



**MODELAGEM MOLECULAR DA TIMIDINA QUINASE: UM IMPORTANTE ALVO
TERAPÊUTICO NO VÍRUS *HERPES SIMPLEX* E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA**

ANA ELISA GUIMARÃES DA SILVA

Macaé
Dezembro de 2013

ANA ELISA GUIMARÃES DA SILVA

Modelagem molecular da timidina quinase: um importante alvo terapêutico no Vírus
Herpes Simplex e avaliação da resistência.

Monografia Apresentada ao Curso de Farmácia
da Universidade Federal do Rio de Janeiro
como um dos requisitos para obtenção do título
de farmacêutico

Orientadora: Prof^a Paula Alvarez Abreu

Macaé
Dezembro de 2013

da Silva, Ana Elisa Guimarães

Modelagem Molecular da Timidina Quinase: um Importante Alvo Terapêutico no Vírus *Herpes Simplex* e Avaliação da Resistência / Macaé, RJ, 2013

Orientadora: Paula Alvarez Abreu

61 páginas

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Macaé 2013.

1. Vírus *Herpes simplex*. 2. Modelagem molecular. 3. Resistência ao aciclovir. I. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Faculdade de Farmácia. I. Título

AGRADECIMENTOS

À minha “grande” família, pelo amor e apoio de sempre.

Aos meus pais Clea Guimarães e José Carlos da Silva, que todos os dias me ouviram, me ligaram, se interessaram pelas minhas glórias e pelas minhas tristezas durante todo esse tempo.

Ao meu namorado Thiago Chelles, que por tantas vezes suportou minhas inquietudes e esteve ao meu lado.

Aos amigos queridos, de perto e de longe, a minha eterna gratidão por entenderem que nem sempre podia estar junto à eles.

Aos meus colegas de Laboratório de Modelagem Molecular e Pesquisa em Ciências Farmacêuticas (Lamcifar), pelo apoio e companheirismo.

À minha orientadora Paula Alvarez Abreu, pela sua orientação, pela sua paciência, compreensão e confiança.

Aos meus mestres e amigos, muito obrigada pelo conhecimento, pelo apoio e pela amizade. Vocês são os profissionais que me inspiram.

À banca por ter aceitado avaliar este trabalho.

A todos que já falei, agradeço por acreditarem no meu potencial, na minha profissão, nas minhas ideias, nos meus sonhos, principalmente quando nem eu mais acreditava.

Senhor, obrigada pelo fim de mais essa etapa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do vírus <i>Herpes simplex</i> (HSV).	12
Figura 2: Diferentes manifestações clínicas causadas pelo HSV em indivíduos saudáveis e em imunocomprometidos.	14
Figura 3: Enzima timidina quinase de HSV-1 complexada com o aciclovir.	17
Figura 4: Inibidores da timidina quinase usados no tratamento de infecções causadas pelo HSV.	17
Figura 5: Mecanismo de ação do antiviral aciclovir.	19
Figura 6: Métodos para o planejamento de novos fármacos.	23
Figura 7: Alinhamento da estrutura primária da timidina quinase de HSV-1 e de HSV-2.	30
Figura 8: Validação do modelo da TK de HSV-2 através do uso do gráfico de Ramachandran.	32
Figura 9: Avaliação da compatibilidade 3D-1D da TK de HSV-2.	33
Figura 10: Score-Z das estruturas de timidina quinase de HSV-1 e de HSV-2.	33
Figura 11: Avaliação da energia dos resíduos de aminoácidos do modelo de TK de HSV-2 e do molde (HSV-1).	34
Figura 12: Estrutura 3D do molde da timidina quinase de HSV-1 e do modelo de HSV-2 e comparação do mapa de potencial eletrostático das enzimas dos dois vírus.	35
Figura 13: <i>Redocking</i> do aciclovir na enzima TK de HSV-1 utilizando diferentes estratégias.	36
Figura 14: <i>Dockings</i> do aciclovir na enzima TK de HSV-2 utilizando diferentes estratégias.	37
Figura 15: Sobreposição do aciclovir, ganciclovir e penciclovir na TK _{HSV-1} e principais resíduos de aminoácidos de TK _{HSV-1} que interagem com tais inibidores.	40
Figura 16: <i>Docking</i> do aciclovir, ganciclovir e penciclovir com a TK _{HSV-2} e principais resíduos de aminoácidos de TK _{HSV-2} que interagem com tais inibidores.	42
Figura 17: Estrutura da brivudina (BVDU).	43

Figura 18: *Docking* do BVDU com a TK_{HSV-2} em comparação com a estrutura cristalográfica da enzima de HSV-1. 44

Figura 19: Enzimas timidina quinase selvagem e mutantes, com destaque para os resíduos substituídos nas enzimas mutantes de HSV-1. 46

Figura 20: Mapas do *score-Z* das estruturas de timidina quinase de HSV-1 selvagem e mutantes, fornecidos pelo ProSA-web. 48

Figura 21: Mapas de potencial eletrostático da timidina quinase de HSV-1 selvagem e mutantes. 50

Figura 22: *Dockings* do aciclovir com as enzimas timidina quinase mutantes de HSV-1 em comparação com a estrutura do aciclovir originalmente presente na estrutura cristalográfica. 52

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1:** Resíduos da timidina quinase de HSV-1 e HSV-2 que interagem com anti-herpéticos. 41
- Quadro 2:** Resíduos da timidina quinase de HSV-1 e HSV-2 que interagem com BVDU. 44
- Quadro 3:** Resíduos de aminoácidos mutados na timidina quinase de HSV-1 relacionados à resistência ao aciclovir. 45
- Quadro 4:** Interações proteína-ligante obtidas a partir do complexo formado no *docking*. 53

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Comparação entre as diferentes estratégias de *redocking* da TK_{HSV-1}. **38**
- Tabela 2:** Comparação entre as diferentes estratégias de *docking* da TK_{HSV-2}. **36**
- Tabela 3:** Percentual de resíduos nas regiões favoráveis, permitidas e desfavoráveis do gráfico de Ramachandran da enzima timidina quinase de HSV-1 selvagem e dos mutantes. **47**
- Tabela 4:** Avaliação da compatibilidade 3D-1D dos modelos de timidina quinase mutantes de HSV-1 e percentual de resíduos com *score* maior que 0,2 no Verify-3D. **49**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

a.C. Antes de Cristo

ACV Aciclovir

ATP Adenosina trifosfato

CMV Citomegalovírus

DNA Ácido desoxirribonucleico

EBV Vírus Epstein-Barr

HSV Vírus Herpes simplex

HHV Herpesvírus humano

HIV Vírus da imunodeficiência humana

NCBI *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional de Informação para Biotecnologia)

NIH *National Institutes of Health* (Instituto Nacional de Saúde)

OH Hidroxila

PDB *Protein Data Bank* (Banco de Dados de Proteínas)

RMN Ressonância magnética nuclear

RMSD *Root mean square deviation* (desvio médio da raiz quadrada)

RMSref desvio raiz média quadrada de referência

SPDBV *Swiss PDB Viewer*

TK Timidina quinase

VVZ Vírus Varicela-Zoster

SUMÁRIO

1 Introdução	12
1.1 Timidina quinase: um importante alvo terapêutico em infecções por HSV .	16
1.2 Resistência do HSV aos fármacos antivirais	19
1.3 Epidemiologia da infecção por HSV resistente	21
1.4 Modelagem molecular como ferramenta para estudo de antivirais	22
2 Justificativa	25
3 Objetivos	26
3.1 Objetivos gerais	26
3.2 Objetivos específicos	26
4 Materiais e Métodos	27
4.1 Construção do modelo da enzima timidina quinase de HSV-2	27
4.2 Avaliação das interações do aciclovir e de análogos com a timidina quinase de HSV-1 e de HSV-2	27
4.3 Construção dos modelos dos mutantes da enzima timidina quinase de HSV-1	29
4.4 Avaliação das interações do aciclovir com as enzimas timidina quinases mutantes de HSV-1	29
5 Resultados e Discussão	30
5.1 Construção do Modelo de Timidina Quinase de HSV-2	30
5.2 Análise interações do aciclovir e de seus análogos com a timidina quinase de HSV-1 e HSV-2	35
5.2.1 Análise das interações da brivudina com a timidina quinase de HSV-1	43
5.3 Modelos dos mutantes da enzima timidina quinase de HSV-1	45
5.4 Avaliação das interações do aciclovir com as enzimas timidina quinases mutantes de HSV-1	51
6 Conclusão	55
7 Referências	56

RESUMO

A infecção pelo vírus herpes simplex (HSV) atinge cerca de um terço da população mundial e pode ser causada pelo vírus HSV-1, associado à doença oral e HSV-2 à doença genital. O tratamento padrão é o aciclovir (ACV) e análogos que inibem a timidina quinase (TK). Essa enzima converte o ACV em ACV monofosfato que é convertido em di- e trifosfato por quinases celulares. Na forma trifosfatada, inibe a DNA polimerase viral, impedindo o alongamento do DNA viral. Resistência ao ACV tem sido observada na clínica, especialmente por alterações na TK. O objetivo do trabalho é avaliar as interações do ACV e análogos com a TK de HSV-1 e HSV-2 e as interações do ACV com as enzimas mutantes de HSV-1 para entender a relação com a resistência. A estrutura 3D da TK de HSV-2 foi construída no programa *Swiss Model* usando a modelagem comparativa e foram construídos modelos das TKs mutantes usando o programa *Swiss PDB Viewer*. As estruturas foram minimizadas, validadas e foram realizados estudos de *docking* usando o programa *Autodock 4.2* para avaliar os modos de ligação do ACV e análogos com as enzimas. Os resultados mostraram que o ACV, ganciclovir e penciclovir interagiram de forma semelhante com a TK de HSV-1 e HSV-2, enquanto a brivudina, que tem maior afinidade pela enzima de HSV-1 do que HSV-2, apresentou um modo de ligação semelhante ao ACV na enzima de HSV-1, mas ocupou um sítio diferente na de HSV-2, o que pode explicar o perfil de atividade diferente desta. A análise do encaixe do ACV com as enzimas mutantes também mostrou um modo de ligação e interação com resíduos diferentes, o que pode justificar a resistência ao ACV nestas enzimas. Este estudo trouxe uma nova perspectiva sobre a resistência do HSV ao ACV e pode auxiliar no planejamento de novos fármacos para herpes.

Palavras-chave: Vírus *Herpes simplex*, Timidina quinase, Resistência, Aciclovir, Modelagem Molecular.

ABSTRACT

The infection with herpes simplex virus (HSV) affects about a third of the world's population and can be caused by HSV-1, associated with oral disease and HSV-2 with genital disease. The standard treatment is acyclovir (ACV) and analogs which inhibit the thymidine kinase (TK). This enzyme converts the ACV in ACV monophosphate, which is converted to di- and triphosphate by cellular kinases. In triphosphate form it inhibits viral DNA polymerase, preventing DNA elongation. Viral strains resistant to ACV has been observed in the clinic, especially by changes in TK. The aim of this work is to evaluate the interactions of ACV and analogs with TK of HSV-1 and HSV-2 and the acyclovir interactions with the mutant enzymes of HSV-1 in order to understand the relationship with the resistance. The 3D structure of TK of HSV-2 was constructed using comparative modeling and the Swiss Model program and the mutant enzymes of HSV-1 were also constructed using Swiss PDB Viewer program. The structures were minimized, validated and the docking studies were performed using the AutoDock 4.2 program to assess the binding modes of ACV and analogs with the enzymes. The results showed that ACV, ganciclovir and penciclovir interacted in a similar manner with TK of HSV-1 and HSV-2, while the brivudine, that present higher affinity for TK of HSV-1 than TK of HSV-2 showed a similar binding mode than ACV in TK of HSV-1, but occupied a different site in TK of HSV-2, which may explain the different activity profile. The examination of the dockings of the ACV with the mutant enzymes also showed a different binding mode and interactions with different residues, which may explain the ACV resistance in these enzymes. This study has brought a new perspective on the resistance of HSV to ACV and may help in designing new drugs.

Keywords: Herpes simplex virus, thymidine kinase, Acyclovir-resistance, Molecular Modeling

1 INTRODUÇÃO

Vírus são considerados seres vivos, no entanto, não estão inseridos em nenhum reino. São acelulares, não possuem metabolismo próprio, permanecendo inertes quando fora de célula viva e são considerados parasitas intracelulares obrigatórios (SCHMIDT *et al.*, 2005).

O vírus herpes simplex (HSV) pertence à família *Herpesviridae* e a subfamília *Alphaherpesvirinae*. Atualmente já foram identificados mais de 80 tipos de herpesvírus, no entanto, apenas oito deles são agentes responsáveis por patologias em humanos que são: vírus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1), vírus Herpes simplex tipo 2 (HSV-2), citomegalovírus (CMV), vírus Epstein-Barr (EBV), vírus varicela-zoster (VVZ), herpesvírus humano 6 e 7 (HHV-6 e HHV-7), além do herpesvírus associado ao Sarcoma de Kaposi (HHV-8) (VARELLA *et al.*, 2005; FATAHZADEH e SCHWARTZ, 2007).

A estrutura do HSV é composta por uma cadeia dupla de DNA, revestida por um capsídeo icosaédrico, que envolve o DNA, formado por 162 capsômeros e um envelope lipídico, que impede a lise mediada por éter, formol ou fenol. Além disso, o HSV é termolábil a 56 °C, e é parcialmente inativado por radiação ultravioleta. Mede cerca de 150 a 300 nm de diâmetro, sendo considerado um vírus grande (LUPI *et al.*, 1995). O capsídeo é circundado por uma substância amorfa (tegumento) e o DNA dos herpesvírus é composto principalmente por bases pirimidínicas (Figura 1) (PENELLO *et al.*, 2010).

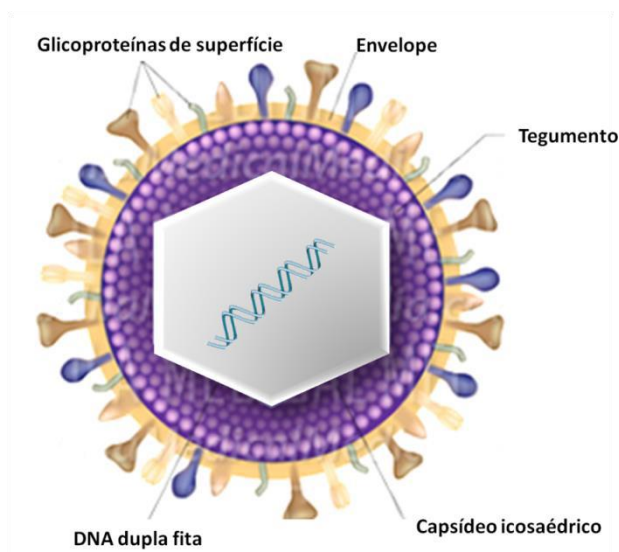


Figura 1: Estrutura do vírus Herpes simplex (HSV). Adaptado de: ALILA, 2013.

No genoma do HSV existem sequências para codificação de cerca de 84 diferentes polipeptídeos com funções variadas. Grande parte destes polipeptídeos está relacionada à replicação viral e os demais estão envolvidos no reconhecimento celular, alteração do metabolismo celular, entre outras funções indispensáveis para o vírus (WARD e ROIZMAN, 1994; WHITLEY e ROIZMAN, 2001; ABREU, 2011a).

Os primeiros relatos da doença causada pelo HSV foram feitos pelo médico grego Hipócrates (460 a 377 a.C.), que documentou as lesões nomeando-as *herpes*, que é uma palavra derivada do grego *herpein* que significa rastejar e réptil, e foi assim denominada devido à característica vesicular das lesões. Heródoto (484 a 425 a.C.), um historiador da Grécia, denominou a doença como *herpes febrilis*, por causar febre, pequenas vesículas e ulcerações labiais. Posteriormente, o farmacêutico e médico grego Galeno (129 a 204 a.C.), acreditava que as lesões herpéticas eram uma forma do corpo liberar humores malignos e denominou-as de *excretinas* herpéticas. No entanto, apenas no início do século XX os estudos sobre a doença foram expandidos, devido ao surgimento de novas técnicas e culturas de células (WIGG e MIRANDA, 2008).

Infecções orais e genitais são as manifestações clínicas mais comuns relacionadas ao HSV, sendo os tipos HSV-1 e HSV-2 os principais causadores respectivamente (Figura 2). Como sintomas primários da infecção por HSV pode-se incluir manifestações semelhantes à gripe, tais como febre, dor de cabeça e mialgia, além dos sintomas locais como lesões, pápulas dolorosas e ulcerações (HARDIN, 1996). É comum formigamento, ardência e prurido antecedendo o aparecimento das lesões (GUIA MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). O nível de gravidade e duração das infecções por herpesvírus dependem principalmente da imunocompetência do indivíduo e da presença ou ausência de anticorpos para esses vírus (MARTINHO, 2003).

O HSV-1 causa erupções recorrentes nos lábios, gengivostomatites, feridas, ceratoconjuntivite, e encefalite, e é considerada a causa mais frequente de encefalite necrosante esporádica (SCHELD *et al.*, 2004; ABREU *et al.*, 2011b). O HSV-2 infecta mais frequentemente a região genital, representando uma das causas mais comuns de doenças sexualmente transmissíveis no mundo. O HSV-2 raramente aparece antes do início da atividade sexual (FERREIRA *et al.*, 2011). Manifestações mais severas podem ser observadas em neonatos e indivíduos imunocomprometidos,

incluindo pacientes transplantados e HIV-positivos. Nesses pacientes, as manifestações causadas pelo herpes podem variar de vesículas limitadas às regiões orofacial e genital até doença disseminada em pele e mucosas, além de frequente acometimento do sistema nervoso central, com possíveis sequelas em cerca de 80% desses pacientes (VARELLA *et al*, 2005).

