em: 1 fev. 2009.

APÊNDICE A – Classificação taxonômica dos herpesvírus humanos – ano 2009



FONTE: *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) – Virus Taxonomy List 2009*

APÊNDICE B – Composição proteica do HSV-2

Accession	Protein names	Gene names	Length
P89466	Alpha trans-inducing factor 78 kDa protein (Tegument protein VP11/12) (Tegument protein UL46)	UL46	722
P89459	De nedylase UL36 (pUL36) (EC 3.1.2.15) (EC 3.4.22.-) (Ubiquitin thiolesterase pUL36) (Tegument protein VP12) (Tegument protein VP1-2)	UL36	3122
P89452	Major DNA-binding protein (Infected cell protein 8) (ICP8 protein)	DBP ICP8 UL29	1196
P89453	DNA polymerase catalytic subunit (EC 2.7.7.7) (EC 3.1.26.4)	UL30	1240
P89469	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase (dUTPase) (EC 3.6.1.23) (dUTP pyrophosphatase)	UL50	369
P89465	Envelope protein UL45 (18 kDa protein)	UL45	172
P08666	Envelope glycoprotein B (gB) (gB-2) (gB2)	gB UL27	904
Q69467	Envelope glycoprotein D (gD)	gD US6	393
P89475	Envelope glycoprotein E (gE) (gE-2)	gE US8	545
P13290	Envelope glycoprotein G (gG) (gG-2)	gG US4	699
P89445	Envelope glycoprotein H (gH)	gH UL22	638
P13291	Envelope glycoprotein I (gI)	gI US7	372
P13293	Glycoprotein J (gJ)	gJ US5	92
P22485	Glycoprotein K (gK) (Syncytial protein)	gK UL53	338
P28278	Envelope glycoprotein L (gL)	gL UL1	224
P89433	Envelope glycoprotein M (gM)	gM UL10	467
Q86539	Glycoprotein N (gN) (Protein UL495) (Protein UL49A)		87
P28277	Probable ATP-dependent helicase UL5 (EC 3.6.4.-)	UL5	881
P89431	DNA helicase/primase complex-associated protein (HEPA) (Primase-associated factor)	UL8	752
P28284	E3 ubiquitin-protein ligase ICP0 (EC 6.3.2.-) (VMW118 protein)	RL2	825
P89474	Transcriptional regulator ICP22 (Infected cell protein 22) (ICP22) (Immediate-early protein E68)	US1	413
P28276	Transcriptional regulator ICP27 (Infected cell protein 27) (ICP27) (Immediate-early protein E63) (VMW63)	UL54	512
P28283	Neurovirulence factor ICP34.5 (Infected cell protein 34.5) (p protein gamma(1)34.5)	RL1 ICP34.5	261
P14345	ICP47 protein (Infected cell protein 47) (Immediate-early protein IE12) (Immediate-early-5) (Vmw12) (US12 protein)	US12	86
P90493	Trans-acting transcriptional protein ICP4 (Infected cell protein 4) (Transcriptional activator IE175) (Alpha-4 protein)	ICP4 IE175 RS1	1318
P89446	Thymidine kinase (EC 2.7.1.21)	TK UL23	376
P13287	Serine/threonine-protein kinase (EC 2.7.11.1)	US3	481
P89436	Serine/threonine-protein kinase 2 (EC 2.7.11.1)	UL13	518
P89464	Membrane protein UL43	UL43	414
P28279	Nuclear phosphoprotein UL3	UL3	233
P28280	Nuclear protein UL4	UL4	201
P89432	Replication origin-binding protein (OBP) (OriBP)	UL9	867
P89463	DNA polymerase processivity factor (Polymerase accessory protein) (PAP) (DNA-binding protein UL42)	UL42	470
P89429	Portal protein UL6	UL6	678
P89471	DNA primase (EC 2.7.7.-)	UL52	1066
P89462	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit (R1) (EC 1.17.4.1) (Ribonucleotide reductase large subunit) (Ribonucleotide reductase 136 kDa subunit) (ICP10)	UL39	1142
P69521	Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain (R2) (EC 1.17.4.1) (Ribonucleotide reductase small subunit) (Ribonucleotide reductase 38 kDa subunit)	UL40	337
P89479	Probable RNA-binding protein	US11	151
P13294	Tegument protein UL11	UL11	96
P89437	Tegument protein UL14 homolog	UL14	219
P89467	Tegument protein UL47 (82/81 kDa tegument protein) (VMW82/81) (VP13/14)	UL47	696
P28281	Tegument protein UL55	UL55	186
P89430	Protein UL7	UL7	296
P89444	Protein UL21	UL21	532
P89447	Protein UL24	UL24	281

