



Padronização da metodologia para a investigação da atividade anti-HSV-1

Caroline Fernandes Marques (PIBIC/Fundação Araucária - UEM), Tania Ueda-Nakamura (Orientadora), e-mail: tunakamura@uem.br

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências da Saúde/Maringá,
PR

Área: Ciências da Saúde

Subárea: Farmácia

Palavras-chave: aciclovir, atividade antiviral, Herpes virus tipo 1

Resumo

O vírus Herpes simples tipo 1 (HSV-1) afeta grande parte da população em todo mundo, devido à sua fácil transmissão. O HSV-1 é um vírus envelopado com capacidade de estabelecer latência no hospedeiro, constituindo uma forma de escape do parasito à resposta imune. O tratamento consiste no emprego de análogos de nucleosídeos, como o aciclovir, que inibem a replicação do material genético viral, porém existe uma alta incidência de resistência, sendo assim, de elevada importância a busca de novos fármacos com atividade anti-herpética. E nesta busca, o aciclovir é utilizado como referência nos ensaios de atividade anti-HSV-1, portanto, é de grande importância o preparo adequado da solução estoque e a padronização dos demais procedimentos. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo padronizar o preparo da solução estoque do aciclovir utilizando diferentes solventes de modo a otimizar as metodologias empregadas no estudo de atividade antiviral: o método de inibição do efeito citopático e o ensaio de redução de placas.

Introdução

Os vírus são parasitas com ciclo de replicação exclusivamente intracelular, sem nenhum metabolismo ativo fora da célula hospedeira. Além disso, são constituídos por um genoma viral, envolvido por uma capa protéica, denominada capsídeo, formando um conjunto denominado nucleocapsídeo. Podem infectar células vegetais e animais causando danos irreparáveis ao



hospedeiro (Trabulsi *et al.*, 2008). O Herpes simplex (HSV) é um vírus envelopado que apresenta como genoma o DNA, pertencente à família Herpesviridae, e possui a capacidade de estabelecer infecções persistentes por toda a vida do hospedeiro. O Herpes simples tipo 1 (HSV-1) e tipo 2 (HSV-2) pertencem ao gênero *Simplexvirus*, sendo o primeiro associado à infecção da cavidade oral e o segundo associado à infecções do trato genital (Santos *et al.*, 2008).

O HSV-1 é transmitido pelo contato direto entre uma pessoa infectada e uma sadia, penetrando pelas mucosas ou pele lesionada. O tratamento consiste na aplicação de anti-sépticos e anestésicos tópicos nas lesões das mucosas, sendo também empregado o aciclovir e seus análogos por via oral ou tópica (CHIBO *et al.*, 2004).

O Aciclovir é um análogo de nucleosídeo com atividade antiviral contra o vírus herpes simplex (HSV), varicela-zoster (VZV), Epstein-Barr (EBV), citomegalovírus (CMV) e herpes vírus humano 6 (HHV-6) (WAGSTAFF, 1994). Seu mecanismo de ação consiste em inibir seletivamente a replicação do DNA viral com baixa toxicidade para a célula hospedeira. Dessa forma, o aciclovir reduz significativamente a síntese de DNA na célula infectada pelo vírus, dificultando sua multiplicação (COSTA, 2007).

Existe um grande número de pesquisas que buscam encontrar uma droga alternativa no tratamento de HSV-1 em casos de resistência. Para a padronização das metodologias, o emprego de uma droga referência é fundamental. No intuito de padronizar as metodologias, este trabalho teve como objetivo comparar o efeito da atividade antiviral do aciclovir quando este é dissolvido em diferentes solventes.

Materiais e métodos

Cultivo e manutenção de células e vírus e atividade antiviral

Foram utilizadas células Vero (ATCC[®] CCL81[™]) e vírus HSV-1 cepa KOS (ATCC[®] VR-1493D[™]), AR-29 e um isolado clínico para realização dos experimentos. Os ensaios de atividade antiviral foram realizados em placas de 96 e 24 poços, em triplicatas. As placas de 96 poços foram coradas com uma solução de 4% de sulforrodamina B (Sigma[®]) em ácido acético e a leitura efetuada em leitor de ELISA. E as placas de 24 poços foram fixadas com formaldeído 10% e coradas com cristal violeta para a contagem das placas de lise.