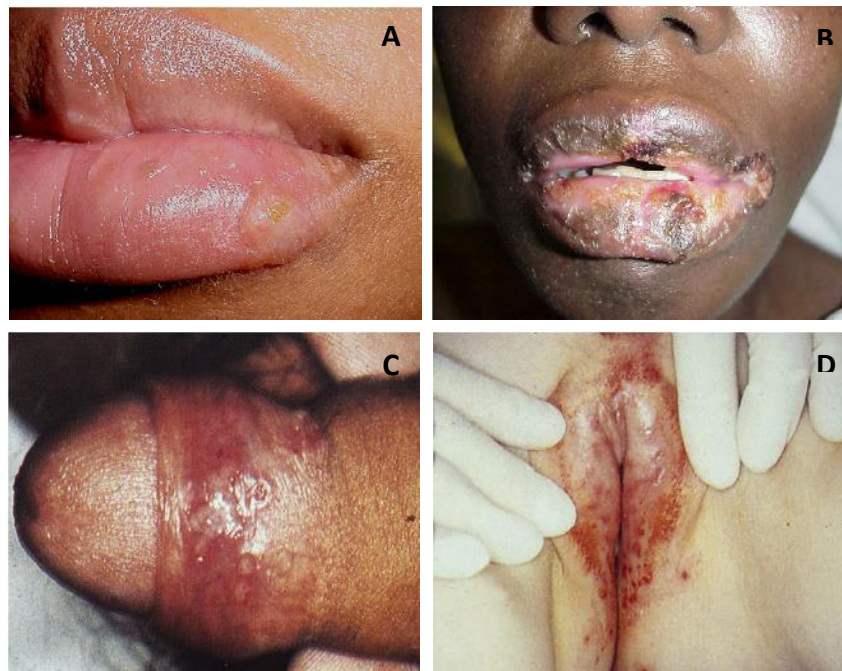


Figura 2: A) Herpes labial recorrente em indivíduo saudável. B) Herpes labial recorrente em indivíduo imunocomprometido. C) Herpes genital em homem imunocompetente. D) Herpes genital em mulher imunocomprometida. (Adaptado de FATAHZADEH e SCHWARTZ, 2007)

O herpes é uma das infecções humanas mais comuns atingindo aproximadamente um terço da população mundial. Segundo o Ministério da Saúde (2010), de 50 a 90% dos adultos têm anticorpos circulantes contra HSV-1 e 20 a 30%, contra HSV-2. Em relação ao herpes genital, a incidência anual da doença nos Estados Unidos é de 1,75 em cada 1.000 habitantes, enquanto na Inglaterra é de cerca de um para 1.000 habitantes (PENELLO *et al*, 2010). A exposição ao HSV é universal, com uma prevalência de 50 a 80% em países ocidentais (NETCHIPOROUK *et al.*, 2013)

De acordo com dados epidemiológicos, o HSV-1 é a principal causa de encefalite esporádica, enquanto o HSV-2 causa um tipo de meningite asséptica benigna (SCHELD *et al.*, 2004). Cerca de um terço de todos os casos de encefalite

herpética ocorre em crianças e adolescentes e, apesar de rara, a mortalidade é de 70% na ausência de tratamento e de 20-30% na presença da terapia antiviral disponível. Mesmo com a introdução precoce da terapia, cerca de dois terços dos sobreviventes apresentam déficit neurológico residual significativo e podem ter recidivas após o tratamento (WHITLEY e ROIZMAN, 2001; ORVEDAHL e LEVINE, 2008).

A transmissão do HSV se dá pelo contato direto com mucosas e pele com lesões e, com menor frequência, através de objetos contaminados. No entanto, a transmissão também pode ocorrer através do paciente assintomático. Nos casos de herpes genital, a transmissão geralmente ocorre pelo contato sexual, mas pode também ser transmitido da mãe para o filho durante o parto (PENELLO *et al*, 2010).

O período de incubação, em humanos, varia de 1 a 26 dias, com uma média de 7 dias, no entanto, em vários casos, esse período pode ser mais longo e de difícil precisão (LUPI *et al.*, 1995). Após a transmissão do vírus, este multiplica-se no local da inoculação, difunde-se através dos nervos sensitivos, de vasos linfáticos ou, com menor frequência, pelo sangue circulante, e fica latente nos neurônios sensoriais (MARTINHO, 2003). A infecção pelo vírus inicia-se, geralmente, na pele ou epitélio da mucosa e pode ser assintomática ou produzir infecção aguda, crônica ou latente, podendo ser reativada ao longo da vida do hospedeiro (WHITLEY e ROIZMAN, 2001; LUCERO *et al.*, 2006). O fenômeno da recorrência é desencadeado por estímulos como estresse, trauma, febre e raios ultravioleta que ativam a replicação viral permitindo que o vírus seja transportado através do nervo formando lesões sempre no mesmo dermatomo e mesma localização (BRADY e BERNSTEIN, 2004).

Estudos mostram a existência de uma interação importante entre HSV e HIV-1. A presença de HSV-2 aumenta o risco de aquisição de HIV e pode acelerar a progressão da doença pelo HIV por causar doença ulcerativa no trato genital (WHITLEY e ROIZMAN, 2001; CELUM *et al.*, 2004; CLEMENS e FARHAT, 2010). Em pacientes com imunodeficiência, incluindo a infecção por HIV ou infecção associada a transplante, o HSV-1 pode levar à morte (HUSSIN *et al.*, 2013).

Algumas estratégias são bastante eficazes para a prevenção da transmissão do HSV, incluindo evitar o contato com as lesões e uso de métodos de barreira (GUPTA *et al.*, 2007; PENELLO *et al.*, 2010). Além disso, ações educativas para o público sobre infecções por HSV e suas complicações são importantes tanto para a

prevenção como para o tratamento de infecções por esse tipo de vírus em todo o mundo (CONDE-GLEZ *et al.*, 2013). Pessoas com doença sintomática causada pelo HSV-2 devem ser aconselhadas a se abster de atividade sexual se as lesões estiverem presentes e usar preservativos em todas as outras relações sexuais (GUPTA *et al.*, 2007). O uso de preservativo está associado a uma redução de cerca de 50% na infecção pelo HSV-2, porque as lesões podem estar presentes em região da mucosa genital que não está coberta por ele. Por isso, o preservativo somente pode reduzir o risco de transmissão do herpes genital quando envolve todas as lesões (PENELLO *et al.*, 2010).

A vacinação é outra estratégia de prevenção em potencial (RILEY, 1998). Para isso, esforços têm sido feitos no sentido do desenvolvimento de vacinas para o combate de infecções herpéticas. O *National Institutes of Health* (NIH), nos Estados Unidos, está realizando testes para uma vacina contra o HSV-2. A vacina só tem mostrado ser eficiente para mulheres que nunca foram expostas ao HSV-1. A vacina tem 48% de eficiência em prevenir a contaminação por HSV-2. No entanto, a vacina não mostrou evidências de prevenir a infecção HSV-2 em homens (PENELLO *et al.*, 2010).

Herpes é uma doença que não tem cura, existindo, contudo, alguns tratamentos que melhoram a situação do indivíduo, acelerando o processo de cicatrização das vesículas formadas e diminuindo o período de manifestação da doença, ou aumentando o tempo entre as recidivas (MARTINHO, 2003).

1.1 Timidina quinase: um importante alvo terapêutico em infecções por HSV

Algumas proteínas codificadas pelo vírus tais como a timidina quinase e a DNA polimerase são diferentes das enzimas celulares, constituindo-se em bons alvos para fármacos antivirais. A timidina quinase é capaz de catalisar a fosforilação da timidina, sendo este processo essencial para a replicação viral. Já a DNA polimerase catalisa a polimerização de desoxirribonucleotídeos em uma fita de DNA (LUPI *et al.*, 1995).

A enzima timidina quinase possui duas subunidades idênticas, compostas por 376 aminoácidos cada uma (Figura 3). Possui também três locais importantes para sua atividade catalítica: um sítio de ligação do ATP (aminoácidos 51 a 63), um sítio

de ligação dos nucleosídeos (aminoácidos 168 a 176) e uma cisteína na posição 336 (DARBY *et al.*, 1986; FROBERT *et al.*, 2007b).

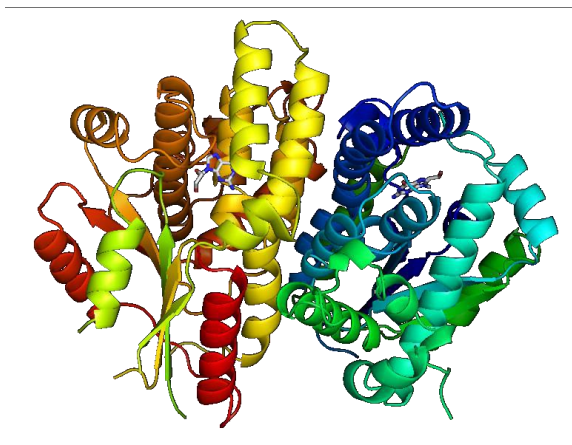


Figura 3: Estrutura tridimensional da enzima timidina quinase de HSV-1 complexada com o aciclovir.

A partir da década de 1980, o aciclovir e seus análogos (valaciclovir, valganciclovir, fanciclovir ganciclovir e penciclovir) tornaram-se o tratamento de primeira escolha para a profilaxia e tratamento das infecções por HSV do tipo 1 e 2 (Figura 4) (SUPERTI *et al.*, 2008; PIRET e BOIVIN, 2011). O aciclovir [9-(2-hidroxi-etoximetil) guanina] é um análogo de nucleosídeo acíclico sintético. (WHITLEY e ROIZMAN, 2001; DE CLERCQ e HOLY, 2005; SUPERTI *et al.*, 2008).

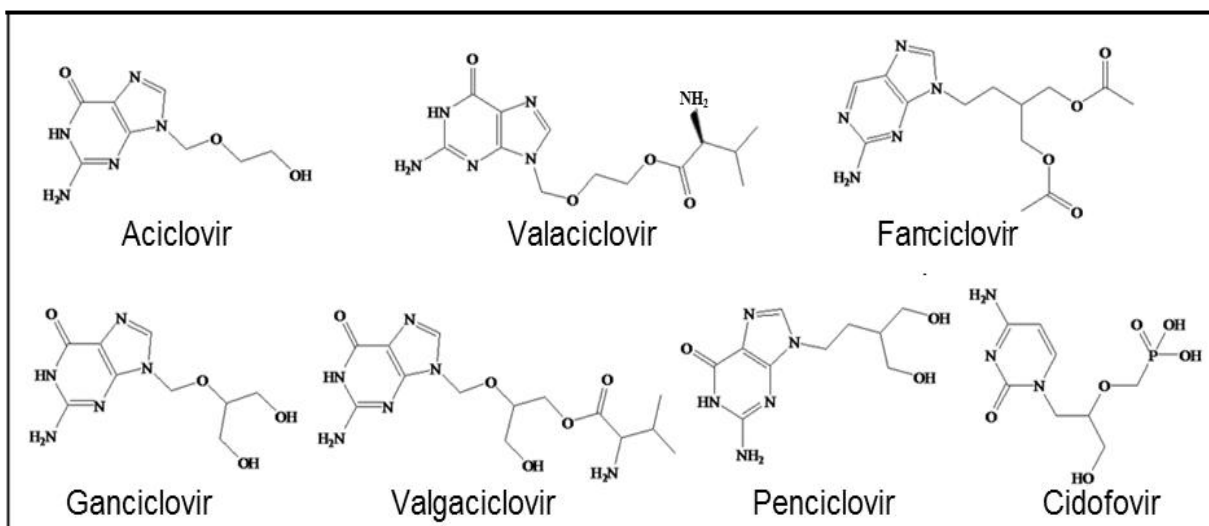


Figura 4: Inibidores da timidina quinase usados no tratamento de infecções causadas pelo vírus Herpes simplex (HSV).

O aciclovir é um inibidor da enzima timidina quinase altamente seletivo. Esta enzima converte o aciclovir em aciclovir monofosfato que é, posteriormente, convertido em difosfato e trifosfato por quinases celulares. Na forma trifosfatada, este composto é inibidor da DNA polimerase viral, impedindo o alongamento posterior da cadeia do DNA viral (Figura 5). A terapia com aciclovir, valaciclovir e famciclovir tem poucos efeitos adversos, mas, em alguns casos, pode causar disfunção renal e neurotoxicidade, principalmente, quando altas doses são administradas (ERLICH *et al.*, 1989; ERNST e FRANEY, 1998; LYON *et al.*, 2002). A disfunção renal pode ocorrer, especialmente, em pacientes que receberam altas doses de aciclovir por via intravenosa, mas é raro e, geralmente, reversível. Terapia com aciclovir oral, mesmo com elevadas doses por dia, não causa disfunção renal. Aciclovir intravenoso tem sido associado com perturbações do sistema nervoso central, que incluem agitação, alucinações, desorientação e tremores (WHITLEY e ROIZMAN, 2001).

O aciclovir possui uma biodisponibilidade oral reduzida (15 a 30%), daí surgiu a necessidade de se desenvolver pró-fármacos mais hidrossolúveis. O valaciclovir é um éster L-valina do aciclovir que atua como uma pró-fármaco do aciclovir. Ele é absorvido e convertido a aciclovir no fígado. O penciclovir é um análogo da deoxiguanosina e o seu mecanismo de ação é similar ao do aciclovir. O famciclovir é um éster diacetil do penciclovir que também atua como pró-fármaco do mesmo. É bem absorvido no trato gastrointestinal (70%) e a sua conversão em penciclovir ocorre através de uma oxidação na posição 6 e da hidrólise de dois grupos acetil (COSTA, 2007).

O aciclovir é utilizado tanto para infecções pelo HSV-1 quanto para HSV-2. Os fármacos valaciclovir e famciclovir são mais utilizados em infecções por HSV-2 enquanto penciclovir é mais usado para HSV-1. O penciclovir também é fosforilado pela ação da timidina quinase e sua afinidade pela enzima do HSV é maior do que a do aciclovir (JARVEST *et al.*, 1998; SPRUANCE *et al.*, 1999; LUPI e PEREIRA, 2000).

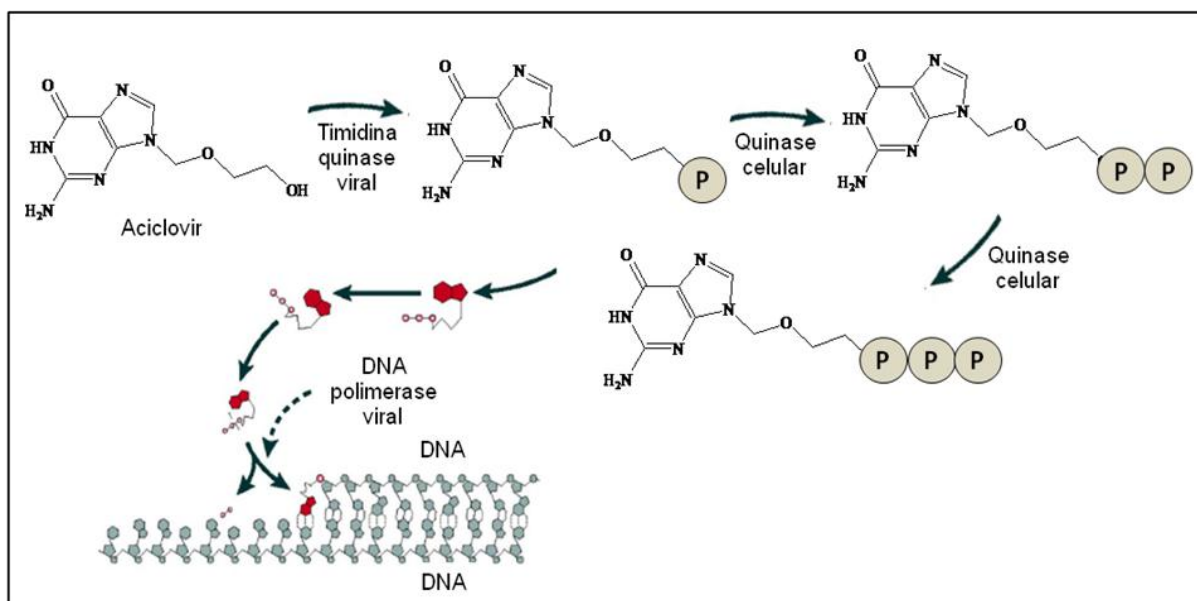


Figura 5: Mecanismo de ação do antiviral aciclovir sobre a DNA polimerase viral (adaptado de DE CLERCQ, 2010).

1.2 Resistência do HSV aos fármacos antivirais

São relatados quatro mecanismos de resistência ao aciclovir, sendo que três deles envolvem a timidina quinase viral: mutantes que não produzem uma proteína funcional, sem atividade (TK-deficiente); mutantes que produzem níveis muito baixos de timidina quinase para a fosforilação eficiente (TK-parcial); e cepas que produzem uma enzima que fosforila o aciclovir de forma menos eficiente do que o substrato natural, a timidina, ou seja, ocorre alteração da especificidade da enzima (TK-alterada). O quarto mecanismo de resistência envolve mutações na enzima DNA polimerase viral (MORFIN e THOUVENOT, 2003; CHIBO *et al.*, 2004). O HSV necessita de uma DNA polimerase funcional para a realização da replicação do vírus, diferentemente da timidina quinase, que em algumas culturas celulares e alguns tecidos de mamíferos, pode ser dispensável. Consequentemente, a probabilidade de se ter um vírus resistente ao aciclovir viável por uma mutação no gene da timidina quinase viral é muito maior do que uma mutação no gene da DNA polimerase. Cerca de 95% dos isolados clínicos de HSV resistentes ao aciclovir estão relacionados a mutações na timidina quinase (CHIBO *et al.*, 2004; FROBERT *et al.*, 2007b; PIRET e BOIVIN, 2011; BURREL *et al.*, 2013) e, portanto, merecem maiores estudos.

As mutações no gene da timidina quinase podem ser adições, deleções ou substituições de nucleotídeos (MORFIN *et al.*, 2000; BESTMAN-SMITH *et al.*, 2001; SAIJO *et al.*, 2002; CHIBO *et al.*, 2004; FROBERT *et al.*, 2007b; PIRET e BOIVIN, 2011). Estudos demonstram que 50% dos casos de resistência ao aciclovir estão relacionados às adições ou eliminações de nucleotídeos que ocorrem com frequência em sequências de homopolímeros ricos em guanina (G) ou citosina (C) e, mais raramente, em adenina (A). A adição ou deleção de um nucleotídeo conduz a um deslocamento que provoca um desalinhamento de pares de bases que faz com que a DNA polimerase não insira, de forma correta, nucleotídeos nestes homopolímeros, resultando na síntese de uma proteína truncada não funcional (BESTMAN-SMITH *et al.*, 2001; FROBERT *et al.*, 2007b; PIRET e BOIVIN, 2011).

Já os outros 50% dos casos de resistência correspondem às substituições que, na maioria das vezes localizam-se em regiões do gene da timidina quinase conservados nos herpesvírus (FROBERT *et al.*, 2007b; PIRET e BOIVIN, 2011). A substituição de um aminoácido por outro ocorre em locais importantes para a atividade catalítica da enzima. No entanto, a atividade enzimática da timidina quinase depende tanto da sequência de aminoácidos, como também da conformação tridimensional da mesma. Dessa forma, tanto as mutações que ocorrem nos sítios importantes para atividade enzimática (sítio de ligação do ATP e sítio de ligação do nucleosídeo), quanto aquelas fora desses locais podem colaborar para o surgimento de cepas resistentes ao aciclovir (FROBERT *et al.*, 2007b).