Accession	Protein names	Gene names	Length
P89470	Tegument protein UL51	UL51	244
P28282	Protein UL56	UL56	235
P28275	Uracil-DNA glycosylase (UDG) (EC 3.2.2.27) (UNG)	UL2	255
P13292	Protein US2	US2	291
P89476	Protein US8.5	US8.5	146
P89477	Envelope protein US9 (10 kDa protein)	US9	89
Q89730	Glycoprotein C	GC UL44	480
P68340	Virion host shutoff protein (Vhs) (EC 3.1.27.-)	UL41	492
P68336	Tegument protein VP16 (Alpha trans-inducing protein) (Vmw65) (ICP25) (Alpha-TIF)	UL48	490
P89461	Triplex capsid protein VP19C (Capsid protein VP19C)	ICP32 UL38 VP19C	466
P89468	Tegument protein VP22	UL49	300
P89438	UL15 protein	UL15	734
P89435	Deoxyribonuclease	UL12	620
P89448	Capsid associated tegument protein	UL25	585
P89442	Major capsid protein	UL19	1374
P89439	UL16 protein	UL16	372
P89456	UL33 protein	UL33	130
P89443	Integral membrane protein	UL20	222
P89473	RL2 protein	RL2	826
P90341	UL26.5 protein	UL26.5	329
P89478	Virion protein	US10	302
P89451	UL28 protein	UL28	785
P89455	UL32 protein	UL32	598
P89440	UL17 protein	UL17	702
P89458	Capsid protein	UL35	112
P89454	UL31 protein	UL31	305
P89457	Membrane associated phospho protein	UL34	276
P89460	Tegument protein	UL37	1114
P89441	Capsid protein	UL18	318
P89449	Protease	UL26	637

Fonte: Retirado de *The UniProt Consortium Database* <
<http://www.uniprot.org/uniprot/?query=Z86099&sort=score>> Acesso em: 10 de julho, 2010.

Nota: Essas informações são referentes à cepa "HG52", NCBI *Reference Sequence*: NC_001798, Genbank: 86099.

APÊNDICE C – Tabela de aminoácidos

Nome do aa	Abreviação	Letra	Trinca de Bases
Alanina	Ala	A	GCU/GCC/GCA/GCG
Arginina	Arg	R	CGU/CGC/CGA/CGG/AGA/AGG
Asparagina	Ans	N	AAU/AAC
Ácido aspártico	Asp	D	GAU/GAC
Cisteína	Cys	C	UGU/UGC
Glutamina	Gln	Q	CAA/CAG
Ácido glutâmico	Glu	E	GAA/GAG
Glicina	Gly	G	GGU/GGC/GGA/GGG
Histidina	His	H	CAU/CAC
Isoleucina	Ile	I	AUU/AUC/AUA
Leucina	Leu	L	UUA/UUG/CUU/CUC/CUA/CUG
Lisina	Lys	K	AAA/AAG
Metionina	Met	M	AUG
Fenilalanina	Phe	F	UUU/UUC
Prolina	Pro	P	CCU/CCC/CCA/CCG
Serina	Ser	S	UCU/UCC/UCA/UCG/AGU/AGC
Treonina	Thr	T	ACU/ACC/ACA/ACG
Tirosina	Tyr	Y	UAU/UAC
Triptofano	Trp	W	UGG
Valina	Val	V	GUU/GUC/GUA/GUG
<i>Start</i>	Met	M	AUG
<i>Stop</i>	-	-	UAA/UAG/UGA

APÊNDICE D – Recursos Humanos

NOME	FORMAÇÃO	TÍTULO	ÓRGÃO	ATIVIDADE
Tatiana Amaral Pires de Almeida	Farmacêutica-Bioquímica	Bacharelado	UFAM	Mestranda
Felipe Gomes Naveca	Microbiologista	Doutor	UFAM	Orientador
Maria da Graça Souza Cunha	Médica	Doutora	FUAM	Co-orientadora
Adele Schwartz Benzaken	Médica	Doutoranda	FUAM	Colaboradora
Felicien Gonçalves Vásquez	Estatístico	Mestre	FUAM	Estatístico
Valderiza Lourenço Pedrosa	Epidemiologista	Especialista	FUAM	Epidemiologia
Megumi Sadahiro	Enfermeira	Mestre	FUAM	Colaboradora
André Luiz Leturiondo	Farmacêutico-Bioquímico	Mestre	FUAM	Colaborador
Daniel Lúcio Rodrigues Dutra	Biólogo	Mestre	FUAM	Colaborador
Elaine de Araújo Veras	Farmacêutica-Bioquímica	Bacharelado	FUAM	Colaboradora
Matilde del Carmen Contreras	Analista Clínico	Bacharelado	FUAM	Colaboradora
Jairo de Souza Gomes	Técnico de Saúde 3ª classe	Técnico	FUAM	Colaborador
Paulo Tadeu Cavalcante Saif	Técnico em Patologia Clínica	Técnico	FUAM	Colaborador