Soluções Estoque

Três soluções estoque distintas de aciclovir (10.000 µg/ml) foram preparadas: (1) SEA (aciclovir dissolvido em água destilada estéril); (2) SED



(aciclovir dissolvido em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM – GIBCO®); (3) SEP (aciclovir dissolvido em PBS, pH 7,2).

Resultados e Discussão

Nos ensaios em placas de 96 poços realizados com a cepa KOS não foi possível encontrar um valor exato de EC_{50} , pois o aciclovir protegeu até a menor concentração testada. Portanto, podemos afirmar que o EC_{50} foi menor que $0,03125 \mu\text{g/ml}$ para todos os solventes testados. Já nos experimentos com placas de 24 poços o EC_{50} encontrado foi na concentração de $0,25 \mu\text{g/ml}$ para os três solventes. Essa variação nos valores de EC_{50} , provavelmente, está relacionada à diferença das metodologias, mas o resultado foi o mesmo para os três solventes, indicando que a atividade do aciclovir permaneceu inalterada.

Nos experimentos realizados em placas de 96 poços com a cepa AR-29 e com o isolado clínico, ambos resistentes ao tratamento com aciclovir, foi possível observar pequenas variações no EC_{50} de acordo com o solvente utilizado. Aparentemente, os valores obtidos (EC_{50}) com a dissolução do aciclovir em água são maiores do que com os outros solventes, DMEM ou PBS (Figura 1).

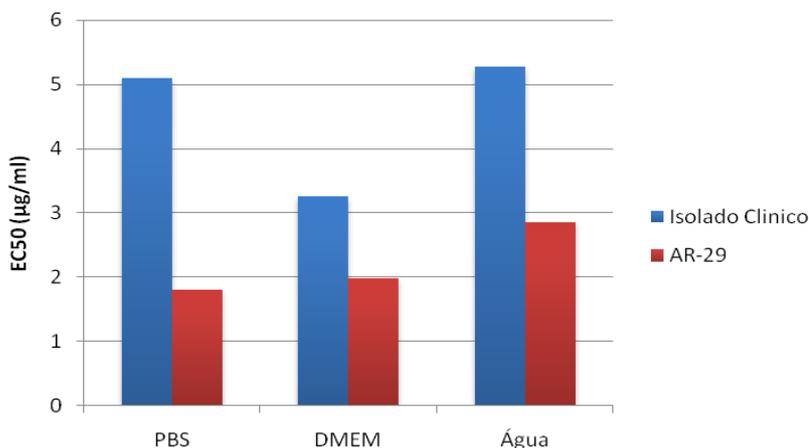


Figura 1 - Comparação dos valores de EC_{50} do aciclovir dissolvido em água, DMEM e PBS. EC_{50} = concentração que inibiu 50% da infecção viral; AR-29 (cepa de HSV-1 aciclovir-resistente).



Conclusões

Analisando os resultados podemos concluir que a dissolução do aciclovir em qualquer um dos solventes testados utilizando-se a cepa KOS (aciclovir-sensível) não interferiu na atividade do agente antiviral. Para as cepas aciclovir-resistentes, verificamos resultados semelhantes. Assim, a droga referência pode ser dissolvida diretamente no meio DMEM sem alterar a sua atividade. Este procedimento, ou seja, a dissolução do aciclovir em DMEM é vantajoso em relação ao uso da água ou PBS como solvente, pois evita a alteração da composição do meio de cultura durante o procedimento de diluição seriada da droga.

Agradecimentos

CNPq, Fundação Araucária, CAPES/PNPD, PPG e Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Referências

CHIBO, D.; DRUCE, J.; SASADEUSZ, J.; BIRCH, C. Molecular analysis of clinical isolates of acyclovir resistant herpes simplex virus. **Antiviral Research**, v.61, p. 83-91, 2004.

COSTA, M. N.. Estudo do mecanismo de ação de derivados aminoalcoois e de derivados do sistema tienopiridina na replicação in vitro do vírus herpes simples tipo I. Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2007.

SANTOS, N. S. O., ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D.. **Introdução a virologia humana**. 2 ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

TRABULSI, L.R. et al.. **Microbiologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008.

WAGSTAFF, A.J.; FAULDS, D.; GOA, K.L. Acyclovir: a reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. **Drugs**, v.47, p.153-205, 1994.