Estudos genéticos de isolados clínicos de HSV resistentes ao aciclovir revelaram um elevado grau de polimorfismo no gene que codifica a enzima timidina quinase (MORFIN e THOUVENOT, 2003; FROBERT *et al.*, 2007a; PIRET e BOIVIN, 2011). Estas mutações não associadas com a resistência localizam-se em todo o gene, porém fora do sítio ativo da enzima (MORFIN e THOUVENOT, 2003; PIRET e BOIVIN, 2011). O genoma do HSV-1 apresenta variabilidade quatro vezes maior do que o de HSV-2 (MORFIN e THOUVENOT, 2003; FROBERT *et al.*, 2007b).

Segundo Bacon *et al.*, 2003, a maioria dos isolados clínicos de HSV resistentes ao aciclovir são também resistentes ao penciclovir, no entanto, Boyd *et al.*, 1993, diz que, raramente, alguns isolados resistentes ao aciclovir são susceptíveis ao penciclovir e o mecanismo de resistência dessas cepas é uma TK-alterada. Já segundo Bestman-Smith *et al.*, 2001, cepas de HSV resistentes ao aciclovir que

contêm mutações na timidina quinase, apresentam resistência cruzada ao ganciclovir.

1.3 Epidemiologia da infecção por HSV resistente

Entre pacientes imunocompetentes a prevalência de resistência dos HSV ao aciclovir é baixa. De acordo com a literatura, a maioria dos casos de HSV resistentes foram detectados em casos de herpes genital recorrente (MORFIN e THOUVENOT, 2003; PIRET e BOIVIN, 2011). Nesta população, em geral, a resistência ao fármaco não está associada com resultados clínicos adversos, devido à competência do sistema imunológico (PIRET e BOIVIN, 2011). Em pacientes imunocompetentes a prevalência da resistência relatada entre 1980 e 1992 foi de 0,7% no Reino Unido e 0,3% nos Estados Unidos e, desde então, estudos não reportaram aumento da prevalência da resistência (PIRET e BOIVIN, 2011).

Em relação aos pacientes imunocomprometidos, a prevalência de resistência ao aciclovir varia de 3,5 a 10%, mas deve ser especificada de acordo com o tipo de imunossupressão. Estudos de infecções por HSV entre os pacientes que receberam transplante de medula óssea, quer de origem autóloga como alogênica, possuem aproximadamente o mesmo risco de desenvolver uma infecção por HSV (9%), mas a resistência ao aciclovir só foi detectada em pacientes de transplantes alogênicos, atingindo uma prevalência de 30%. Em pacientes HIV positivos, a taxa de prevalência varia de 3,5 a 7% (MORFIN e THOUVENOT, 2003; PIRET e BOIVIN, 2011). A prevalência de HSV resistentes ao penciclovir isolados de pacientes imunocomprometidos é de 2,1%, no entanto, não foi associada a falha do tratamento. Isolados de HSV resistentes ao aciclovir estão associados com significativa morbidade em imunocomprometidos, incluindo doença persistente e disseminada (PIRET e BOIVIN, 2011). Portanto, o estudo da resistência aos antivirais é uma grande preocupação, principalmente para o caso de pacientes imunocomprometidos.

1.4 Modelagem molecular como ferramenta para estudo de antivirais

A modelagem molecular é conceituada como a investigação das propriedades moleculares e das estruturas através do uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica, com o objetivo de fornecer uma representação tridimensional, sob certas circunstâncias (CARVALHO *et al.*, 2003).

A modelagem molecular é uma importante ferramenta no planejamento racional de fármacos e pode ser usada para avaliar a interação ao nível molecular de determinada substância com seu receptor, sob os pontos de vista qualitativo e quantitativo. Com essa técnica é possível analisar profundamente a estrutura molecular compreendida em determinado sistema biológico, assim como pode fornecer meios para prever a potencialidade de moléculas candidatas a compostos bioativos e também seu possível potencial tóxico, por exemplo. Algumas técnicas bastante utilizadas em modelagem molecular compreendem metodologias como a modelagem comparativa, estudos da relação estrutura-atividade e o *docking* molecular. (SCOTTI *et al.*, 2007).

No planejamento de novos fármacos duas estratégias podem ser utilizadas, a estratégia baseada no ligante e independente do receptor/enzima e outra estratégia dependente do receptor/enzima (Figura 6). Na primeira estratégia considera-se indiretamente as interações com a macromolécula, através da correlação entre a atividade de compostos já conhecidos e sua estrutura, ou seja, as relações quantitativas estrutura-atividade (QSAR). Já a segunda estratégia considera-se diretamente as interações do ligante com a macromolécula. Neste caso, a estrutura da macromolécula é conhecida tendo sido obtida experimentalmente por cristalografia e difração de raios-X, ou indiretamente através de estratégias de modelagem molecular, como por exemplo, a modelagem por homologia (SANT'ANNA, 2009).

Proteínas que evoluem a partir de um ancestral comum são conhecidas como homólogas. Duas sequências homólogas podem ser praticamente idênticas, similares em vários aspectos ou até muito diferentes devido a várias mutações. As estruturas tridimensionais de proteínas homólogas são altamente conservadas durante o processo de evolução, pois a estrutura é fundamental para a realização de

funções específicas (SILVA, 2007). É nesse fundamento que a modelagem por homologia, também conhecida como modelagem comparativa, se baseia.

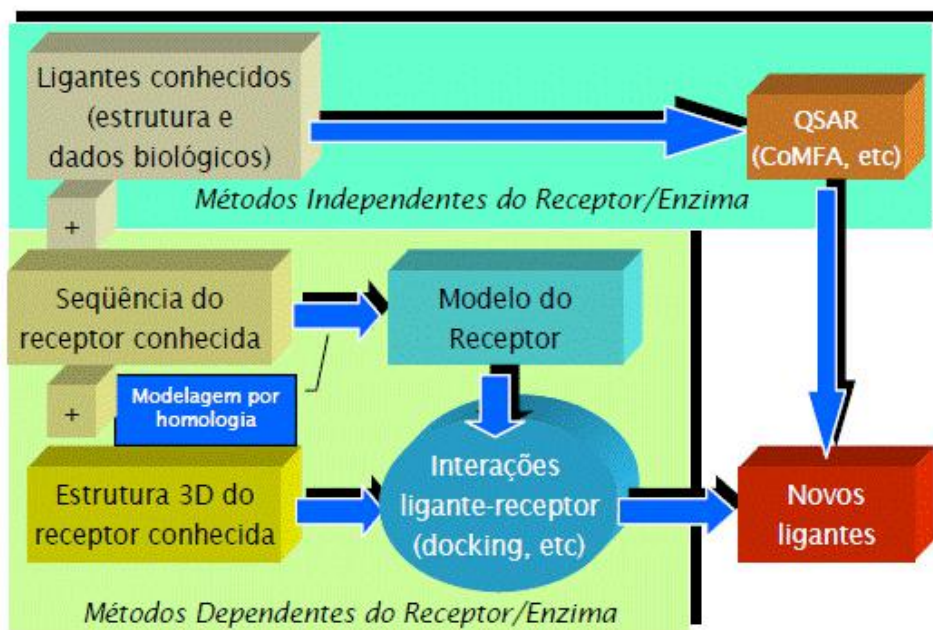


Figura 6: Descrição geral dos métodos para o planejamento de novos fármacos (SANT'ANNA, 2009).

O procedimento para modelagem por homologia é seguida por quatro passos: identificação e seleção de proteínas-moldes no banco de dados de proteínas (PDB); alinhamento das sequências; construção das coordenadas do modelo e validação (FILHO e ALENCASTRO, 2003; GUIDO e ANDRICOPULO, 2008). O estudo estrutural do alvo terapêutico e de seu sítio ativo permite analisar as interações ligante-receptor e propor modificações estruturais em ligantes na busca por moléculas mais ativas e que apresentem menor chance de resistência.

Outro método que merece destaque na abordagem da modelagem molecular é o *docking* molecular, sendo este um dos métodos mais utilizados. Com esse método, as possíveis orientações que determinada molécula assume no interior do sítio de ligação de um biorreceptor são analisadas. Os métodos de *docking* envolvem uma função de energia contendo parâmetros eletrostáticos, de *van der Waals*, de ligações de hidrogênio e, algumas vezes, hidrofóbicos, os quais geram modelos matemáticos que predizem as melhores orientações do ligante, segundo uma lista de pontuação (*scores*) de energia. Os *softwares* mais recentes utilizados para esse método consideram a flexibilidade do ligante e também de algumas cadeias laterais do sítio receptor. A partir dessa estratégia, é possível selecionar por

screening virtual compostos de bases de dados contendo milhares de estruturas, eliminando compostos não promissores antes que sejam sintetizados (SILVA, 2007).

Estudos mostram que a presença de moléculas de água no sítio ativo de determinadas enzimas desempenham um papel fundamental na ligação proteína-ligante, tanto por serem capazes de fazer ligações de hidrogênio quanto por mediar ligações de resíduos com o substrato, ou seja, ligações mediadas pela água. (POSPISIL *et al.*, 2002; GRAAF *et al.*, 2005). Segundo Graaf *et al.*, 2005, a realização de *docking* considerando moléculas de água no sítio ativo podem melhorar em até 70% a precisão do método em comparação com *docking* feito na ausência de água, em relação ao desvio da raiz média quadrada (RMSD), que mede a distância entre os átomos de proteínas sobrepostas.

Quando se sabe que as moléculas de água são importantes no reconhecimento de proteína-ligante, normalmente a estratégia utilizada é a de realizar *dockings* em paralelo, um na ausência de moléculas de água e outro na presença de uma ou mais moléculas de água (VERDONK *et al.*, 2005).

2 JUSTIFICATIVA

A infecção pelo HSV está entre as infecções mais comuns entre humanos e está em ascensão (WHITLEY e ROIZMAN, 2001; GRECO *et al.*, 2007).

O HSV tem como importante característica a capacidade de latência no tecido nervoso, transformando o portador do HSV em um potencial propagador do vírus durante os períodos de reativação da doença (PENELLO *et al.*, 2010; NETCHIPOROUK *et al.*, 2013).

Alguns estudos epidemiológicos têm mostrado uma interação bastante relevante entre HSV, HIV-1 e HPV. A presença de HSV-2 aumenta o risco de aquisição, excreção e transmissão de HIV-1 e pode acelerar a progressão da doença pelo HIV-1. A infecção por HSV-2 foi também associada a um aumento de 2,2 a 3,4 vezes no risco para carcinoma cervical invasivo em mulheres portadoras de HPV. Dessa forma, o controle de infecções causadas pelo HSV-2 deveria ser uma prioridade em saúde pública com base nas informações atualizadas sobre a epidemiologia da infecção (CLEMENS e FARHAT, 2010).

Em relação a infecções por HSV-2, esta é duas vezes mais comum em mulheres do que em homens, sendo que uma em cada 5 mulheres são infectadas, em comparação com 1 em cada 9 homens. As mulheres jovens são particularmente vulneráveis ao herpes genital, com prevalência de 10,6% entre adolescentes e jovens adultos. Os custos anuais de cuidados de saúde devido a herpes genital são estimados em mais de 1 bilhão de dólares (ROYER *et al.*, 2013).

Tratamentos prolongados com o aciclovir podem resultar no desenvolvimento de resistência, principalmente em pacientes imunocomprometidos (MORFIN e THOUVENOT, 2003). O surgimento de isolados clínicos de HSV resistentes ao aciclovir tem aumentado significativamente nos últimos 10 a 15 anos, não limitando-se apenas aos pacientes adultos, já tendo sido descritos também casos em crianças (HUSSIN *et al.*, 2013). A prevalência de resistência de HSV aos antivirais entre indivíduos imunocompetentes é baixa, menos de 1%, no entanto, entre os pacientes imunocomprometidos, a prevalência atinge 3,5% a 10% em pacientes com imunossupressão profunda e exposição ao medicamento em longo prazo (BURREL *et al.*, 2013). Dessa forma, a resistência ao aciclovir é uma grande preocupação, principalmente nos casos de pessoas com o sistema imunológico debilitado.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo é avaliar o modo de ligação e interações do ACV e de análogos com a timidina quinase de HSV-1 e HSV-2 e entender a relação com a resistência ao aciclovir observada na clínica usando a modelagem molecular.

3.2 Objetivos Específicos

Construção do modelo de enzima timidina quinase de HSV-2.

Comparar a estrutura da timidina quinase de HSV-1 e HSV-2.

Avaliar as interações do aciclovir e de análogos com a timidina quinase de HSV-1 e HSV-2 e mapear os resíduos das enzimas que são importantes para a interação ligante-receptor.

Avaliar as diferenças estruturais na timidina quinase de HSV-1 selvagem e aquelas com mutações descritas em cepas de HSV-1 resistentes ao aciclovir.

Comparar o modo de ligação do aciclovir nas enzimas mutantes e selvagem e avaliar a relação com a resistência ao fármaco.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Construção do modelo da enzima timidina quinase de HSV-2

As estruturas primárias da enzima timidina quinase de HSV-1 e HSV-2 foram obtidas no banco de dados do Centro nacional de informação para biotecnologia (*National Center for Biotechnology Information* - NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sob os códigos GI = 330210 e GI = 30027704, respectivamente. As estruturas foram alinhadas usando o programa *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). O programa *Swiss Model* (<http://www.swissmodel.expasy.org>) foi usado para a construção do modelo por homologia da enzima de HSV-2 usando como molde a enzima de HSV-1 que foi obtida no banco de dados de proteínas, sob código 1P7C. No programa *Swiss PDB Viewer* (SPDBV) foram feitas sucessivas minimizações, e foram avaliados os valores de energia e a estereoquímica dos resíduos de acordo com o gráfico de Ramachandran, utilizando o programa *Procheck* (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES>). Após minimização da energia, a estrutura com os melhores valores foi submetida à validação pela análise da compatibilidade entre a estrutura primária e tridimensional das enzimas (*score 3D-1D*), usando o *Verify-3D* (http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D/), análise da energia dos resíduos (*score-Z*) utilizando o servidor *ProSA-web* (<http://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) e o próprio gráfico de Ramachandran e os valores foram comparados com a estrutura da timidina quinase de HSV-2. A estrutura tridimensional da TK_{HSV-2}, o mapa de potencial eletrostático (que mostra a distribuição de cargas) e o sítio ativo foram comparados com TK_{HSV-1}.

4.2 Avaliação das interações do aciclovir e de análogos com a timidina quinase de HSV-1 e de HSV-2

Inicialmente, foi realizada a validação do método de *docking* molecular usando a técnica de *redocking*, onde o ligante é extraído da sua estrutura cristalográfica e é recolocado no sítio de ligação e comparado com a estrutura original para avaliar a capacidade preditiva do método.

O *redocking* foi realizado com a estrutura cristalográfica da enzima timidina quinase complexada com o aciclovir, cujo código PDB é 2KI5. A macromolécula

(proteína) e o ligante (aciclovir) foram preparados utilizando o programa *Autodock Tools 4.2*, onde hidrogênios e cargas *Gasteiger* foram adicionados à proteína.

Mapas de grade foram calculados usando o *Autogrid4*. Cada mapa consiste em uma caixa tridimensional com espaçamentos de 0,375 Å entre cada ponto da caixa. A energia de interação de um átomo com a proteína é calculada em cada ponto, e um mapa de afinidade para cada tipo de átomo do ligante e um mapa de potencial eletrostático são fornecidos (SOTRIFER *et al.*, 2000). A caixa cúbica foi construída com dimensões 58 x 44 x 40 pontos, o que equivale a uma caixa de 21,75 x 16,5 x 15 Å que foi centralizada na hidroxila do resíduo Tyr101, porque tal resíduo pertence ao sítio ativo da enzima. Os parâmetros usados para o *docking* foram os padrões do programa, mantendo o ligante flexível, a proteína rígida e foram solicitadas 50 poses. As outras opções usadas para cálculo do *docking* molecular foram as opções padrão do programa e foi usado o algoritmo genético Lamarckiano.

Após o *docking*, as poses obtidas foram separadas em agrupamentos (*clusters*) de acordo com os valores do desvio da raiz média quadrada (RMSD) entre as diferentes poses, sendo agrupadas em um mesmo *cluster* aquelas com valor de RMSD menor do que 2 Å e a pose de menor energia de ligação dos *clusters* foi selecionada para as análises (POSPISIL *et al.*, 2002).

Diferentes parâmetros incluindo alteração do tamanho e posição da caixa para cálculo do *grid* foram testados para fechar os parâmetros capazes de reproduzir o método, e, além disso, foi feito o *docking* molecular do aciclovir considerando a presença do cofator ATP, do sulfato (presente em estruturas disponíveis no PDB) e de moléculas de água no sítio ativo da enzima para avaliar se a presença ou ausência destes poderiam influenciar na precisão do *docking*.

Após seleção do melhor parâmetro, este foi utilizado para realização do *docking* molecular do aciclovir, penciclovir, ganciclovir e brivudina com a TK_{HSV-2} e posterior análise das interações e comparação com as interações com a TK_{HSV-1}. As estruturas de TK_{HSV-1} usadas foram aquelas disponíveis no PDB ligadas ao aciclovir (código PDB = 2KI5), penciclovir (código PDB = 1KI3) e ganciclovir (código PDB= 1KI2) e brivudina (código PDB = 1KI8). A análise do modo de ligação e das interações dos inibidores com os resíduos das enzimas timidina quinase foram avaliadas usando os programas SPDBV e *Ligplot* disponível no *PDBsum* (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/Generate.html>).

4.3 Construção dos modelos dos mutantes da enzima timidina quinase de HSV-1

Os modelos das enzimas mutantes de HSV-1 foram construídos utilizando o programa SPDBV com base nos resíduos mutados descritos na literatura relacionados à resistência ao aciclovir. Os mutantes de TK_{HSV-1} selecionados foram: Arg51Trp, Ala175Val, Glu83Lys, His105Pro, Leu364Pro (MORFIN *et al.*, 2000), Pro84Ser, Asp162Ala, Arg220Cys, Ala189Val + Leu227Phe (CHIBO *et al.*, 2004), Arg222His (BESTMAN-SMITH *et al.*, 2001), Tyr53His + Arg163His, Tyr172Cys e Ala174Pro (SAUERBREI *et al.*, 2010). As mutações foram feitas na enzima de HSV-1 cujo código PDB é 1P7C. Foram realizadas minimizações de energia no mesmo programa e a validação foi realizada pelos mesmos métodos utilizados para a validação do modelo de TK_{HSV-2}.

Para cada mutante, foi calculado o mapa de potencial eletrostático no programa SPDBV e foi realizada uma análise comparativa entre eles. Além disso, a distância entre cada resíduo mutado e a posição ocupada pelo aciclovir no sítio ativo da enzima TK_{HSV-1} foi medida para avaliar se as mutações estavam próximas ou distantes do sítio ativo e se as mesmas poderiam exercer uma influência direta ou indireta na interação ligante-receptor.