APÊNDICE E – Custos Gerais

Material Permanente				
Item	Especificação	Quant.	Valor Unid. (R\$)	Valor Total (R\$)
1	Analisador genético de DNA	1	255.000,00	255.000,00
2	Balança analítica	2	3.500,00	7.000,00
3	Cabine de segurança biológica	2	18.000,00	36.000,00
4	Cuba de eletroforese	1	1.400,00	1.400,00
5	Espectrofotômetro	1	15.000,00	15.000,00
6	Estação de trabalho de DNA	1	5.300,00	5.300,00
7	Freezer	2	1.000,00	2.000,00
8	Impressora a laser	1	650,00	650,00
9	Micropipetas kit P10,P100 e P1000	2	2.700,00	5.400,00
10	Microcentrífuga refrigerada	1	20.000,00	20.000,00
11	Centrífuga de placa	1	35.000,00	35.000,00
12	Refrigerador	2	850,00	1.700,00
13	Termociclador	2	18.000,00	36.000,00
14	Sistema de ultrapurificação de água	2	33.000,00	66.000,00
15	Transiluminador	1	4.400,00	4.400,00
			Total:	R\$ 490.000,00
Material de Consumo				
Item	Especificação	Quant.	Valor Unid.	Valor Total
1	Agarose	1	700,00	700,00
2	Álcool comercial 1L	5	5,00	25,00
3	Azul de bromofenol, frasco 25g	1	100,00	100,00
4	Béquer 100mL	3	3,00	6,00
5	Materiais para purificação de DNA a partir de gel de agarose	1	1500,00	1.500,00
6	Canetas para vidrarias	5	2,50	12,50
7	Cartucho para impressora HP, colorido	2	120,00	240,00
8	Cartucho para impressora HP, preto	2	120,00	240,00
9	DNA polimerase de alta fidelidade	2	550,00	1.100,00
10	Reagentes para sequenciamento	1	3.000,00	3.000,00
11	Erlenmeyer 125mL	2	25,00	50,00
12	Gaze hidrófila, rolo	1	34,00	34,00
13	Glicerol 1L	1	200,00	200,00
14	Iniciadores	4	400,00	400,00
15	Isotiocianato de guanidina	1	370,00	370,00
16	Luva de procedimento, média, descartável, caixa c/ 100	3	20,00	60,00

17	Máscaras descartáveis, caixa c/ 50	3	10,00	10,00
18	Materiais plásticos (ponteiros, microtubos e tubos)	1	1.200,00	1.200,00
19	Padrão de peso molecular 100pb	1	220,00	220,00
20	Papel alumínio	2	6,00	12,00
21	Papel filme	2	7,50	15,00
22	Papel ofício, resma	3	18,00	54,00
23	Papel toalha, pacote com 2 rolos	4	10,00	40,00
24	Proveta 10mL	3	8,00	24,00
25	Swabs estéreis	5	20,00	100,00
26	SYBR® Safe	8	190,00	1.520,00
27	Fenol:clorofórmio	2	460,00	920,00
28	Isopropanol 1L	1	100,00	100,00
29	TAE 50X 1L	2	430,00	860,00
30	Solução tampão com EDTA 10x	2	298,95	597,90
31	Formamida Hi-Di 25mL	1	92,88	92,88
32	Polímero POP-7, frasco	3	502,12	1506,36
33	Placas ópticas, caixa	1	231,39	231,39
34	Big Dye sequencing buffer	1	772,04	772,04
35	Kit Big Dye de sequenciamento	1	2.600,00	2.600,00
36	Toucas descartáveis, caixa c/ 50	3	10,00	30,00
			Total:	R\$ 18.946,07
Bolsa <i>Strictu Sensu</i>				
Item	Especificação	Quant.	Valor Unid.	Valor Total
1	Bolsa do Programa Institucional de Apoio à Pós-Graduação <i>Strictu Sensu</i> (POSGRAD/FAPEAM)	24	1356,00	32.544,00
			Total:	32.544,00
			Total geral:	R\$541.487,07

Origem dos recursos

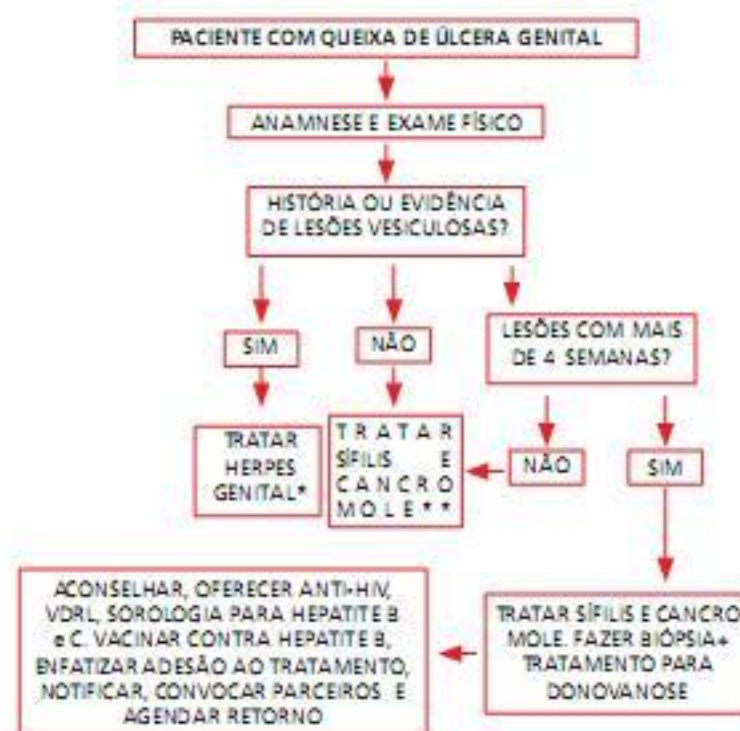
Esta dissertação integrou o Programa de Desenvolvimento Científico Regional da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (DCR/FAPEAM). sendo seu valor parcial coberto pela ajuda de custo prevista neste programa (itens em branco). Os itens em verde foram contrapartida da FUAM, sendo que os equipamentos foram adquiridos em projetos anteriores, portanto não impactando diretamente sobre o custo do presente projeto.

Os itens em azul pertencem ao ILMD/FIOCRUZ-AM e os itens em amarelo foram utilizados de ambas as Fundações.

A Mestranda foi bolsista do Programa Institucional de Apoio à Pós-Graduação *Strictu Sensu* (POSGRAD/FAPEAM).

Desta maneira o custo efetivo do presente projeto pode ser resumido aos itens de consumo e a bolsa de mestrado totalizando **R\$ 45.686,50**.

ANEXO 1 – Fluxograma Sindrômico – Síndrome de Úlceras Genitais



* Em casos de herpes, tratar sífilis se VDRL ou RPR forem reagentes, o que será visto no retorno. Se o quadro não é sugestivo de herpes, tratar sífilis e cancro mole.

** Se forem lesões ulcerosas múltiplas e soroprevalência de herpes for igual ou maior que 30% na região, deve-se tratar herpes concomitantemente à sífilis e cancro mole.

Retirado de: BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Manual de Controle Doenças Sexualmente Transmissíveis DST Série Manuais nº 68 / Ministério da Saúde**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. 4. ed. Brasília, 2006.

ANEXO 2 – Esquema de tratamento para herpes genital preconizado pelo Ministério da Saúde, 2006.

Para o 1º episódio de herpes genital, iniciar o tratamento o mais precocemente possível com:

- Aciclovir 200 mg, 4/4 hs, 5x/dia, por 7 dias ou 400 mg, VO, 8/8 horas, por 7 dias ou
- Valaciclovir 1 g, VO, 12/12, horas por 7 dias; ou
- Famciclovir 250 mg, VO, 8/8 horas, por 7 dias.

Nas recorrências de herpes genital, o tratamento deve ser iniciado de preferência ao aparecimento dos primeiros pródromos (aumento de sensibilidade, ardor, dor, prurido) com:

- Aciclovir 400 mg, VO, 8/8 horas, por 5 dias (ou 200 mg, 4/4hs, 5x/dia, 5 dias); ou
- Valaciclovir 500 mg, VO, 12/12 horas, por 5 dias; ou 1 g dose única diária, 5 dias ou
- Famciclovir 125 mg, VO, 12/12 horas, por 5 dias.

Casos recidivantes (6 ou mais episódios/ano) podem se beneficiar com terapia supressiva:

- Aciclovir 400 mg, 12/12 hs, por até 6 anos ou
- Valaciclovir 500 mg por dia por até 1 ano; ou
- Famciclovir 250 mg 12/12 hs por dia por até 1 ano.

Gestantes: tratar o primeiro episódio em qualquer trimestre da gestação.

Herpes e HIV: No caso de manifestações severas com lesões mais extensas, pensar na presença de infecção pelo HIV, quando se recomenda tratamento injetável:

- Aciclovir 5 a 10 mg por Kg de peso EV de 8/8 horas, por 5 a 7 dias, ou até resolução clínica.

Retirado de: BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Manual de Controle Doenças Sexualmente Transmissíveis DST Série Manuais nº 68 / Ministério da Saúde**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. 4. ed. Brasília, 2006.