4.4 Avaliação das interações do aciclovir com as enzimas timidina quinases mutantes de HSV-1

A avaliação das interações do aciclovir com as enzimas mutantes de HSV-1 foram realizadas seguindo os mesmos parâmetros de *docking* utilizados para a enzima selvagem, sendo selecionadas para as análises as poses de menor energia dos *clusters* resultantes do *docking* com cada mutante.

As interações entre os inibidores e os mutantes da timidina quinase foram avaliadas usando os programas SPDBV e *Ligplot* e foram correlacionadas com a atividade biológica para explicar a resistência observada nas enzimas mutantes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Construção do Modelo de Timidina Quinase de HSV-2

Para a construção do modelo da enzima timidina quinase de HSV-2 foi utilizada a timidina quinase de HSV-1 como molde. A estrutura tridimensional da timidina quinase de HSV-1 foi obtida no banco de dados de proteína sob o código 1P7C. Inicialmente foi realizado o alinhamento da estrutura primária da timidina quinase de HSV-1 e de HSV-2 utilizando o programa *ClustalW2* que mostrou um percentual de identidade de 73%. Para proteínas com mais de 80 resíduos de aminoácidos, o percentual de identidade entre as estruturas primárias do molde e do modelo deve ser superior a 25%, desta forma, a probabilidade das estruturas tridimensionais dessas proteínas serem semelhantes é alta e, portanto, é possível a construção do modelo (FILHO e ALENCASTRO, 2003). Logo, um percentual de identidade de 73% é considerado satisfatório para construção do modelo porque um elevado percentual de identidade na estrutura primária sugere que as estruturas secundárias e terciárias da timidina quinase de HSV-1 e HSV-2 também sejam muito semelhantes (Figura 7).

```
[HSV1]  MASYPCHQHASA FDQAARSRGHSNRRTALRPRRQQEATEVRLEQKMP TLLRVYIDGPHGM 60
[HSV2]  MASHAGQQHAPA FGQAARASGFTDGRAASRPSHRQGASEARGDFELPTLLRVYIDGPHGV 60
      ***. . :***.***.*****: * :: *:* ** ::* *:* * : :*****:*****:

[HSV1]  GKTTT-TQLLVALGSRDDIVYVPEPMTYWQVLGASETIANIYITQHRLDQGEISAGDAAV 119
[HSV2]  GKTTTSAQLMEALGFRDNIVYVPEPMTYWQVLGASETLTNIYNTQHRLDRGEISAGEAAV 120
      ***** :** : ***.***.*****:*****:*****:*****:*****:***

[HSV1]  VMTSAQITMGMPYAVTDAVLAPHVGGEGAGSSHAPPPALTLIFDRHPAALLCYPAARYLM 179
[HSV2]  VMTSAQITMSTPYAATDAVLAPHIGGEAVGPQAPPALTLVFDHPPIASLLCYPAARYLM 180
      ***** . ***.*****:***** ..*****:*****:*****:*****

[HSV1]  GSMTPQAVLAFVALIPPTLPGTNIVLGALPEDRHIDRLAKRQRPGERLDLAMLAAIRRVY 239
[HSV2]  GNMTPQAVLAFVALMPPTAPGTNLVGLVPEAEHADRLARRQRPGARLDLAMLSAIRRVY 240
      *.*****:*** *****:***.*** * *****:***** *****:*****

[HSV1]  GLLANTVRYLQGGGSWEDWGQLSGTAVFPQGAEPQSNAGPRPHIGDTLFTLFRAPELLA 299
[HSV2]  DLLANTVRYLQGGGWREDWGRLTGVAATPRPDPEDGAGSLPRIEDTLFALFRVPELLA 300
      .***** ** * *****:***.***. .*:..** *:* *****:***.*****

[HSV1]  PNGDLYNVFAWALDVLAKRLRPMHVFILDYDQSPAGCRDALLQLTSGMVQTHVITPGSIP 359
[HSV2]  PNGDLYHIFAWVLDVLADRLLPMLHFLVDYDQSFVGCARDALLRLTAGMIPTRVITAGSIA 360
      *****:***.*****.*** *****:*****.*****:*****:*****:*****

[HSV1]  TICDLARTFAREMGEAN 376
[HSV2]  EIRDLARTFAREVGGV- 376
      * *****:*
```

Figura 7: Alinhamento da estrutura primária da timidina quinase de HSV-1 e de HSV-2. Em vermelho estão as regiões de α -hélice, em verde as folhas β e em azul as alças.

Foi feita uma análise dos resíduos de cisteína presentes na estrutura, já que estes resíduos são importantes por estarem envolvidos com a formação de ligações dissulfídicas que podem ser importantes para a estrutura tridimensional da proteína (KRIPPAHL, 1999). A enzima de HSV-1 apresentou quatro resíduos de cisteínas, enquanto a de HSV-2 apresentou dois, no entanto, em ambas as enzimas não foram observadas ligações dissulfídicas. Duas cisteínas encontravam-se na mesma posição C171 em HSV-1 e C172 em HSV-2; e C336 em HSV-1 e C337 em HSV-2.

O modelo da enzima timidina quinase de HSV foi construído baseado na timidina quinase de HSV-1 (código PDB = 1P7C). O modelo passou por minimizações de energia, utilizando o SPDBV, para reduzir as energias de ângulos torcionais e de ligação, além das interações desfavoráveis entre átomos não-ligados (FILHO e ALENCASTRO, 2003). Em seguida foi realizada a validação do modelo com base na análise do gráfico de Ramachandran, Score 3D-1D e análise do score-Z, e os valores foram comparados com os do molde.

O gráfico de Ramachandran exhibe as possíveis combinações de ângulos Phi e Psi de aminoácidos de uma proteína que contribuem para a sua conformação. O ângulo Phi é aquele entre o nitrogênio do grupo NH e carbono alfa e Psi é o ângulo entre o carbono alfa e o carbono da carbonila) Neste gráfico são observados os percentuais de resíduos nas regiões favoráveis, permitidas e desfavoráveis. O ideal é que a estrutura protéica tenha mais de 90% dos resíduos nas regiões favoráveis e 0% nas regiões desfavoráveis sendo que resíduos de glicina são identificados separadamente já que estes por terem hidrogênio na cadeia lateral são permitidos nas regiões desfavoráveis (LASKOSWIKI *et al.*, 1993).

O gráfico de Ramachandran do modelo mostrou 86,2% dos resíduos nas regiões favoráveis do gráfico enquanto o molde apresentou 90,5%. Nas regiões desfavoráveis o modelo teve 0,7% dos resíduos neste local, enquanto o molde apresentou 1,5% dos resíduos na região (Figura 8). Apesar de o modelo apresentar um percentual de resíduos na região favorável menor que 90%, o valor encontrado foi semelhante ao do molde e, além disso, a porcentagem de resíduos na região desfavorável foi menor no modelo do que no molde, sendo representado por quatro resíduos no molde (Ser74, Arg75, Ser149 e Arg163) e apenas dois no modelo (Arg76, que se encontra a uma distância de aproximadamente 26 Å do sítio de ligação do aciclovir, e Arg164 a, aproximadamente, 5,5 Å).

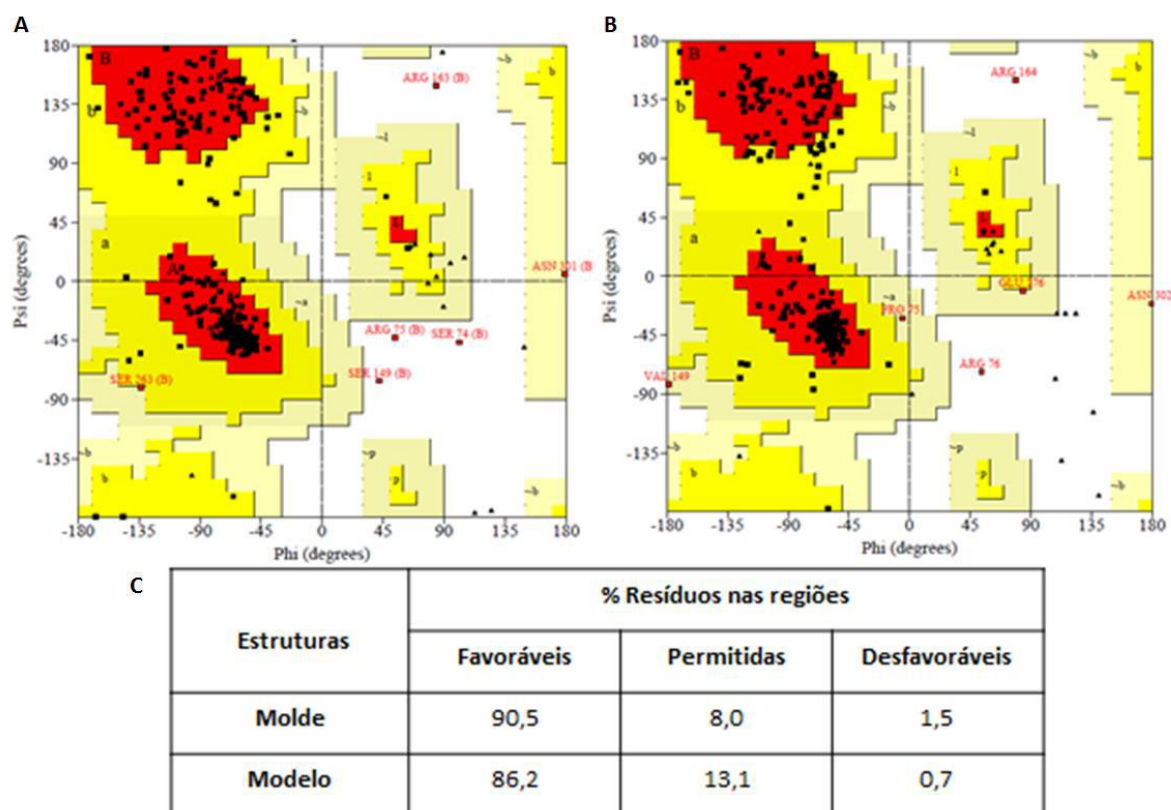


Figura 8: Gráfico de Ramachandran da timidina quinase A) do molde de HSV-1 e B) do modelo de HSV-2 C) percentual de resíduos nas regiões favoráveis, permitidas e desfavoráveis do gráfico de Ramachandran.

Foi realizado o cálculo do perfil 3D-1D do modelo e do molde usando o *Verify-3D* que analisa a compatibilidade da estrutura tridimensional de uma proteína (3D) com a sua própria sequência de aminoácidos (1D). Cada resíduo é avaliado de acordo com a sua localização e ambiente sendo atribuída uma pontuação para cada um dos aminoácidos (LUTHY *et al.*, 1992).

Na análise do perfil 3D-1D, o modelo apresentou 98,48% dos resíduos acima do score 0,2, o que representa um valor bastante favorável, apenas os resíduos Glu84, Val139, Leu140, Ala141 e Pro142 estavam abaixo de 0,2 enquanto nenhum resíduo foi encontrado abaixo de zero. Este valor foi maior do que o do molde que apresentou 96,87% acima de 0,2 com os resíduos Pro82, Glu83, Pro84, Tyr172, Pro173, Ala174, Ala175, Arg176 e Tyr177 abaixo deste valor (Figura 9).

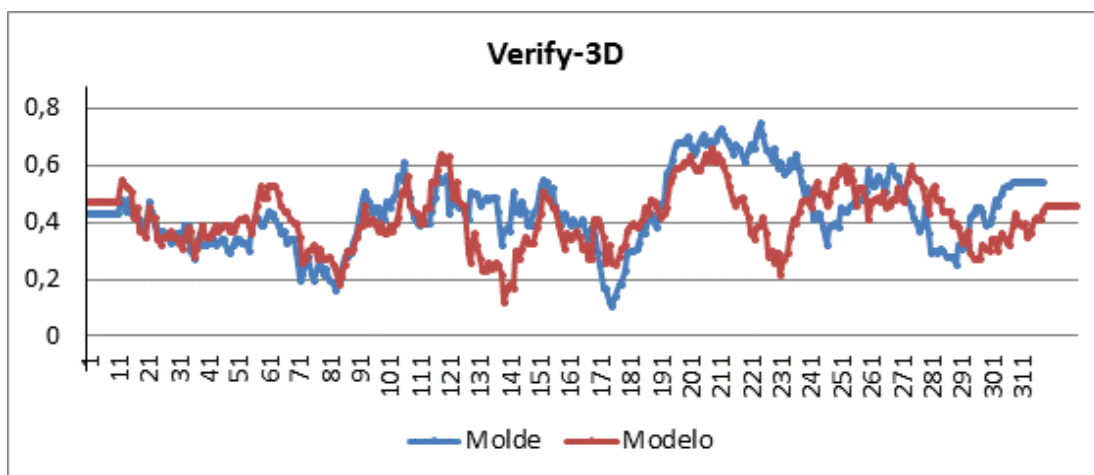


Figura 9: Avaliação da compatibilidade 3D-1D da TK de HSV-2 (vermelho) em comparação com a TK de HSV-1 (azul).

No programa ProSA (*Protein Structure Analysis*), o *score-Z* da proteína foi avaliado. Este valor indica a qualidade geral do modelo e seu valor é exibido em um gráfico que contém os *score-Z* de todas as cadeias de proteínas determinadas experimentalmente no PDB. Os grupos de estruturas obtidas por cristalografia e difração de raios-X e por RMN são distinguidos por cores diferentes, azul claro e azul escuro respectivamente, e pode ser usado para verificar se o *score-Z* da estrutura está dentro do intervalo de pontuações tipicamente encontrado para proteínas nativas de tamanho similar (WIEDERSTEIN e SIPPL, 2007) e auxilia na avaliação da confiabilidade do modelo. A análise do *score-Z* mostrou que o modelo da TK de HSV-2 apresentou o valor de -8,25, que é bastante semelhante ao molde cujo valor foi -8,8 (Figura 10).

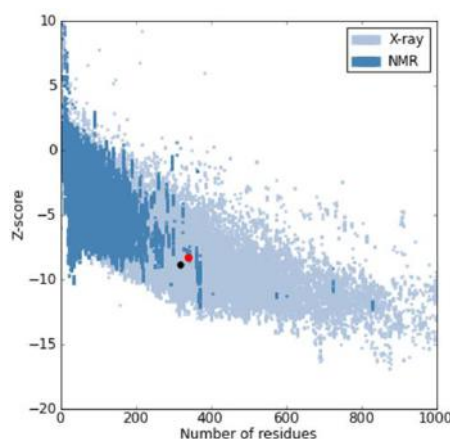


Figura 10: Análise do *score-Z* das estruturas de timidina quinase de HSV-1 (molde), mostrada em preto, e de HSV-2 (modelo), mostrada em vermelho.

No ProSA também foi analisado o gráfico de energia que indica a qualidade local dos modelos, representando a energia em função da posição da sequência de aminoácidos (Figura 11). Em geral, valores positivos no gráfico correspondem a partes problemáticas ou errôneas de um modelo. As energias de cada resíduo são mostradas em verde claro no gráfico, geralmente, apresentam grande variação e auxiliam pouco na avaliação do modelo. Por isso, o gráfico é suavizado por meio do cálculo da energia média de cada fragmento de 40 resíduos sendo este valor atribuído a um resíduo central e é mostrado em verde escuro (WIEDERSTEIN e SIPPL, 2007). A análise deste gráfico mostrou que praticamente todos os resíduos do modelo de TK de HSV-2 apresentaram energia menor do que zero. Estes dados foram semelhantes ao molde, que apresentou todos os resíduos com energia menor do que zero.

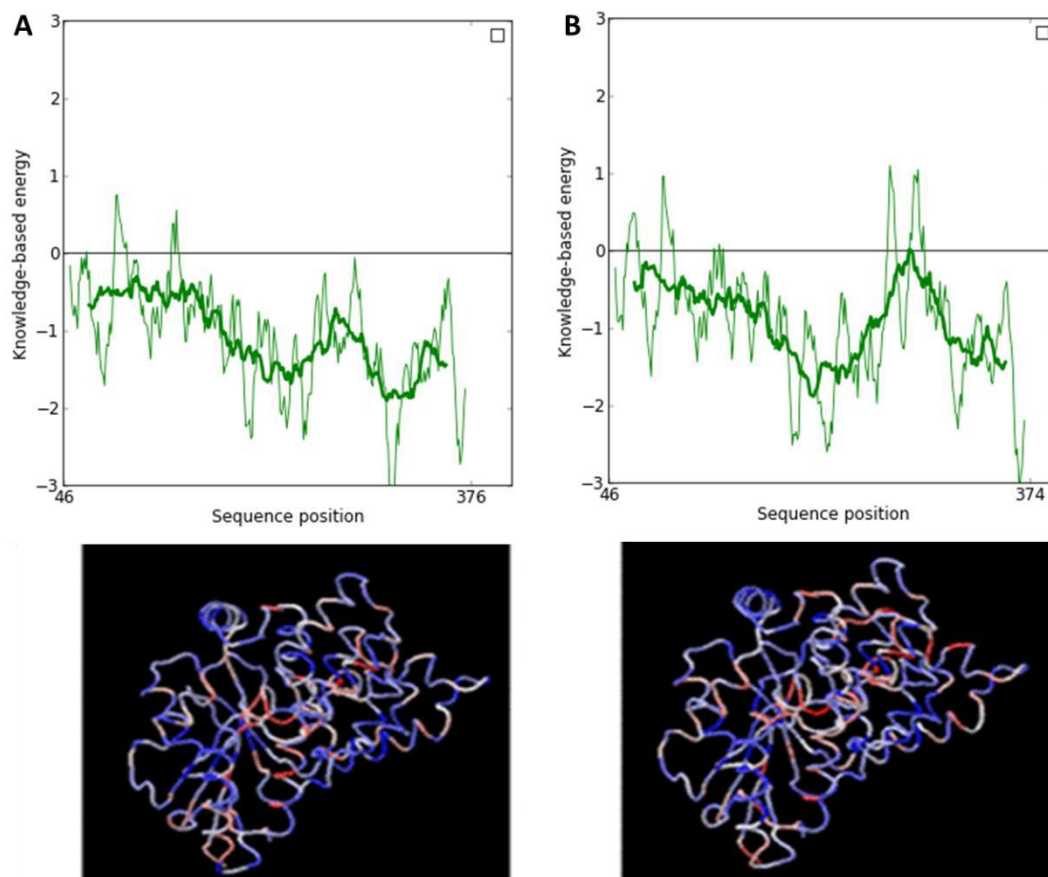


Figura 11: Energia dos resíduos de aminoácidos das proteínas. Na parte superior energia independente de cada resíduo (verde claro) e a média da energia dos resíduos em função de um resíduo central (verde escuro). Na parte inferior, a estrutura das proteínas mostrando as regiões de menor energia em azul e regiões de maior energia em vermelho. A) Molde (TK de HSV-1) e B) Modelo (TK de HSV-2).