**ANEXO 3 – Liberação pelo Comitê de Ética Em Pesquisa da Fundação
“Alfredo da Matta” (CEP/FUAM) para realização do “Projeto SUG”**

PARECER CONSUBSTANCIADO N.º 002/2008

Registro no CEP: 013/2007 FR – 16552 CAAE – 0015.0.266.000-07

I. IDENTIFICAÇÃO

Título do projeto: “Caracterização molecular dos agentes etiológicos das síndromes de úlceras genitais em pacientes atendidas na Fundação Alfredo da Matta”.

Pesquisador Responsável: Felipe Gomes Naveca

Instituição onde será realizada a pesquisa: Fundação Alfredo da Matta

GRUPO: III

Data da Reunião: 01.02.2008

II. OBJETIVOS

Geral:

- Caracterizar molecularmente todas as amostras de síndrome de úlcera genital detectadas em pacientes atendidos na Fundação Alfredo da Matta.

Específicos:

- Avaliar através de PCR multiplex as amostras de úlceras genitais de pacientes atendidos FUAM.
- Diferenciar amostras em tipo, subtipo ou genótipo segundo protocolos já estabelecidos.
- Desenvolver metodologias próprias para detecção e tipagem dos agentes etiológicos de úlceras genitais, baseadas em biologia molecular.
- Correlacionar os resultados do projeto com dados clínicos dos pacientes.


III. SUMÁRIO

As Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) são causadas por vários tipos de agentes infecciosos (bacterianos e virais), sendo transmitidas principalmente, pelo contato sexual com uma pessoa infectada. Algumas DSTs são facilmente tratadas e normalmente apresentam uma evolução clínica rápida para a cura. Outras necessitam de uma terapêutica mais complexa podendo persistir, mesmo com a aparente melhora dos pacientes.

O impacto das DSTs na saúde populacional pode ser estimado pelo grande número de novos casos e pela gravidade das seqüelas observadas em alguns pacientes acometidos de DST: infertilidade, abortos espontâneos, natimortos, carcinoma de colo uterino e peniano são alguns dos principais exemplos dos agravos causados pelas DSTs.

O Ministério da Saúde com o Programa de DST/Aids desde 1996 preconiza a abordagem sindrômica como política nacional de combate as DSTs e ao HIV. Com base no critério de classificação sindrômica são definidos quatro quadros: síndrome de corrimento uretral em homem, síndrome do corrimento vaginal, síndrome da dor pélvica e a síndrome das úlceras.

A síndrome da úlcera genital pode ser dividida em duas categorias de acordo com a morfologia e apresentação das lesões: úlcera genital com vesículas isoladas ou em forma de cacho, característica da infecção pelo vírus herpes tipo-2 (HSV-2); e as


 Felipe
 G. Naveca
 CR

úlceras genitais, sem antecedentes de lesão vesiculosa, causadas principalmente por agentes bacterianos observados nos casos da sífilis (*Treponema pallidum*), cancro mole (*Haemophilus ducreyi*), donovanose (*Klebsiella granulomatis*) e linfogranuloma venéreo (*Chlamydia trachomatis*).

O diagnóstico laboratorial dessas infecções é baseado em técnicas clássicas de microscopia (campo escuro, Gram, Tzanck), sorológicas (VDRL, FTA-Abs, ELISA) e de cultivo do agente infeccioso. Todas essas metodologias possuem limitações como baixa sensibilidade e em alguns casos pouca especificidade, no caso do cultivo a maior desvantagem está relacionada com a demora para a obtenção dos resultados.

A técnica de biologia molecular tem revolucionado não só o diagnóstico laboratorial como também as pesquisas com microorganismos difíceis ou impossíveis de serem cultivados. A biologia molecular permite a detecção específica de seqüências de DNA ou RNA e despontam como aquelas de maior especificidade e sensibilidade. A aplicação desta técnica para a pesquisa e caracterização molecular do vírus herpes humano, do *T. pallidum* e do *H. ducreyi* é o objetivo do estudo, permitirá uma maior compreensão dos casos de úlcera genital em pacientes atendidos na FUAM.

Material e Métodos:

- Estudo descritivo, prospectivo, transversal.
- Amostra: Todos os pacientes com quadro de úlcera genital atendidos no setor de Doenças Sexualmente Transmissíveis da Fundação Alfredo da Matta
- Critérios de inclusão: indivíduos de ambos os sexos, entre 12 a 65 anos, grávidas
- Critérios de exclusão: menores de 12 anos e os indivíduos que não aceitarem participar do estudo.

III. COMENTÁRIOS DO RELATOR REFERENTE À RESOLUÇÃO CNS 196/96 E COMPLEMENTARES.

Estrutura do protocolo: Adequado.

Retorno de benefícios para o sujeito e / ou comunidade: Adequado

Informação adequada quanto ao financiamento: Adequado

Lista de centros (para estudos multicêntricos): não se aplica

Cronograma de execução: Adequado.

Recursos humanos envolvidos e orçamento: Adequado.

Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido: Adequado.

V. PARECER DO CEP:

Aprovado

O pesquisador deverá enviar o relatório semestral e final para o Departamento de Ensino e Pesquisa da Fundação Alfredo da Matta e ao CEP.


Manaus, 18 de fevereiro de 2008



ROSILENE CONCEIÇÃO DA SILVA CRUZ
 Coordenadora do CEP - FUAM

ANEXO 4 – Liberação pelo Comitê de Ética Em Pesquisa da Fundação “Alfredo da Matta” (CEP/FUAM) para realização do “Projeto SUG” -2ª versão



ANEXO 5 – Ficha Clínica de Casos de DST e Testagem Sorológica da Fundação “Alfredo da Matta”


 Governo do Estado do Amazonas
 Fundação Alfredo da Matta
 Ficha Clínica de Casos de DST e Testagem Sorológica



Dados Pessoais	1 Nome do Paciente		2 Nº do Registro		
	3 Nome da Mãe:		4 Sexo: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> O		
	5 Data de nascimento:	6 Idade:	7 Escolaridade: <input type="checkbox"/> Analfabeto <input type="checkbox"/> 1ª a 4ª série <input type="checkbox"/> 5ª a 8ª série <input type="checkbox"/> 9ª série <input type="checkbox"/> Ensino Médio <input type="checkbox"/> Superior <input type="checkbox"/> Pós-graduação	8 Estado Civil: <input type="checkbox"/> Solteiro <input type="checkbox"/> Casado <input type="checkbox"/> Viúvo <input type="checkbox"/> Divorciado	9 Raça/Cor: <input type="checkbox"/> Branco <input type="checkbox"/> Preto <input type="checkbox"/> Amarelo <input type="checkbox"/> Pardo <input type="checkbox"/> Indígena
	10 Procedência: <input type="checkbox"/> Origem no mercado de trabalho <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Imigração <input type="checkbox"/> Retorno de viajantes <input type="checkbox"/> Retorno de estrangeiros <input type="checkbox"/> Retorno de militares <input type="checkbox"/> Retorno de presos		12 Ocupação:		
	13 Endereço:		14 Bairro:		
	15 Ponto de Referência:		16 Telefone:	17 Celular:	
	18 Endereço de Apoio:		19 Bairro:		
	20 Ponto de Referência:		21 Telefone:	22 Celular:	
	23 Resce próximo ao Centro de Saúde: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		24 Unidade PMB:		
	25 Possui tatuagem: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Outras: _____		26 Quantos(as) parceiros(as) tiveram sexo recentemente: <input type="checkbox"/> Nenhum <input type="checkbox"/> Um <input type="checkbox"/> Dois <input type="checkbox"/> Mais de dois		
Comportamento Sexual	27 Quantos(as) parceiros(as) eventuais nos últimos 3 meses: <input type="checkbox"/> Nenhum <input type="checkbox"/> Um <input type="checkbox"/> Dois <input type="checkbox"/> Três <input type="checkbox"/> Quatro <input type="checkbox"/> Cinco <input type="checkbox"/> Mais de cinco		28 Orientação Sexual: <input type="checkbox"/> Heterossexual <input type="checkbox"/> Homossexual <input type="checkbox"/> Bissexual <input type="checkbox"/> Transexual <input type="checkbox"/> Outra		
	29 Idade 1ª relação sexual: _____	30 Última relação sexual com preservativo (Dias): <input type="checkbox"/> 0 a 7 <input type="checkbox"/> 8 a 15 <input type="checkbox"/> 16 a 30 <input type="checkbox"/> 31 a 60 <input type="checkbox"/> Mais de 60		31 Uso do Preservativo: <input type="checkbox"/> Sempre <input type="checkbox"/> Às vezes <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> Não sei por que não uso	
	32 Motivo para procura da teste Anti-HIV: <input type="checkbox"/> Parceiro(a) assintomático(a) <input type="checkbox"/> Sintomas de DST <input type="checkbox"/> Sintomas de infecção sexualmente transmissível <input type="checkbox"/> Trabalho (serviço de alta risco) <input type="checkbox"/> Prática sexual sem proteção <input type="checkbox"/> Prática sexual com parceiros múltiplos <input type="checkbox"/> Uso de drogas injetáveis <input type="checkbox"/> Suspeita de infecção com orientação médica <input type="checkbox"/> Outras: _____				
	33 Encaminhado ao Ambulatório de DST por: <input type="checkbox"/> Parceiro(a) assintomático(a) <input type="checkbox"/> Sintomas de DST <input type="checkbox"/> Sintomas de infecção sexualmente transmissível <input type="checkbox"/> Trabalho (serviço de alta risco) <input type="checkbox"/> Prática sexual sem proteção <input type="checkbox"/> Prática sexual com parceiros múltiplos <input type="checkbox"/> Uso de drogas injetáveis <input type="checkbox"/> Suspeita de infecção com orientação médica <input type="checkbox"/> Outras: _____				
Acompanhamento	34 Já fez o teste de HIV antes? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		35 Local: <input type="checkbox"/> Serviço Público <input type="checkbox"/> Particular	36 Quantas vezes: _____	
	37 Data do último exame: _____				
	38 HDA: _____				
Dados da Consulta	39 Duração dos sintomas: _____ dias		40 Usou remédio para o problema antes? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	41 Nome do remédio: _____	
	42 Se não, informe o nome assimilar se sim: <input type="checkbox"/> Oral <input type="checkbox"/> Injetável <input type="checkbox"/> Outros: _____		43 Já tem indicação remédio? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sei <input type="checkbox"/> Não indica		
	44 Coceira - Masculina: <input type="checkbox"/> Coceira <input type="checkbox"/> Urticária <input type="checkbox"/> Vermelha <input type="checkbox"/> Outros: _____		45 Penís: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Comimento visível <input type="checkbox"/> Comimento crônico <input type="checkbox"/> Outros: _____		
	46 Se o comimento for visível: <input type="checkbox"/> Co <input type="checkbox"/> Branco <input type="checkbox"/> Amarelo <input type="checkbox"/> Verde <input type="checkbox"/> Outros: _____		47 Escudo e Região Perianal: <input type="checkbox"/> Úlcera <input type="checkbox"/> Compa <input type="checkbox"/> Normal		
Quais Masculinas	48 Região Inguinal: <input type="checkbox"/> Lesão crônica <input type="checkbox"/> Lesão aguda <input type="checkbox"/> Normal		49 Outros: _____		
	49 Comentários: _____				