As estruturas da timidina quinase de HSV-1 e de HSV-2 apresentaram conservação da estrutura secundária e terciária e um RMSD de 0,32 Å. O RMSD é a medida da distância entre os átomos (geralmente os átomos estruturais) de proteínas sobrepostas e este depende do percentual de identidade entre as sequências utilizadas. Normalmente, para proteínas com percentual de identidade maior que 50%, o RMSD é inferior a 1 Å para a proteína como um todo (FILHO e ALENCASTRO, 2003).

Apesar da similaridade na estrutura terciária, a comparação do mapa de potencial eletrostático da timidina quinase de HSV-1 e de HSV-2 mostrou um perfil de distribuição de cargas diferente, sendo que o modelo de HSV-2 apresentou regiões mais negativas, (representadas em vermelho), e menos regiões positivas (em azul) (Figura 12).

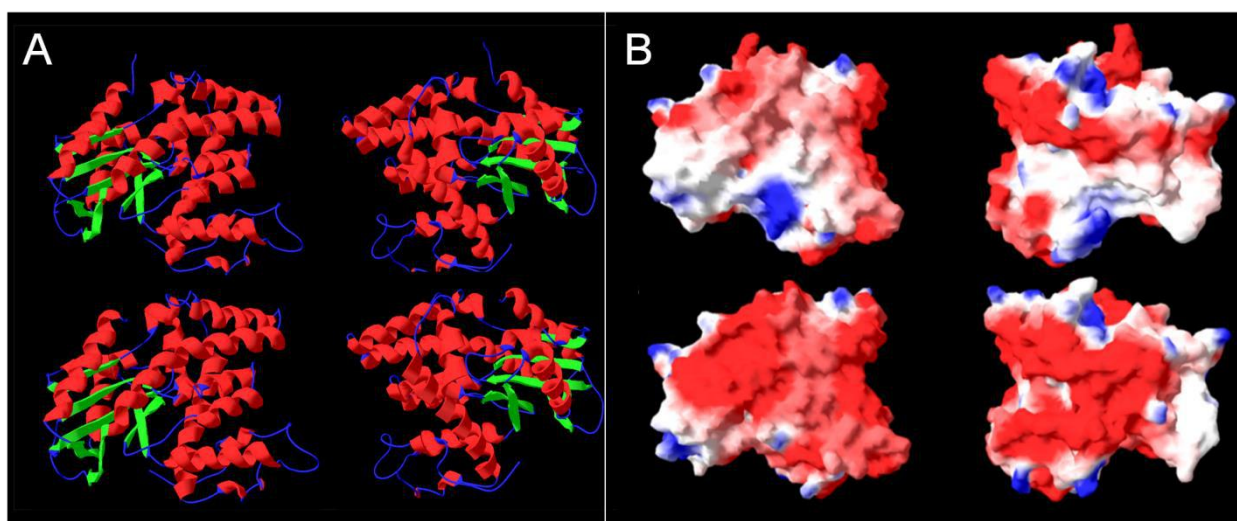


Figura 12: A) Estrutura 3D do molde da timidina quinase de HSV-1 (acima) e do modelo de HSV-2 (abaixo). B) Mapa de potencial eletrostático em uma visão de um lado e em uma visão a 180° na lateral.

5.2 Análise interações do aciclovir e de seus análogos com a timidina quinase de HSV-1

Para validação da metodologia de *docking* inicialmente foi realizado o *redocking* do aciclovir na TK de HSV-1 usando para isto, a estrutura cristalográfica da timidina quinase complexada com aciclovir, cujo código PDB é 2KI5. A caixa cúbica de dimensões 21,75 x 16,5 x 15 Å foi centralizada na hidroxila do resíduo

Tyr101 da cadeia B da enzima e os mapas foram calculados pelo *Autogrid4*. Todas as 50 poses ficaram agrupadas no mesmo *cluster*, que apresentou uma energia de ligação igual a -6,77 Kcal/mol e RMS em relação a posição original (RMSref) igual a 1,14 Å, indicando que o método foi capaz de reproduzir de forma bastante semelhante a ligação do inibidor no sítio ativo da enzima (Figura 13A).

Além disso, foram realizados *redockings* do aciclovir na enzima de HSV-1 considerando a presença do cofator ATP, do sulfato (presente em estruturas disponíveis no PDB) e de moléculas de água no sítio ativo da enzima utilizando os mesmos parâmetros, para avaliar qual estratégia seria capaz de reproduzir da melhor forma a posição do aciclovir na estrutura cristalográfica (Figura 13). Estas estratégias também foram testadas no modelo de HSV-2, utilizando o mesmo tamanho de caixa cúbica (21,75 x 16,5 x 15 Å) e centralizada na hidroxila do resíduo Tyr102 (correspondente ao Tyr101 da enzima de HSV-1) para avaliar a influência desses fatores na precisão dos *dockings* (Figura 14).

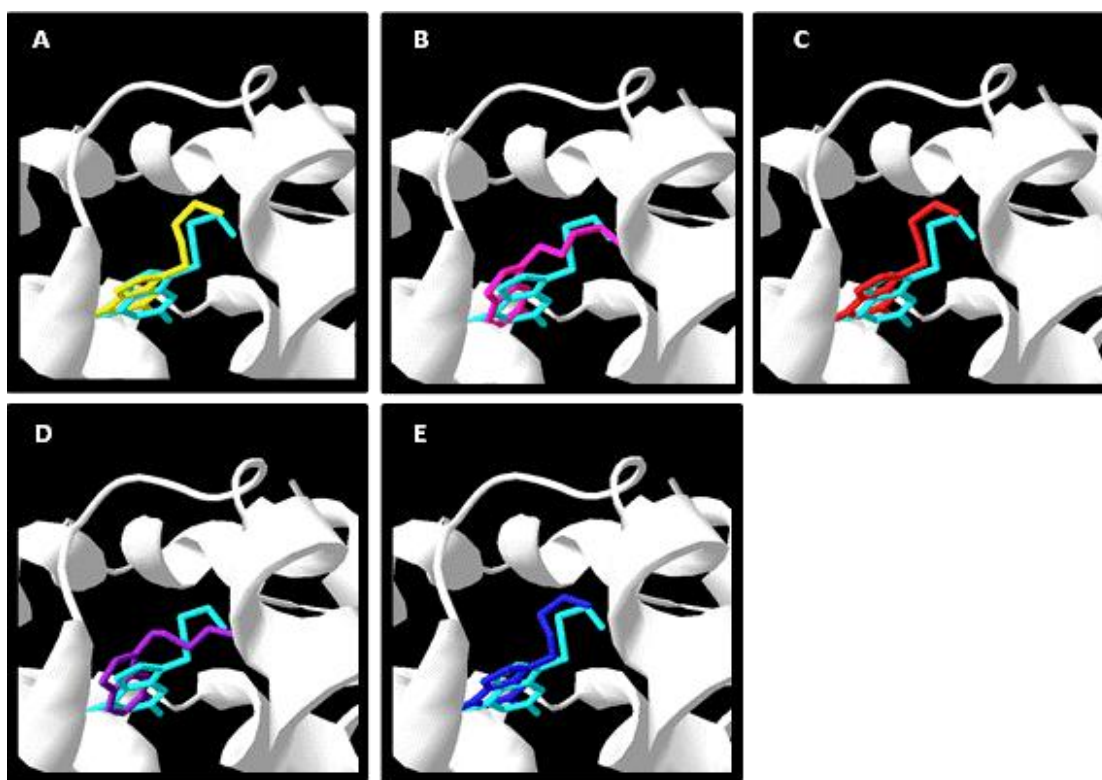


Figura 13: *Redocking* do aciclovir na enzima TK de HSV-1. A molécula azul claro representa a estrutura do aciclovir originalmente presente na estrutura cristalográfica (código PDB = 2KI5). A) *Docking* realizado na ausência de moléculas de água, sulfato e ATP (estrutura amarela). B) *Docking* realizado com molécula de água e com sulfato (estrutura rosa). C) *Docking* realizado com sulfato (estrutura vermelha). D) *Docking* realizado com molécula de água (estrutura roxa). E) *Docking* realizado com ATP (estrutura azul escura).

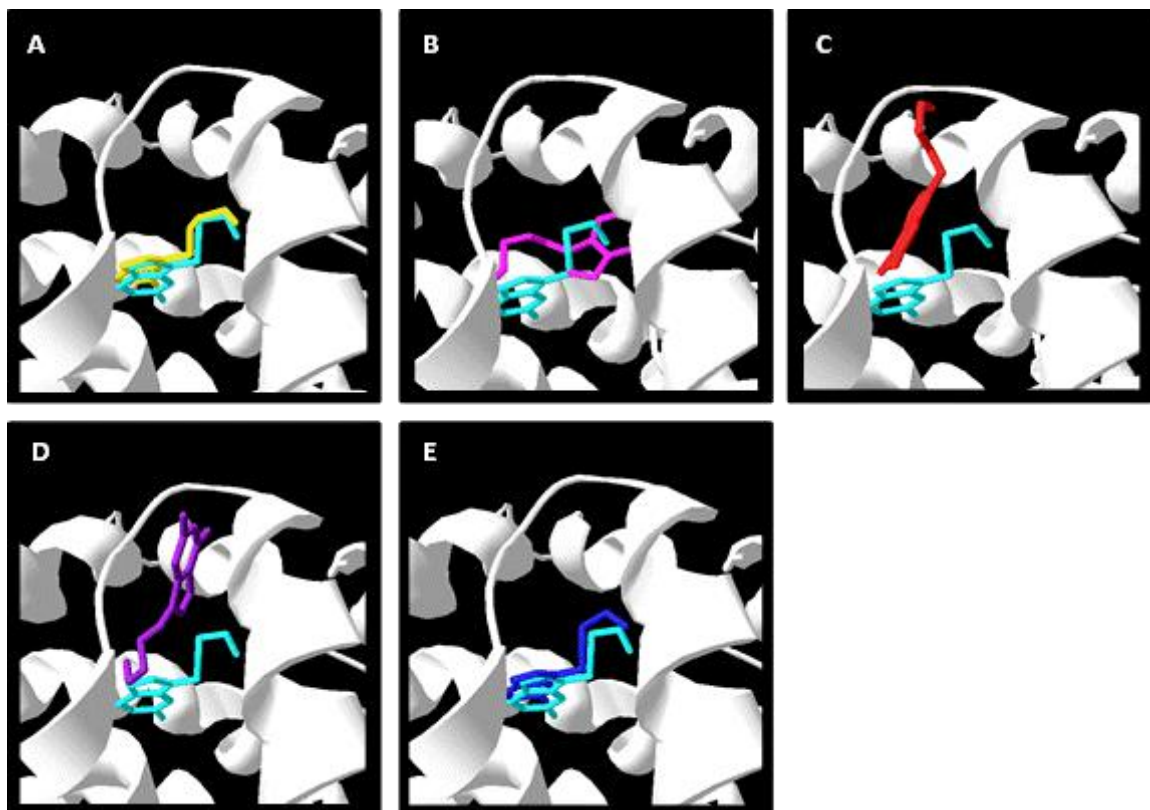


Figura 14: *Dockings* do aciclovir na enzima TK de HSV-2. A molécula azul representa a estrutura do aciclovir originalmente presente na estrutura cristalográfica de HSV-1. A) *Docking* realizado na ausência de molécula de água, sulfato e ATP (estrutura amarela). B) *Docking* realizado com molécula de água e com sulfato (estrutura rosa). C) *Docking* realizado com sulfato (estrutura vermelha). D) *Docking* realizado com molécula de água (estrutura roxa). E) *Docking* realizado com ATP (estrutura azul escura).

Os parâmetros utilizados para a comparação das diferentes estratégias de *docking* foram a análise visual da posição do aciclovir no complexo resultante, a energia de ligação do *cluster* de menor energia, a quantidade de conformações no *cluster* de menor energia e o RMSD de referência (RMSref) em relação a estrutura da TK_{HSV-1} disponível no PDB. O RMSref é um parâmetro relevante para o *redocking*, uma vez que ele relaciona o resultado obtido com o *docking* com uma estrutura de referência, como a estrutura cristalográfica. Em relação à enzima de HSV-1, todas as estratégias apresentaram valores semelhantes com relação à quantidade de *clusters* formados que foi um ou dois, o número de conformações no *cluster* de menor energia que variou de 45 a 50 e a energia de ligação que também não variou muito, assim como o RMSref com valores entre 1,14 e 1,17 Å. Apesar do valor de RMS ser semelhante, visualmente a estrutura que mais se assemelhou à

estrutura cristalográfica foi a estratégia que não utilizou o sulfato, nem molécula de água e nem ATP que também demonstrou menor energia de ligação (-6,77 Kcal/mol) (Tabela 1). Esta pose do aciclovir foi semelhante àquela observada na Tk de HSV-2.

Tabela 1: Comparação entre as diferentes estratégias de *redocking* da TK_{HSV-1}. Energia de ligação (EL), RMS de referência (RMSref).

Estratégia de docking	Quantidade de <i>clusters</i>	EL do <i>cluster</i> de menor energia (Kcal/mol)	Nº de poses no <i>cluster</i> de menor energia	RMSref (Å)
Sem H ₂ O, sem SO ₄	1	-6,77	50	1,14
H ₂ O + SO ₄	2	-5,58	46	1,17
SO ₄	1	-6,41	50	1,14
H ₂ O	1	-5,84	45	1,17
ATP	2	-6,69	49	1,14

Em relação ao modelo de HSV-2, para todos os parâmetros, o *docking* realizado na ausência de sulfato e ATP e moléculas de água no sítio ativo, foi o que mostrou resultados mais favoráveis, apresentando menor energia de ligação (-5,75 Kcal/mol), menor quantidade de *clusters* e maior número de conformações no *cluster* de menor energia (Tabela 2).

Tabela 2: Comparação entre as diferentes estratégias de *docking* da TK_{HSV-2}. Energia de ligação (EL).

Estratégia de docking	Quantidade de <i>clusters</i>	EL do <i>cluster</i> de menor energia-Kcal/mol	Nº conformações no <i>cluster</i> de menor energia
Sem H ₂ O, sem SO ₄	6	-5,75	30
H ₂ O + SO ₄	10	-5,53	20
SO ₄	7	-5,62	3
H ₂ O	6	-5,67	5
ATP	7	-5,72	23

Segundo Pospisil *et al.*, 2002, o *docking* do aciclovir realizado na ausência de água leva a uma maior precisão do modo de ligação do inibidor na enzima. Isso ocorre porque o programa *AutoDock* não é capaz de reproduzir a posição de análogos de guanina na presença de moléculas de água no sítio ativo da enzima. Em contrapartida, quando é realizado o *docking* de análogos de pirimidina, como a timidina, por exemplo, as moléculas de água devem ser utilizadas para uma melhor precisão de encaixe (POSPISIL *et al.*, 2002). Spadola *et al.*, 2003, em seu estudo de *docking* molecular de análogos de guanina com a timidina quinase de VZV também retirou as moléculas de água para a realização dos experimentos e as manteve quando utilizou análogos de pirimidina.

A estratégia escolhida para os posteriores estudos de *docking* molecular dos inibidores da timidina quinase de HSV-2 e para as enzimas mutantes de HSV-1, foi aquela na ausência de moléculas de água no sítio ativo, e ausência de sulfato e ATP porque foi a que mostrou melhores resultados tanto para a enzima de HSV-1 quanto para a de HSV-2, estando de acordo com o que já havia sido demonstrado na literatura (POSPISIL *et al.*, 2002; SPADOLA *et al.*, 2003).

A análise das interações da timidina quinase de HSV-1 com alguns dos fármacos disponíveis no PDB (aciclovir, penciclovir e ganciclovir) (Figura 15), utilizando o *Ligplot* e o SPDBV, mostraram um mesmo modo de ligação dos fármacos, o resíduo Gln125 estava envolvido com interações com os três fármacos através de ligações de hidrogênio, enquanto Tyr101 participou de ligação hidrogênio com aciclovir e ganciclovir e Arg176 com aciclovir e penciclovir. Apesar do penciclovir fazer ligação de hidrogênio com apenas 2 resíduos foi observada a possibilidade de duas interações com Gln125. O ganciclovir interagiu com o resíduo His58 através de ligação de hidrogênio, no entanto essa interação não foi observada para os demais inibidores analisados.

Os resíduos Ile100, Met128, Tyr172, Arg222 e Glu225 foram observados interagindo com os três inibidores por interações de *van der Waals*. No caso do fármaco penciclovir foi observado uma maior quantidade de resíduos interagindo através das interações de *van der Waals* com o inibidor, se comparado aos demais inibidores. Isso pode ser devido à estrutura molecular do penciclovir que pode fornecer mais locais propícios a esse tipo de interação ligante-receptor. Esse fato pode auxiliar na maior afinidade observada do penciclovir pela timidina quinase, se

comparado, por exemplo, ao aciclovir, cuja afinidade é relativamente baixa (CHAMPNESS *et al.*, 1998). Ainda segundo Champness *et al.*, 1998, a porção guanina do aciclovir e do penciclovir faz ligações de hidrogênio com Gln125, fato que foi observado pela análise utilizando o *Ligplot* e o SPDBV (Quadro 1; Figura 15).