<p>62 Que tipo de febre tem?</p> <input type="checkbox"/> Intermitente <input type="checkbox"/> Pl. intermitente <input type="checkbox"/> De P&O <input type="checkbox"/> Útil de febre <input type="checkbox"/> De 4 ondas <input type="checkbox"/> Sempre baixa <input type="checkbox"/> Outra: _____	<p>63 Que tipo de eritema tem?</p> <input type="checkbox"/> Eritema <input type="checkbox"/> Eritema maculoso <input type="checkbox"/> Eritema <input type="checkbox"/> Eritema febril <input type="checkbox"/> Outra: _____	<p>64 De que tipo de eritema tem?</p> <input type="checkbox"/> Eritema <input type="checkbox"/> Eritema maculoso <input type="checkbox"/> Eritema <input type="checkbox"/> Eritema febril <input type="checkbox"/> Outra: _____																																																						
			<p>65 Que tipo de febre tem?</p> <input type="checkbox"/> Intermitente <input type="checkbox"/> Pl. intermitente <input type="checkbox"/> De P&O <input type="checkbox"/> Útil de febre <input type="checkbox"/> De 4 ondas <input type="checkbox"/> Sempre baixa <input type="checkbox"/> Outra: _____	<p>66 Que tipo de eritema tem?</p> <input type="checkbox"/> Eritema <input type="checkbox"/> Eritema maculoso <input type="checkbox"/> Eritema <input type="checkbox"/> Eritema febril <input type="checkbox"/> Outra: _____	<p>67 De que tipo de eritema tem?</p> <input type="checkbox"/> Eritema <input type="checkbox"/> Eritema maculoso <input type="checkbox"/> Eritema <input type="checkbox"/> Eritema febril <input type="checkbox"/> Outra: _____																																																			
			<p>68 Que tipo de febre tem?</p> <input type="checkbox"/> Intermitente <input type="checkbox"/> Pl. intermitente <input type="checkbox"/> De P&O <input type="checkbox"/> Útil de febre <input type="checkbox"/> De 4 ondas <input type="checkbox"/> Sempre baixa <input type="checkbox"/> Outra: _____	<p>69 Que tipo de eritema tem?</p> <input type="checkbox"/> Eritema <input type="checkbox"/> Eritema maculoso <input type="checkbox"/> Eritema <input type="checkbox"/> Eritema febril <input type="checkbox"/> Outra: _____	<p>70 De que tipo de eritema tem?</p> <input type="checkbox"/> Eritema <input type="checkbox"/> Eritema maculoso <input type="checkbox"/> Eritema <input type="checkbox"/> Eritema febril <input type="checkbox"/> Outra: _____																																																			
<p>61 Exames Diretos:</p> <input type="checkbox"/> A. T. <input type="checkbox"/> Gram (Gram) <input type="checkbox"/> Gram de base <input type="checkbox"/> Imunofluorescência <input type="checkbox"/> Teste de Ambrósio <input type="checkbox"/> ZANCK <input type="checkbox"/> Papanicolaou <input type="checkbox"/> Líquido																																																								
<p>62 Achados dos Exames Diretos: 1-Positivo 2-Negativo 3-Não realizado</p> <input type="checkbox"/> Ig. direta com reag. antecorpos <input type="checkbox"/> Microsc. fluorescente com campo <input type="checkbox"/> Sabões prom. negativos (sugestão de H. d. urey <input type="checkbox"/> Corposcópico de Carbono <input type="checkbox"/> Imunofluorescência <input type="checkbox"/> ZANCK <input type="checkbox"/> Fungos <input type="checkbox"/> VB <input type="checkbox"/> Pt <input type="checkbox"/> Corposcópico de Carbono <input type="checkbox"/> Imunofluorescência <input type="checkbox"/> ZANCK <input type="checkbox"/> Fungos <input type="checkbox"/> VB <input type="checkbox"/> Pt																																																								