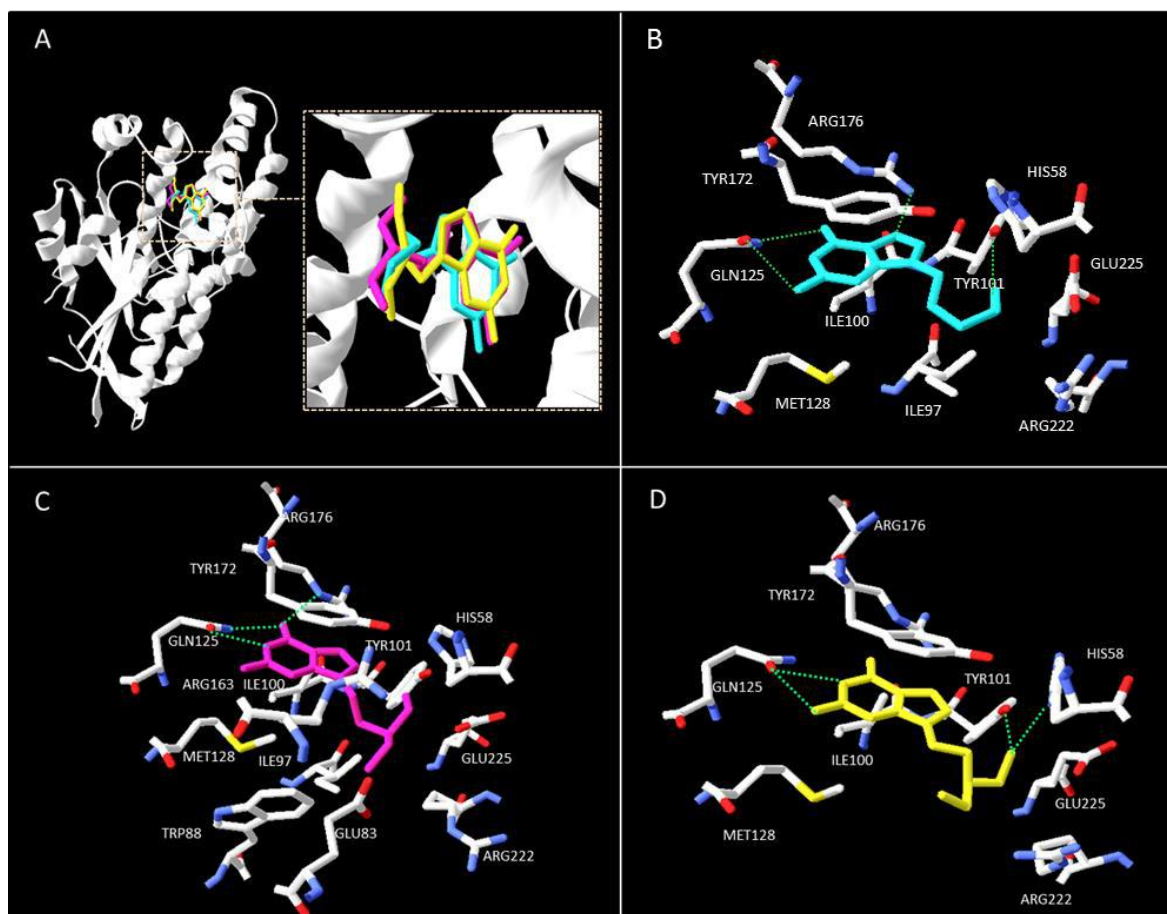


Figura 15: A) Sobreposição do aciclovir (azul claro), ganciclovir (amarelo) e penciclovir (rosa) na TK_{HSV-1}. Principais resíduos de aminoácidos de TK_{HSV-1} interagindo com B) aciclovir, C) penciclovir e D) ganciclovir. Tracejado verde representa ligações de hidrogênio.

A análise das interações da timidina quinase de HSV-2 com os mesmos fármacos, obtidas através do *docking* molecular (Figura 16A) também foram semelhante entre os inibidores aciclovir e ganciclovir, que interagiram por ligação hidrogênio com Tyr102, Arg177, Arg221 enquanto o penciclovir interagiu com Arg164, além da Arg177 e Arg221 (Figura 16). Foi observado que o resíduo de aminoácido Ile97 no HSV-1 foi substituído por Leu na mesma posição em HSV-2 (Leu98), o que poderia auxiliar a justificar possíveis diferenças no modo de ligação do inibidor com a enzima nos dois tipos de vírus (Quadro 1).

Quadro 1: Resíduos da timidina quinase de HSV-1 e HSV-2 que interagem com anti-herpéticos. Em vermelho está marcado o resíduo de aminoácido que é substituído comparando a enzima TK de HSV-1 e de HSV-2 e que participa da interação ligante-receptor.

Ligante	Ligação de hidrogênio (Resíduos da TK _{HSV-1})	Ligação de hidrogênio (Resíduos da TK _{HSV-2})	Interação de <i>van der Waals</i> (Resíduos da TK _{HSV-1})	Interação de <i>van der Waals</i> (Resíduos da TK _{HSV-2})
Aciclovir	Tyr101 Gln125 Arg176	Tyr102 Arg177 Arg221	His58 Ile97 Ile100 Met128 Tyr172 Arg222 Glu225	His58 Leu98 Ile101 Gln126 Met129 Tyr173 Met232
Ganciclovir	His58 Tyr101 Gln125	Tyr102 Arg177 Arg221	Ile100 Met128 Tyr172 Arg176 Arg222 Glu225	His58 Leu98 Ile100 Gln126 Met129 Tyr173 Arg223 Met232
Penciclovir	Gln125 Arg176	Arg164 Arg177 Arg221	His58 Glu83 Trp88 Ile97 Ile100 Tyr101 Met128 Arg163 Tyr172 Arg222 Glu225	His58 Glu84 Ile101 Tyr102 Gln126 Met129 Tyr173

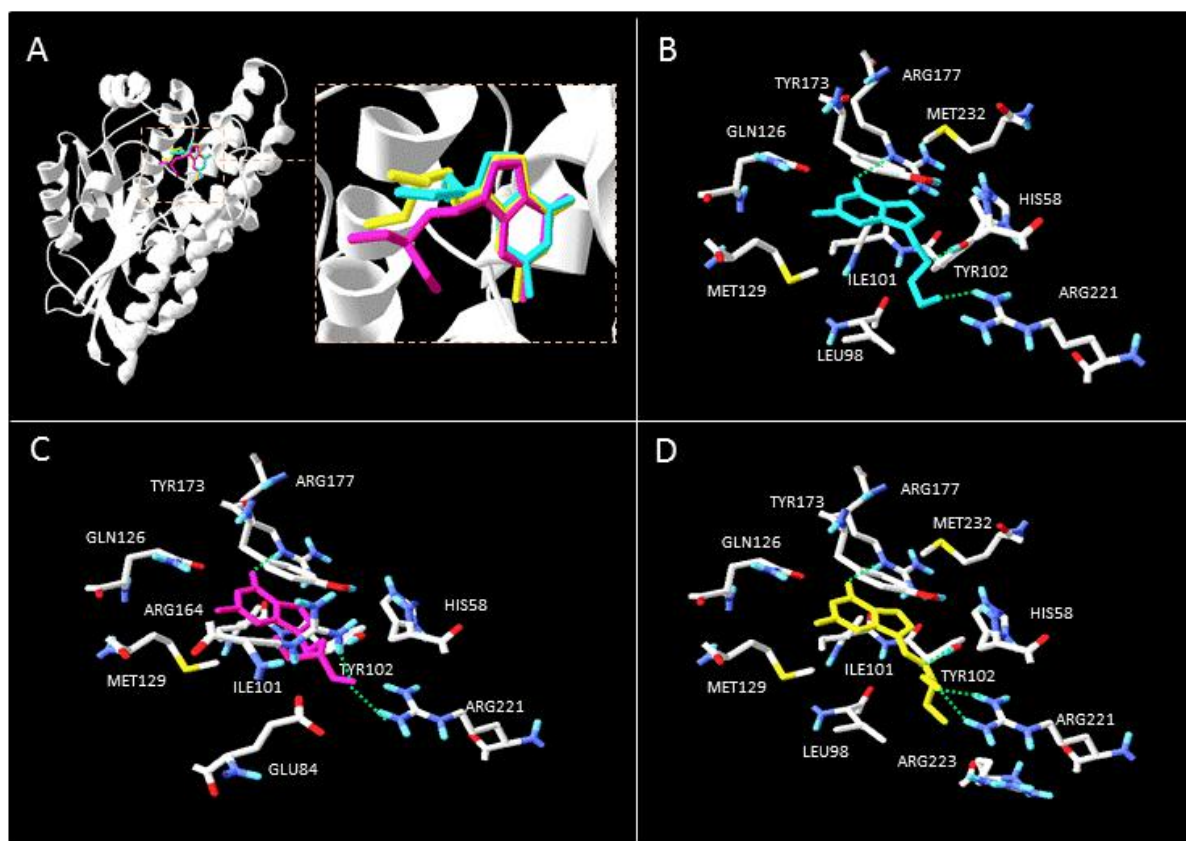


Figura 16: A) *Docking* do aciclovir (azul claro), ganciclovir (amarelo) e penciclovir (rosa) com a TK_{HSV-2}. Principais resíduos de aminoácidos de TK_{HSV-2} interagindo com B) aciclovir, C) penciclovir e D) ganciclovir. Tracejado verde representa ligações de hidrogênio.

Comparando as interações observadas entre estes fármacos com a TK de HSV-1 e de HSV-2 foi observado que alguns resíduos foram conservados interagindo com os inibidores como o Tyr101 (Tyr102 no HSV-2) que interage por ligação de hidrogênio tanto com o aciclovir quanto com o ganciclovir e o resíduo Arg176 (Arg177 em HSV-2) que interage com aciclovir e penciclovir. A respeito das interações de *van der Waals*, os resíduos Ile 100 (Ile 101 no HSV-2) e Met128 (Met129 no HSV-2) interagiram com todos os três inibidores. Já o resíduo His58 interagiu com o aciclovir e com o penciclovir, enquanto o Tyr172 (Tyr173 no HSV-2) interagiu com aciclovir e com o penciclovir.

5.2.1 Análise das interações da brivudina com a timidina quinase de HSV-1

Cheng *et al.*, 1981, mostrou em seu estudo uma série de compostos E-5-(2-halogenovinil)-2'-desoxiuridinas com afinidades diferentes pela timidina quinase de HSV-1, HSV-2 e VZV (Figura 17). O composto cujo substituinte é o bromo, E-5-(2-bromovinil) – dUrd (BVDU), atualmente denominado brivudina, mostrou um K_i de 0,24 ($\pm 0,09$) μM para a timidina quinase de HSV-1 e 4,24 ($\pm 1,30$) μM para a enzima de HSV-2, mostrando que a afinidade do composto é significativamente maior para timidina quinase do vírus do tipo 1. Além disso, mostrou que a concentração inibitória mínima para culturas de células infectadas com HSV-1 foi de 0,008 $\mu\text{g/ml}$, enquanto que para aquelas infectadas por HSV-2 foi de 1 $\mu\text{g/ml}$.

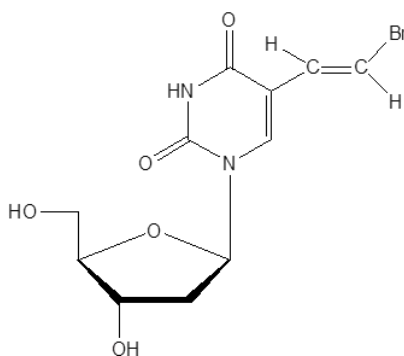


Figura 17: Estrutura da brivudina (BVDU).

Foi realizado um docking molecular para avaliar o modo de ligação do BVDU na enzima de HSV-2 e as interações foram comparadas com aquelas vistas na enzima de HSV-1 (Figura 18). Os parâmetros foram os mesmos do *docking* do aciclovir. A BVDU foi escolhida por ser um fármaco também usado no tratamento do herpes e por apresentar diferente afinidade pelas enzimas TK de HSV-1 e HSV-2. A brivudina foi descrita em 1979 como sendo um análogo nucleosídeo da timidina que mostrou ser um potente inibidor seletivo da timidina quinase de HSV-1 e VZV. A brivudina é mais eficaz no tratamento de indivíduos imunocomprometidos, se comparado ao aciclovir e, além disso, pode ser administrado oralmente em uma dose total reduzida e com menor frequência de dosagem, comparando com outros agentes antivirais disponíveis (BATISTA, 2011).

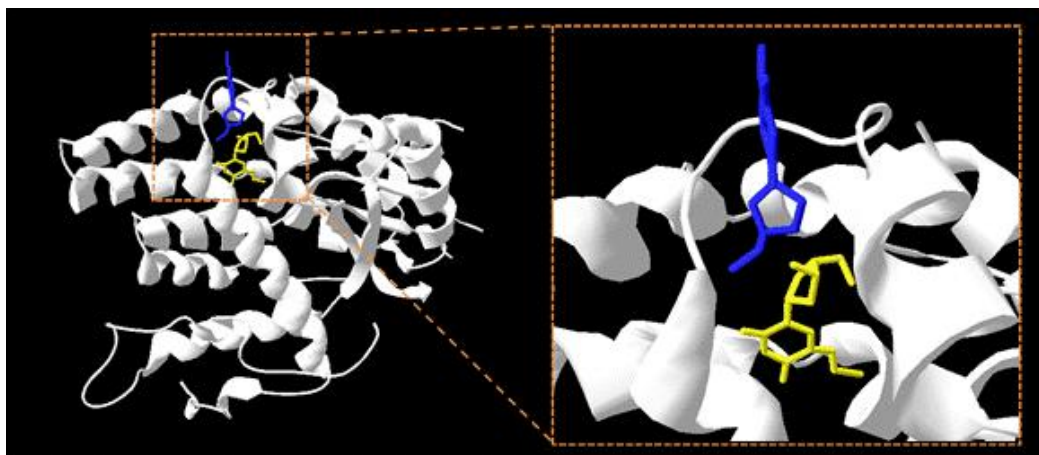


Figura 18: Docking do BVDU com a TK_{HSV-2} (azul) em comparação com a estrutura cristalográfica da enzima de HSV-1 (código PDB = 1K18).

Analisando os resíduos da timidina quinase de HSV-1 e HSV-2 que interagem com a brivudina (Quadro 2) foi possível observar que o modo de ligação do composto com as enzimas foi bastante diferente, e que a maioria dos resíduos que fazem ligações de hidrogênio e interações de *van der Waals*, também foi diferente nas duas enzimas. O BVDU na enzima de HSV-1 ocupou o mesmo sítio de ligação do aciclovir, interagindo de forma semelhante ao fármaco. Já na enzima de HSV-2, o BVDU ocupou um local diferente e a pose de menor energia teve energia de ligação igual a -7,62 Kcal/mol, enquanto a conformação parecida com o cristal de HSV-1 teve valor de energia de ligação maior (-6,71 Kcal/mol), sugerindo que o composto não inibe de forma eficaz a atividade enzimática, o que pode explicar o resultado obtido por Cheng *et al.*, 1981.

Quadro 2: Resíduos da timidina quinase de HSV-1 e HSV-2 que interagem com BVDU.

Enzima	Ligação de hidrogênio	Interação de <i>van der Waals</i>
TK _{HSV-1}	Glu83 Tyr101 Gln125	His58; Trp88; Ile97; Ile100; Met128; Ala168; Tyr172; Arg222; Glu225
TK _{HSV-2}	Tyr102 Leu218 Asp229	His58; Arg221; Gln222; Arg223; Ala226; Leu228

5.3 Modelos dos mutantes da enzima timidina quinase de HSV-1

Utilizando o programa SPDBV foram construídos os mutantes da enzima timidina quinase de HSV-1 (Código PDB= 1P7C) (Quadro 3; Figura 19). Os mutantes foram construídos tendo como base mutações observadas em vírus resistentes ao aciclovir, isolados de amostras clínicas de acordo com a literatura disponível.

Quadro 3: Resíduos de aminoácidos mutados na timidina quinase de HSV-1 relacionados à resistência ao aciclovir.

Mutações relacionadas à resistência	Tipo de HSV	Citação
Arg51Trp Glu83 Lys His105Pro Ala175Val Leu364Pro	HSV-1	Morfin <i>et al.</i> , 2000
Asp162Ala Arg220Cys Ala189Val + Leu227Phe	HSV-1	Chibo <i>et al.</i> , 2004
Arg222His	HSV-1	Bestman-Smith <i>et al.</i> , 2001
Tyr53His + Arg163His Tyr172Cys Ala174Pro	HSV-1	Sauerbrei <i>et al.</i> , 2010



Figura 19: Timidina quinase selvagem destacando os resíduos substituídos e enzimas mutantes de HSV-1. Distâncias entre o resíduo mutado e a posição ocupada pelo aciclovir no sítio ativo

Foi realizada uma análise daqueles resíduos mutados que se encontravam próximos do sítio ativo da enzima e poderiam influenciar mais diretamente na ligação com os inibidores. Para isto foi considerada a distância inferior a 10 Å entre o resíduo de aminoácido e a posição do aciclovir no sítio ativo da enzima de HSV-1 disponível no PDB. Os resíduos próximos do sítio ativo foram aqueles que ocuparam as posições 83, 162, 163, 172, 174 e 175 na enzima de HSV-1.

Os mutantes minimizados foram submetidos à análise do gráfico de Ramachandran para avaliação da qualidade estereoquímica dos modelos, sendo que todos apresentaram valores aceitáveis e semelhantes ao molde, com resíduos nas regiões favoráveis acima de 90% e, apesar do percentual de resíduos nas regiões desfavoráveis não ser igual a zero, como Laskowski *et al.*, 1993, demonstra ser o ideal, o percentual de resíduos das enzimas mutantes foi igual ao da enzima selvagem nessas regiões, 1,5% (Tabela 3).

Tabela 3: Percentual de resíduos nas regiões favoráveis, permitidas e desfavoráveis do gráfico de Ramachandran da enzima timidina quinase de HSV-1 selvagem e dos mutantes.

Estruturas	% Resíduos nas regiões		
	Favoráveis	Permitidas	Não favoráveis
1P7C	90,5	8,0	1,5
Arg51Trp	92,0	6,5	1,5
Tyr53His + Arg163His	90,9	7,6	1,5
Glu83Lys	91,7	6,8	1,5
His105Pro	91,6	6,9	1,5
Asp162Ala	91,3	7,2	1,5
Tyr172Cys	90,9	7,6	1,5
Ala174Pro	90,9	7,6	1,5
Ala175Val	91,7	6,8	1,5
Ala189Val + Leu227Phe	90,9	7,6	1,5
Arg220Cys	90,9	7,6	1,5
Arg222His	90,9	7,6	1,5
Leu364Pro	91,6	6,9	1,5

Em relação às outras metodologias de validação dos modelos de timidina quinase mutantes de HSV-1, as enzimas mutantes apresentaram elevadas porcentagens de resíduos acima do score 0,2 no Verify-3D, sendo que os percentuais ficaram entre 96,87 e 97,81. A respeito do score-Z fornecido pelo ProSA-web, os mutantes de HSV-1 apresentaram valores semelhantes àqueles observados para a enzima selvagem, entre -8,74 e -8,39 (Tabela 4; Figura 20).

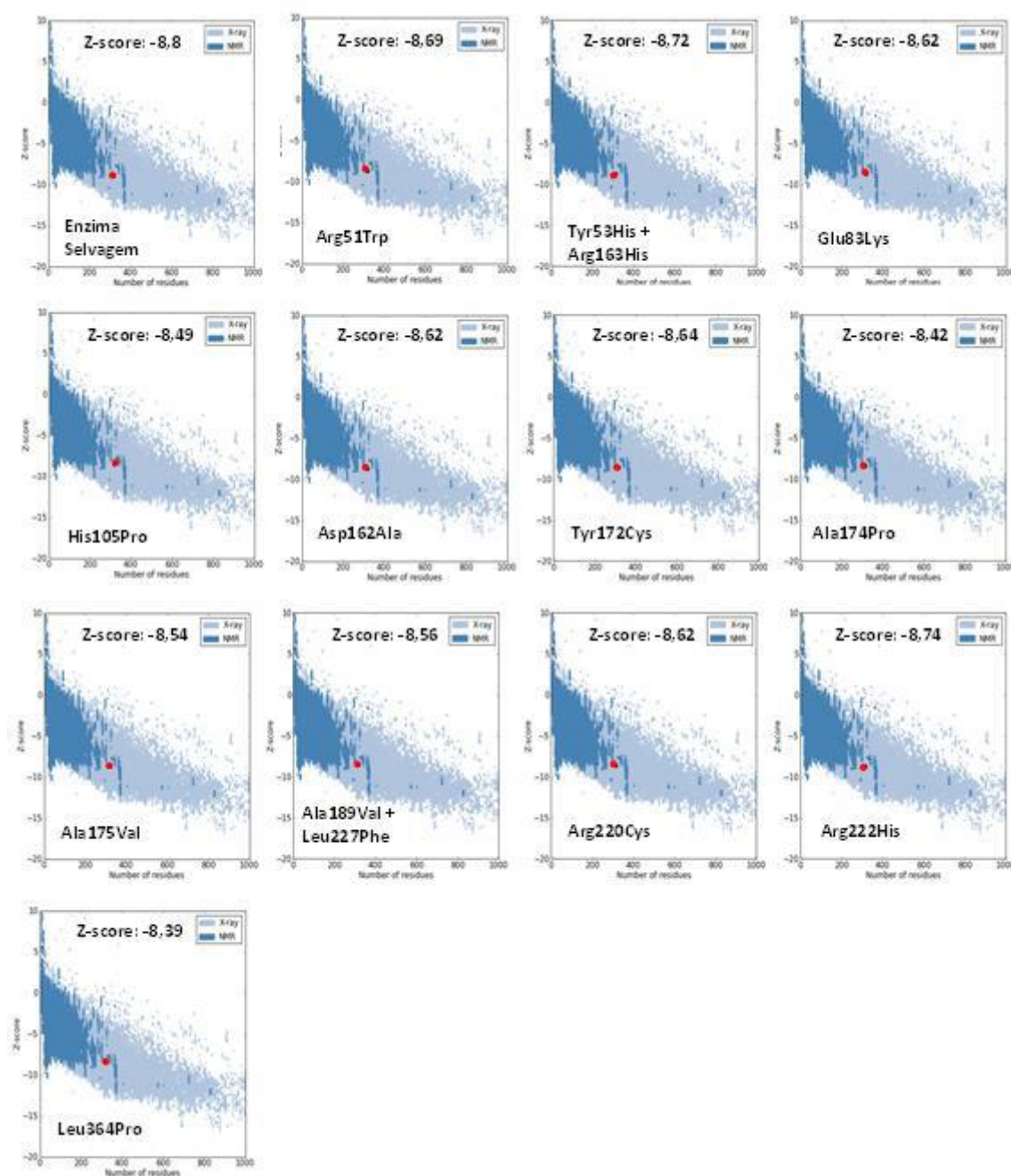


Figura 20: Mapas do score-Z das estruturas de timidina quinase de HSV-1 selvagem e mutantes, fornecidos pelo programa ProSA-web.

Tabela 4: Avaliação da compatibilidade 3D-1D dos modelos de timidina quinase mutantes de HSV-1. Percentual de resíduos com score maior que 0,2 no Verify-3D.

Mutante	% de resíduos com score > 0,2 (Verify 3D)
1P7C	96,87
Arg51Trp	97,49
Tyr53His + Arg163His	96,87
Glu83Lys	97,81
His105Pro	97,81
Asp162Ala	97,81
Tyr172Cys	97,49
Ala174Pro	96,87
Ala175Val	97,81
Ala189Val + Leu227Phe	96,87
Arg220Cys	96,87
Arg222His	96,87
Leu364Pro	97,81

Todos os resultados obtidos nas metodologias de validação dos modelos de mutantes de HSV-1 juntos, mostram a confiabilidade dos mesmos.

A análise do mapa de potencial eletrostático mostrou um perfil semelhante entre a maioria das enzimas TK mutantes e a enzima selvagem (Figura 21). Algumas diferenças foram observadas nos mutantes Glu83Lys, Asp162Ala, Tyr53His + Arg163His, mostrando que mutações pontuais realizadas na estrutura tridimensional das enzimas modificaram o perfil de distribuição de cargas destas. Os mutantes Glu83Lys e Asp162Ala apresentaram regiões menos negativas se comparados à enzima selvagem, isto provavelmente ocorreu porque os resíduos de aminoácidos substituídos não apresentam carga ou apresentam carga positiva, enquanto o mutante Tyr53His + Arg163His apresentou regiões mais negativas.

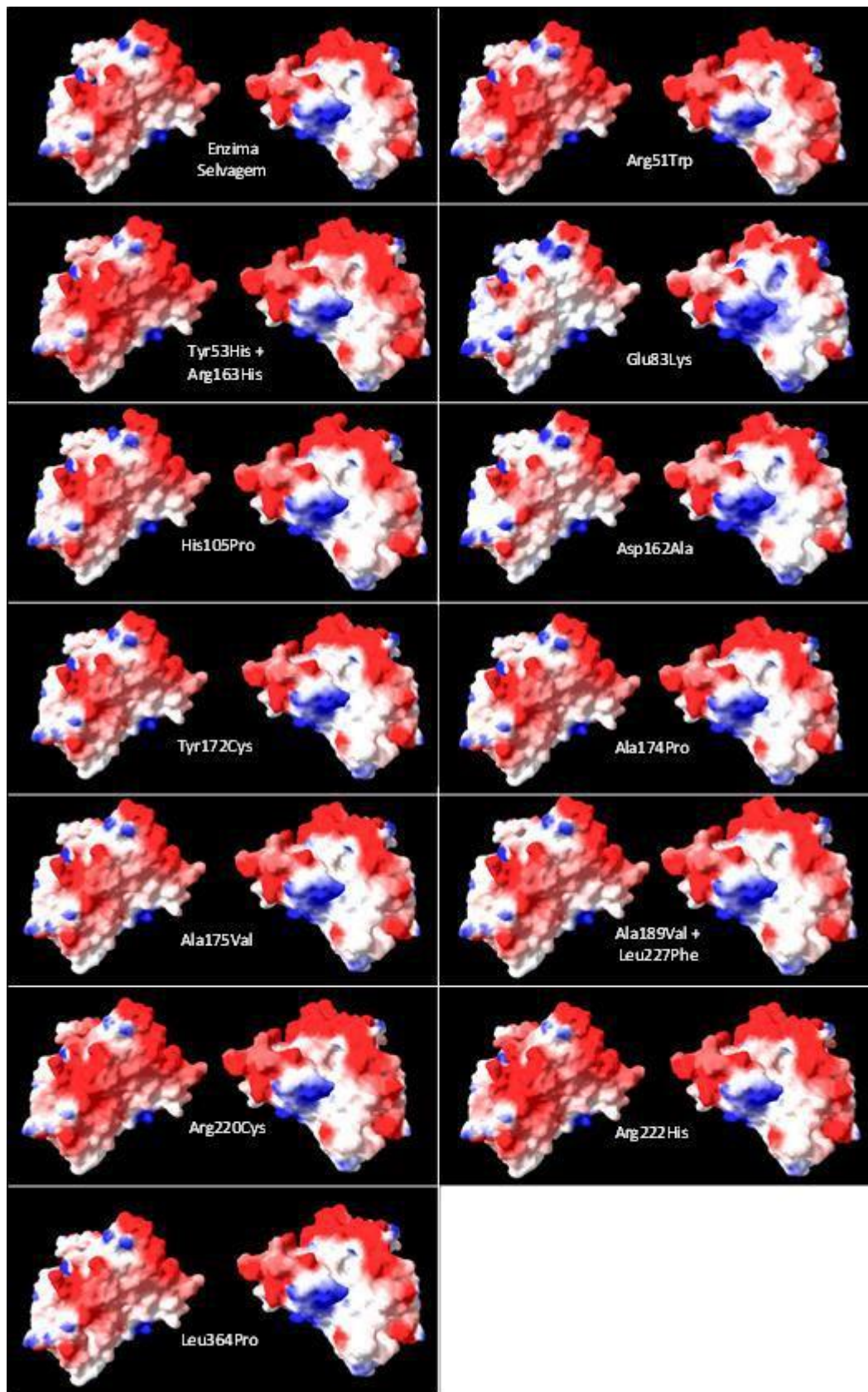


Figura 21: Mapas de potencial eletrostático da timidina quinase de HSV-1 selvagem e mutantes. Mapas em uma visão de um lado e em uma visão a 180° na lateral. Regiões tendendo para o azul são mais positivas e para o vermelho, mais negativas

5.4 Avaliação das interações do aciclovir com as enzimas timidina quinases mutantes de HSV-1

Em seguida, foi realizado o *docking* do aciclovir com as doze enzimas mutantes de HSV-1, seguindo os mesmos parâmetros utilizados no *redocking*. As interações entre o aciclovir e as enzimas foram avaliadas utilizando o Ligplot e o SPDBV. Os complexos foram avaliados de acordo com a energia de ligação, a quantidade de agrupamentos (*clusters*) próximos entre si considerando 2 Å de distância e análise da energia de ligação da conformação semelhante à estrutura cristalográfica. Foi realizada a análise das ligações de hidrogênio, as interações de *van der Waals*, assim como a energia de ligação, a quantidade de conformações presentes no *cluster* de menor energia (Quadro 4).

Os *dockings* realizados com as enzimas mutantes de HSV-1 (Figura 22) mostraram que as energias de ligação dos complexos de menor energia variaram entre -5,74 a -6,57 Kcal/mol, valores próximos ao encontrado no *redocking* que foi de -6,77 Kcal/mol. A quantidade de conformações no *cluster* de menor energia teve uma variação bastante significativa entre os mutantes, variando de 4 a 45, sendo que o mutante Arg222His foi o que apresentou maior quantidade de conformações no *cluster* de menor energia, assim como foi o que apresentou menor energia de ligação (-6,57 Kcal/mol).

Comparando-se a estrutura cristalográfica de timidina quinase de HSV-1 com as enzimas mutantes, em relação às ligações de hidrogênio entre o aciclovir e os resíduos das enzimas, é possível observar que a maioria dos resíduos dos mutantes é bastante diferente daqueles observados na interação da enzima selvagem com o inibidor. Isto pode indicar que essas mutações poderiam estar relacionadas à resistência ao aciclovir por interagirem de forma diferente com o inibidor da enzima. No entanto, alguns mutantes apresentaram algumas interações em comum com enzima selvagem como é o caso do Tyr101 e Arg176, no mutante Ala174Pro, por exemplo. Além disso, observou-se que alguns resíduos das enzimas mutantes que fazem interação de *van der Waals* também diferem dos resíduos da enzima selvagem, o que também corrobora com a hipótese de que os diferentes modos de interação do ligante com a proteína podem influenciar diretamente na inibição da enzima e, conseqüentemente, na resistência ao fármaco.

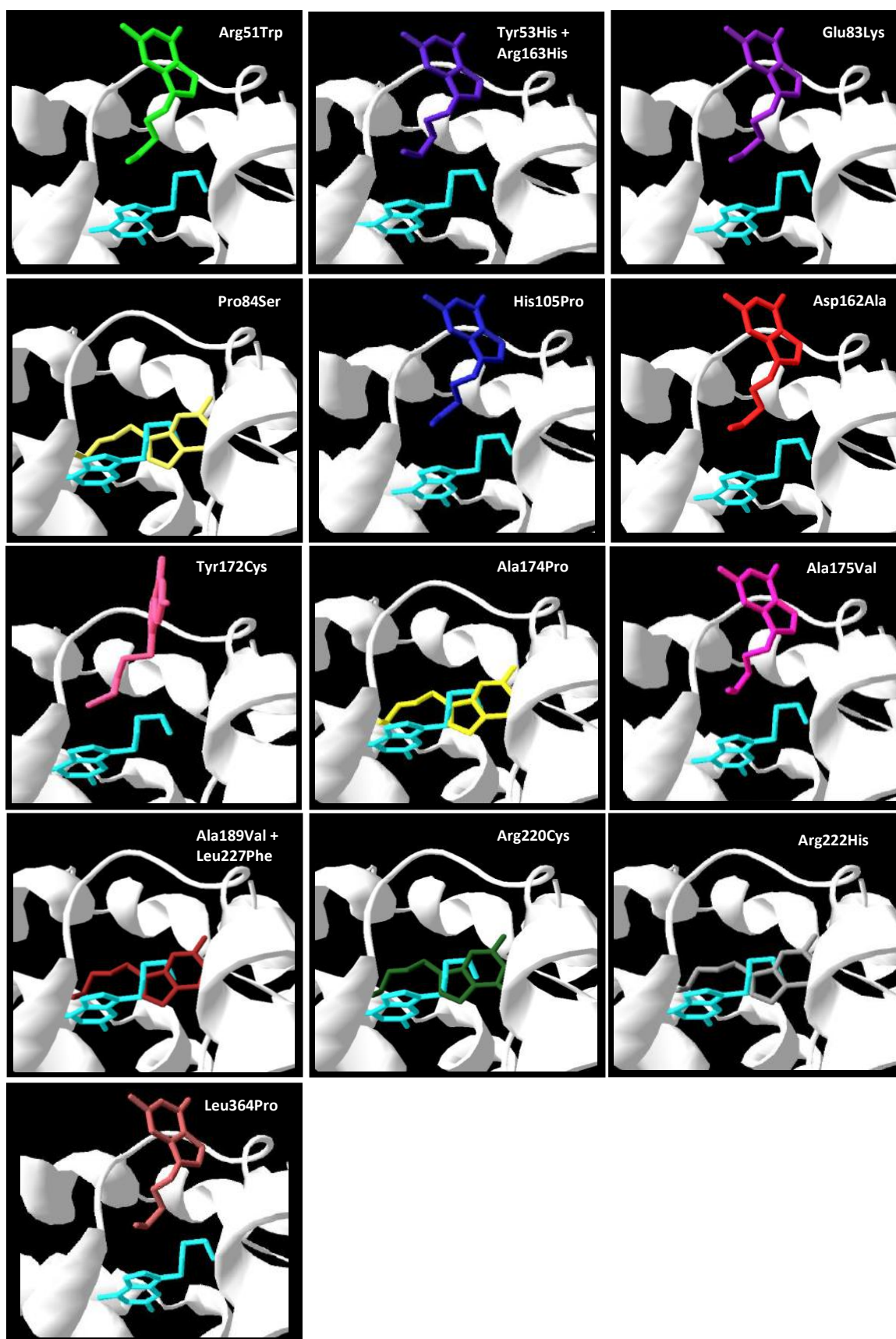


Figura 22: Enzimas timidina quinase mutantes de HSV-1. A molécula azul representa a estrutura do aciclovir originalmente presente na estrutura cristalográfica. As demais moléculas representam estruturas do *docking*.

Quadro 4: Interações proteína-ligante obtidas a partir do complexo formado no *docking*. A estrutura da TK_{HSV-1} utilizada no *redocking* apresenta código PDB 2KI5.

Enzima	Ligação Hidrogênio	Interações de <i>van der Waals</i>	Energia de ligação (EL - Kcal/mol)	Nº conformações no <i>cluster</i>	<i>Cluster</i> da conformação semelhante a 2KI5	EL da conformação semelhante a 2KI5
TK _{HSV1}	Tyr101; Gln125; Arg176	His58; Ile97; Ile100; Met128; Tyr172; Arg222; Glu225	-6,77	50	-	-6,77
Arg51Trp	Arg222; Arg226; Leu227; Asp228	His58; Tyr101; Leu217; Arg220; Gln221; Glu225	-6,26	7	5º	-5,07
Tyr53His + Arg163His	Arg222; Arg226; Leu227; Asp228	His58; Tyr101; Leu217; Arg220; Gln221; Glu225	-6,25	4	3º	-5,9
Glu83Lys	Arg222; Arg226; Leu227; Asp228	His58; Tyr101; Leu217; Arg220; Gln221; Glu225	-6,18	22	5º	-4,97
His105Pro	Arg222; Leu227; Asp228	His58; Tyr101; Leu217; Arg220; Gln221; Glu225; Arg226	-6,18	7	6º	-5,18
Asp162Ala	Arg222; Arg226; Leu227; Asp228	His58; Tyr101; Leu217; Arg220; Gln221; Glu225	-6,17	10	5º	-5,09
Tyr172Cys	Ala218; Arg226; Asp228	Tyr101; Leu217; Arg220; Gln221; Arg222; Glu225; Leu227	-5,74	14	5º	-4,9
Ala174Pro	Glu83; Tyr101; Arg176	His58; Ile100; Arg163; Tyr172; Arg220; Glu225	-6,22	42	5º	-5,16
Ala175Val	Arg222; Arg226; Leu227; Asp228	His58; Tyr101; Leu217; Arg220; Gln221; Glu225	-6,1	10	6º	-5,12
Ala189Val + Leu227Phe	Glu83; Tyr101; Arg176	His58; Ile100; Arg163; Tyr172; Arg220; Glu225; Met231	-6,27	42	5º	-4,98
Arg220Cys	Glu83; Tyr101; Arg176	His58; Ile97; Ile100; Arg163; Tyr172; Glu225; Met231	-6,13	34	6º	-5,14
Arg222His	Glu83; Tyr101; Arg176	His58; Ile100; Arg163; Tyr172; Arg220; Glu225; Met231	-6,57	45	5º	-5,22
Leu364Pro	Arg222; Arg226; Leu227; Asp228	His58; Tyr101; Leu217; Arg220; Gln221; Glu225	-6,15	10	4º	-5,16

A análise da estrutura da timidina quinase de HSV mostrou que determinados aminoácidos nos locais funcionais da enzima são essenciais para manter a integridade da estrutura tridimensional da enzima (CHIBO *et al.*, 2004). Mutações nos domínios catalíticos ou regiões conservadas das enzimas da família *Herpesviridae*, presume-se serem responsáveis pela resistência ao aciclovir por promover uma timidina quinase truncada (BESTMAN-SMITH *et al.*, 2001; SAIJO *et al.*, 2002), com consequente perda da atividade de fosforilação por afetar a estrutura tridimensional de todo o sítio ativo (PIRET e BOIVIN, 2011). Como já descrito por Darby *et al.*, 1986, a atividade catalítica da enzima timidina quinase depende de três locais importantes: um sítio de ligação do ATP (aminoácidos 51 a 63), o sítio de ligação dos nucleosídeos (aminoácidos 168 a 176) e uma cisteína na posição 336.

Neste estudo, foi observado que as mutações Arg51Trp, Tyr53His + Arg163His, Tyr172Cys, Ala174Pro e Ala175Val tratavam-se de mutações em regiões do domínio catalítico da timidina quinase e, dessa forma, é possível relacioná-las à resistência ao aciclovir. Substituições de aminoácidos em regiões conservadas que causam resistência ao fármaco em isolados clínicos de HSV-1 foram Glu83Lys, Asp162Ala, Arg220Cys e Arg222His. Em contraste, as mutações His105Pro, Ala189Val + Leu227Phe e Leu364Pro estavam localizadas em regiões não conservadas da enzima, no entanto, também estão relacionadas à resistência ao fármaco.