<p>63 BORDETIA</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Pos</th> <th>Neg</th> <th>nc</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>VDRL</td><td>()</td><td>()</td></tr> <tr><td>RPR</td><td>()</td><td>()</td></tr> <tr><td>FTA-ABS</td><td>()</td><td>()</td></tr> <tr><td>TPHA</td><td>()</td><td>()</td></tr> <tr><td>MHATP</td><td>()</td><td>()</td></tr> <tr><td>Chagas</td><td>()</td><td>()</td></tr> <tr><td>HIV</td><td>()</td><td>()</td></tr> <tr><td>HSV 1</td><td>()</td><td>()</td></tr> <tr><td>HSV 2</td><td>()</td><td>()</td></tr> <tr><td>MV 1 e 2</td><td>()</td><td>()</td></tr> </tbody> </table>	Pos	Neg	nc	VDRL	()	()	RPR	()	()	FTA-ABS	()	()	TPHA	()	()	MHATP	()	()	Chagas	()	()	HIV	()	()	HSV 1	()	()	HSV 2	()	()	MV 1 e 2	()	()	<p>64 CULTURA</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Pos</th> <th>Neg</th> <th>nc</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Carboidrato</td><td>()</td><td>()</td></tr> <tr><td>Leucócitos diretos</td><td>()</td><td>()</td></tr> </tbody> </table>	Pos	Neg	nc	Carboidrato	()	()	Leucócitos diretos	()	()	<p>65 BIOLOGIA MOLECULAR</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Pos</th> <th>Neg</th> <th>nc</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Exame de vírus</td><td>()</td><td>()</td></tr> <tr><td>Genótipo</td><td>()</td><td>()</td></tr> <tr><td>Citologia</td><td>()</td><td>()</td></tr> </tbody> </table>	Pos	Neg	nc	Exame de vírus	()	()	Genótipo	()	()	Citologia	()	()
Pos	Neg	nc																																																						
VDRL	()	()																																																						
RPR	()	()																																																						
FTA-ABS	()	()																																																						
TPHA	()	()																																																						
MHATP	()	()																																																						
Chagas	()	()																																																						
HIV	()	()																																																						
HSV 1	()	()																																																						
HSV 2	()	()																																																						
MV 1 e 2	()	()																																																						
Pos	Neg	nc																																																						
Carboidrato	()	()																																																						
Leucócitos diretos	()	()																																																						
Pos	Neg	nc																																																						
Exame de vírus	()	()																																																						
Genótipo	()	()																																																						
Citologia	()	()																																																						
<p>66 CITOLOGIA () Citopatologia () Histopatologia</p>																																																								
<p>67 Resultado da Citopatologia:</p> <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> NIC I <input type="checkbox"/> NIC II <input type="checkbox"/> NIC III/Carboidrato in situ <input type="checkbox"/> Corposcópico <input type="checkbox"/> Carcinoma com HPV <input type="checkbox"/> Múltiplos de tipo grande/incompleto																																																								
<p>68 Resultado Histopatológico: _____</p>																																																								
<p>69 Diagnóstico Sincronizado: _____</p>																																																								
<p>70 Diagnóstico Etiológico(s): _____</p>																																																								
<p>71 Tratamento: _____</p>																																																								
<p>72 Encaminhamento: <input type="checkbox"/> Acompanhamento <input type="checkbox"/> Encaminhamento ao PTM <input type="checkbox"/> Fatores <input type="checkbox"/> Outros: _____</p>																																																								
<p>73 Acompanhamento: _____</p> <p>Caro: _____ Profissional</p>	<p>74 Médico: _____</p> <p>Data: _____ Profissional</p>	<p>75 Enfermagem: _____</p> <p>Data: _____ Profissional</p>																																																						