Foi realizada uma análise da pose do aciclovir nas TK_{HSV-1} mutantes que mais se assemelha àquela observada para o aciclovir na estrutura cristalográfica e foi observado que em todos os mutantes esta pose não foi a de menor energia de ligação, sendo o quinto ou o sexto *cluster* de menor energia. Isso mostra que de acordo com os estudos de *docking* molecular o aciclovir teve uma afinidade maior por outro local do que pelo sítio ativo da enzima, já que a interação neste outro local mostrou energia de ligação menor, sendo, portanto mais favorável.

6 CONCLUSÃO

Nesse estudo foi possível a construção do modelo de timidina quinase de HSV-2, que ainda não teve sua estrutura cristalográfica elucidada por métodos experimentais. A validação do modelo apresentou valores favoráveis e semelhantes ao molde e, apesar da semelhança entre as estruturas terciárias da proteína molde e do modelo, a análise do mapa de potencial eletrostático apresentou um perfil de distribuição de cargas diferente.

A análise das interações do aciclovir com a timidina quinase de HSV-1 e HSV-2 mostrou que a melhor estratégia para os estudos de *docking* molecular foi aquela que não considerava a presença do cofator ATP, nem a do sulfato e das moléculas de água no sítio ativo.

A comparação entre as interações do aciclovir e seus análogos, ganciclovir e penciclovir, com a timidina quinase de HSV-1 e HSV-2 mostrou alguns resíduos da timidina quinase em comum interagindo com os três inibidores por ligações de hidrogênio e interações de *van der Waals*. Da mesma forma, alguns resíduos interagiram de forma diferente entre os inibidores. Já em relação à brivudina, fármaco com perfil de afinidade diferente entre as TK_{HSV-1} e TK_{HSV-2}, a análise das interações mostrou que o composto apresentou uma maior afinidade por outro local da enzima de HSV-2 que não era o sítio ativo, justificando a sua baixa eficácia para infecções pelo vírus HSV-2.

A construção dos mutantes da TK_{HSV-1} mostrou que alguns resíduos mutados influenciaram na ligação com os inibidores da enzima por estarem próximos ao sítio ativo podendo interagir diretamente. As mutações mais distantes do sítio ativo influenciaram de forma indireta levando a um encaixe diferente do aciclovir quando comparado com a enzima de HSV-1 selvagem ou com o modelo de timidina quinase de HSV-2. Isto pode estar relacionado a diferenças nas cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos da proteína, proporcionando encaixe diferente, já que não ocorre interação direta com o resíduo mutado.

A análise das interações do aciclovir com as enzimas TK_{HSV-1} mutantes mostrou que o diferente modo de ligação, bem como a interação com resíduos diferentes da enzima selvagem podem justificar a resistência ao aciclovir nos mutantes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, P.A. **Estudo de alvos terapêuticos e ligantes em doenças neurodegenerativas e neuroinfecções por modelagem molecular**. 2011. 166f. Tese (Doutorado em Neurociências) – Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2011a.

ABREU, P.A.; SILVA, V.A.G.G.; SANTOS, F.C.; CASTRO, H.C.; RISCADO, C.S.; SOUZA, M.T.; RIBEIRO, C.P.; BARBOSA, J.E.; SANTOS, C.C.C.; RODRIGUES, C.R.; LIONE, V.; CORREA, B.A.M.; CUNHA, A.C.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, M.C.B.V.; PAIXÃO, I.C.N.P. Oxoquinoline derivatives: identification and structure-activity relationship (SAR) analysis of new anti-HSV-1 agents. **Curr Microbiol.** v. 62, n. 5, p. 1349-54, 2011b.

ALILA Medical Images. **A Herpes virus**. Disponível em: < <http://medicalimages.photoshelter.com/image/I0000OOaQrOunIQ4> > Acesso em: 02 dez. 2013.

BACON, T.H.; LEVIN, M.J.; LEARY, J.J.; SARISKY, R.T.; SUTTON, D. Herpes Simplex Virus Resistance to Acyclovir and Penciclovir after Two Decades of Antiviral Therapy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 1, p.114-128, 2003.

BATISTA, J.C.R. **Mecanismo de acção de substâncias antivirais**. 2011. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto. 2011.

BESTMAN-SMITH, J.; SCHMIT, I.; PAPADOPOULOU, B.; BOIVIN, G. Highly Reliable Heterologous System for Evaluating Resistance of Clinical Herpes Simplex Virus Isolates to Nucleoside Analogues. **Journal of Virology**, v. 75, n. 7, p. 3105-3110, 2001.

BOYD, M.R., SAFRIN, S.; KERN, E.R. Penciclovir: a Review of its Spectrum of Activity, Selectivity, and Cross-Resistance Pattern. **Antiviral Chem Chemother**, v. 4, p. 3-11, 1993.

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

BURREL, S.; AIME, C.; HERMET, L.; AIT-ARKOUB, Z.; AGUT, H.; BOUTOLLEAU, D. Surveillance of herpes simplex virus resistance to antivirals: A 4-year survey. **Antiviral Research**, v. 100, n.2, p. 365–372, 2013.

CARVALHO, I.; PUPO, M.T.; BORGES, Á.D.L.; BERNARDES, L.S.C. introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de Química Farmacêutica. **Quim. Nova**, v. 26, n. 3, p. 428-438, 2003.

CELUM C, LEVINE R, WEAVER M, WALD A. Genital herpes and human immunodeficiency virus: double trouble. **Bull World Health Organ** v.82, n.6; p. 447-453, 2004.

CHAMPNESS, J.N.; BENNETT, M.S.; WIEN, F.; VISSE, R.; SUMMERS, W.C.; HERDEWIJN, P.; DE CLERCQ, E.; OSTROWSKI, T.; JARVEST, R.L.; SANDERSON, M.R Exploring the Active Site of Herpes Simplex Virus Type-1 Thymidine Kinase by X-Ray Crystallography of Complexes With Aciclovir and Other Ligands. **PROTEINS: Structure, Function, and Genetics**, v. 32, n. 3, p. 350–361, 1998.

CHENG, Y.C.; DUTSCHMAN, G.; DE CLERCQ, E.; JONES, A.S.; RAHIM, S.G.; VERHELST, G.; WALKER, R.T. Differential Affinities of 5-(2-Halogenovinyl)-2'-Deoxyuridines for Deoxythymidine Kinases of Various Origins. **Molecular Pharmacology**, v. 20, n. 1, p. 230-233, 1981.

CHIBO, D.; DRUCE, J.; SASADEUSZ, J.; BIRCH, C. Molecular analysis of clinical isolates of acyclovir resistant herpes simplex virus. **Antiviral Research**, v. 61, n. 2, p. 83–91, 2004.

CLEMENS, S.A.; FARHAT, C.K. Soroprevalência de anticorpos contra vírus herpes simples 1-2 no Brasil, **Revista Saúde Pública** v. 44, n. 4, p.726-734, 2010.

CONDE-GLEZ, C., LAZCANO-PONCEA, E.; ROJASA, R.; DEANTONIO, R.; ROMANO-MAZZOTTIB, L.; CERVANTES, Y.; ORTEGA-BARRIA, E. Seroprevalences of varicella-zoster virus, herpes simplex virus and cytomegalovirus in a cross-sectional study in Mexico. **Vaccine**, v. 31, n. 44, p. 5067– 5074, 2013.

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 1**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Fluminense, 2007.

DARBY, G.; LARDER, B.A.; INGLIS, M.M. Evidence that the 'Active Centre' of the Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase Involves an Interaction between Three Distinct Regions of the Polypeptide. **J. Gen. Virol.** v. 67, n. 4, p. 753-758, 1986.

DE CLERCQ, E.; HOLY, A. Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 11, p. 928–940, 2005.

DE CLERCQ, E. In search of a selective therapy of viral infections. **Antivir Res**, v. 85, n. 1, p. 19–24, 2010.

ERLICH, K. S.; MILLS, J.; CHATIS, P.; MERTZ, G. J.; BUSCH, D. F.; FOLLANSBEE, S. E.; GRANT, R. M.; CRUMPACKER, C. S. Aciclovir-resistant herpes simplex virus infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **N Engl J Med**, v. 320, n. 5, p. 293–296, 1989.

ERNST, M. E., FRANEY, R. J. Acyclovir and ganciclovir-induced neurotoxicity. **Ann Pharmacother**, v. 32, n. 1, p. 111–113, 1998.

FATAHZADEH, M.; SCHWARTZ, R.A. Human herpes simplex virus infections: Epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis and management, **J Am Acad Dermatol** v. 57, n. 5, 2007.

FILHO, O. A.; ALENCASTRO R. B. Modelagem de proteínas por homologia, **Quim. Nova**, v. 26, n. 2, p. 253-259, 2003.

FERREIRA, D.C. et al. Recurrent herpes simplex infections: laser therapy as a potential tool for long-term successful treatment. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 44, n. 3, p. 397-399, 2011.

FROBERT, E.; OOKA, T.; CORTAY, J.C.; LINA, B.; THOUVENOT, D.; MORFIN, F. Resistance of herpes simplex virus type 1 to acyclovir: Thymidine kinase gene mutagenesis study. **Antiviral Research**, v.73, n.2, p. 147–150, 2007a.

FROBERT, E.; THOUVENOT, D.; LINA, B.; MORFIN, F. Détection par Génotypage de la Résistance des Virus Herpes Simplex à L'aciclovir. **Pathologie Biologie**, v. 55, n.10, p. 504–511, 2007b.

GRAAF, C.; POSPISIL, P.; POS, W.; FOLKERS, G.; VERMEULEN, N.P.E. Binding Mode Prediction of Cytochrome P450 and Thymidine Kinase Protein-Ligand Complexes by Consideration of Water and Rescoring in Automated Docking. **J. Med. Chem.**, v. 48, n.7, p. 2308-2318, 2005.

GRECO A., DIAZ J-J.; THOUVENOT D., MORFIN F. Novel targets for the development of anti-herpes compounds, **Infect Disord Drug Targets**. v. 7, n.1, p. 11- 18, 2007.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D. Modelagem molecular de fármacos, **Rev. Proc. Quim.** v. 2, n.4, p. 24-26, 2008.

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

HARDIN, T. C. Sexually transmitted diseases. In: Herfindal, E. T., Gourley, D. R. (Eds.), **Textbook of Therapeutics-Drug and Disease Management**. Williams and Wilkins, p. 1389–1404, 1996.

HUSSIN, A.; SHAFINAZ N.; IBRAHIM, N. Phenotypic and genotypic characterization of induced acyclovir-resistant clinical isolates of herpes simplex virus type 1. **Antiviral Research**, v. 100, n.2, p. 306–313, 2013.

JARVEST, R.L.; SUTTON, D.; HODGE, R.A.V. Famciclovir. Discovery and development of a novel antiherpesvirus agent. **Pharm Biotechnol**, v.11, n.1, p. 313-343, 1998.

KRIPPAHL, L. **Determinação da Estrutura de Proteínas através de Programação por Restrições**. 1999. 89f. Dissertação (Mestrado em Inteligência Artificial Aplicada) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 1999.

LASKOSWKI, R.A.; MACARTHUR, M.W.; MOSS, D.S.; THORTON, J.M. PROCHECK: a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. **J. Appl. Cryst.** v. 26, p. 283- 291, 1993.

LUCERO, B.; GOMES, C.R.; FRUGULHETTI, I.C.; FARO, L.V.; ALVARENGA, L.; SOUZA; M.C.; DE SOUZA, T.M; FERREIRA, V.F. Synthesis and anti-HSV-1 activity of quinolonic acyclovir analogues, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n.4, p. 1010-1013, 2006.

LUPI, O; SILVA, A.G.; PEREIRA JR. AC. Novas perspectivas no tratamento do herpes simples. **J Bras DST**, v. 7, n.3, p. 9-12, 1995.

LUPI, O; PEREIRA, J.R. Herpes simples, **Rev. An. Brasileiros Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 75, n.3, p. 261-275, 2000.

LUTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, v. 356, n.6364, p. 83-5, 1992.

LYON, A. W.; MANSOOR, A.; TROTTER, M. J. Urinary gems: acyclovir crystalluria. **Arch Pathol Lab Med**, v. 126, n.6, p. 753–754, 2002.

MARTINHO, A. **Herpesvirus humanos**. [monografia]. Évora (Portugal): Universidade de Évora; 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças Infecciosas e Parasitárias - Guia de Bolso 8ª** edição. Brasília, 2010.

MORFIN, F. ; SOUILLET, G. ; BILGER, K. ; OOKA, T. ; AYMARD, M. ; THOUVENOT, D. Genetic Characterization of Thymidine Kinase from Acyclovir-Resistant and Susceptible Herpes Simplex Virus Type 1 Isolated from Bone Marrow Transplant Recipients. **The Journal of Infectious Diseases** v. 182, n.1, p. 290–293, 2000.

MORFIN, F.; THOUVENOT, D. Herpes Simplex Virus Resistance to Antiviral Drugs. **Journal of Clinical Virology**, v. 26, n.1, p. 29-37, 2003.

NETCHIPOROUK, E.; TCHERVENKOV, J.; PARASKEVAS, S.; SASSEVILLE, BILLICK, D.R. Evaluation of Herpes Simplex Virus Infection Morbidity and Mortality in Pancreas and Kidney-Pancreas Transplant Recipients. **Transplantation Proceedings**, v. 45, n.9, p. 3343-3347, 2013.

ORVEDAHL, A. E.; LEVINE, B. Autophagy and viral neurovirulence. **Cell Microbiol**, v. 10, n.9, p. 1747-56, 2008.

PENELLO, A.M.; CAMPOS, B.C.; SIMÃO, M.S.; GONÇALVES, M.A.; SOUZA, P.M.T.; SALLES, R.S.; PELLEGRINI, E. Herpes Genital. **J Bras Doenças Sex Transm**, v. 22, n.2, p. 64-72, 2010.

PIRET, J.; BOIVIN, G. Resistance of Herpes Simplex Viruses to Nucleoside Analogues: Mechanisms, Prevalence, and Management **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 55, n. 2, p. 459–472, 2011.

POSPISIL, P.; KUONI, T.; SCAPOZZA, L.; FOLKERS, G. Methodology and Problems of Protein Ligand Docking: Case Study of Dihydroorotate Dehydrogenase, Thymidine Kinase and Phosphodiesterase 4. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 22, n. 1-4, p. 141-154, 2002.

RILEY, L.E. Herpes Simplex Virus. **Seminars in Perinatology**, v. 22, n. 4, p. 284-292, 1998.

SAIJO, M.; SUZUTANI, T.; NIIKURA, M.; MORIKAWA, S.; KURANE, I. Importance of C-Terminus of Herpes Simplex Virus Type 1 Thymidine Kinase for Maintaining Thymidine Kinase and Acyclovir-Phosphorylation Activities. **Journal of Medical Virology**, v. 66, n.3, p.388-393, 2002.

SANT'ANNA, C.M.R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. **Rev. Virtual de Química**, v. 1, n.1, p. 49-57, 2009.

SAUERBREI, A.; DEINHARDT, S.; ZELL, R.; WUTZLER, P. Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant clinical isolates of herpes simplex virus. **Antiviral Research**, v. 86, n.3, p. 246–252, 2010.

SCHELD, W. M.; WHYTLEY, R. J.; MARRA, C. M. Herpes simplex virus; neurologic manifestation of varicella and herpes zoster; cytomegalovirus; Epstein-Barr virus, human herpesvirus-6; B virus; arthropod-borne viral encephalitides. In: **Infections of the Central Nervous System**. Lippincott Williams & Wilkins v. 3, p. 123-230, 2004.

SCHMIDT, E.F.C.; FONSECA, P.C.; ALVES, L.A. A Prática da Interdisciplinaridade em Sala de Aula: um Estudo Exploratório, Utilizando Vírus Como Modelo. Associação Brasileira de Pesquisa em Educação em Ciências. **Atas do V ENPEC**, n.5, 2005.

SCOTTI, L. et al. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** v. 43, n. 2, p. 153-166, 2007.

SILVA, V.B. **Estudos de modelagem molecular e relação estrutura atividade da oncoproteína hnRNP K e ligantes**. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

SOTRIFFER, C.A.; FLADER, W.; WINGER, R.H.; RODE, B.M.; LIEDL, K.R.; VARGA, J.M. Automated Docking of Ligands to Antibodies: Methods and Applications. **Methods**, v. 20, n.3, p. 280-291, 2000.

SPADOLA, L.; NOVELLINO, E.; FOLKERS, G.; SCAPOZZA, L. Homology modelling and docking studies on Varicella Zoster Virus Thymidine kinase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, p. 413-419, 2003.

SUPERTI, F.; AMMENDOLIA, M.G.; MARCHETTI, M. New advances in anti-HSV chemotherapy., **Curr Med Chem.** v. 15, n. 9, p. 900-911, 2008.

SPRUANCE, S.L.; ROWE, N.H.; RABORN, G.W. Peroral famciclovir in the treatment of experimental ultraviolet radiation-induced HSV labialis: a double-blind, dose-ranging, placebo-controlled, multicenter trial. **J Infect Dis** v.179, n. 2, p. 303-310. 1999.

VARELLA, R.B., PIRES, I.L., SARAIVA, C.A., GUIMARÃES, A.C.C., GUIMARÃES, M.A.A.M. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus herpes simples (HSV) em pacientes transplantados e não-transplantados. **J Bras Patol Med Lab.** v.41, n.4, p. 257-62, 2005.

VERDONK, M.L.; CHESSARI, G.; COLE, J.C.; HARTSHORN, M.J.; MURRAY, C.W.; NISSINK, J.W.M.; TAYLER, R.D.; TAYLER; TAYLOR, R. Modeling Water Molecules in Protein-Ligand Docking Using GOLD. **J. Med. Chem.** v. 48, n.20, p. 6504-6515, 2005.

WARD, P.L.; ROIZMAN, B. Herpes simplex genes: the blueprint of a successful human pathogen. **Trends Genet**, v. 10, n. 8, p. 267–74, 1994.

WHITLEY, R.J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex virus infections, **The Lancet.** v. 357, n. 9267, p. 1513-1518, 2001.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. ProSA-web: Interactive Web Service for The Recognition of Errors in Three-Dimensional Structures of Proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. 407-410, 2007.

WIGG, M.D.; MIRANDA, M.M.F.S. Viroses dermatópicas In: Santos, N.S.O.; Romanos, M.T.V.; Wigg, M.D. **Introdução à Virologia Humana** 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.177 – 211, 2008.