



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

**PESQUISA DE MUTAÇÕES ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA A  
ANTIVIRAIS NO GENE *UL54* DE CITOMEGALOVÍRUS  
HUMANO DETECTADAS A PARTIR DE AMOSTRAS DE  
URINA DE PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS**

Josiane Slongo

Porto Alegre  
Dezembro/2013

**Josiane Slongo**

**PESQUISA DE MUTAÇÕES ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA A  
ANTIVIRAIS NO GENE *UL54* DE CITOMEGALOVÍRUS HUMANO  
DETECTADOS EM AMOSTRAS DE URINA DE PACIENTES  
TRANSPLANTADOS RENAIIS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Cláudia Franco

Porto Alegre  
Dezembro/2013

## **RESUMO**

O citomegalovírus humano (HCMV) é um importante patógeno associado à alta morbidade e mortalidade em pacientes transplantados de órgãos sólidos, como transplantados renais. O tratamento desses pacientes é feito através do uso de antivirais, sendo que os atualmente licenciados são Ganciclovir (GCV), Cidofovir (CDV) e Foscarnet (FOS). Variações na eficácia dos fármacos disponíveis para a terapia, aliadas a fatores do hospedeiro podem levar ao surgimento de mutações no genoma do HCMV que podem conferir resistência aos antivirais. A DNA polimerase, alvo dos fármacos acima mencionados, é importante sítio de surgimento dessas mutações. Neste estudo, duas regiões do gene da DNA polimerase de HCMV detectados na urina de pacientes transplantados renais foram analisadas a fim de identificar mutações associadas à resistência aos fármacos GCV, CDV e FOS. Para obter a amplificação dos fragmentos alvo de DNA de HCMV foi utilizada a técnica de Nested-PCR. Os amplicons obtidos foram submetidos ao sequenciamento para identificação das mutações. Em 48 (55,8%) das 86 amostras testadas foi possível detectar o genoma viral. Nenhuma mutação associada à resistência já descrita na literatura foi encontrada, porém uma mutação de fenótipo desconhecido foi identificada (A449V) em uma amostra. Ensaios de determinação fenotípica ainda são necessários para caracterizar essa mutação. O monitoramento de mutações associadas à resistência a fármacos no genoma de HCMV é importante para guiar o tratamento, melhorando assim o prognóstico da infecção em pacientes transplantados.

## ÍNDICE

<b>1. LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>4</b>
<b>2. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>6</b>
<b>2.1. CITOMEGALOVÍRUS</b> .....	<b>6</b>
2.1.1. <i>Taxonomia</i> .....	6
2.1.2. <i>Estrutura</i> .....	6
2.1.3. <i>Entrada do vírus na célula</i> .....	7
2.1.4. <i>Replicação</i> .....	7
2.1.4.1. <i>DNA Polimerase</i> .....	9
2.1.5. <i>Latência e Reativação</i> .....	9
<b>2.2. ASPECTOS CLÍNICOS</b> .....	<b>9</b>
2.2.1. <i>Epidemiologia</i> .....	9
2.2.2. <i>Patogenia</i> .....	10
2.2.3. <i>Sintomas</i> .....	10
2.2.4. <i>Diagnóstico</i> .....	11
2.2.5. <i>Tratamento</i> .....	12
<b>2.3. ANTIVIRAIS</b> .....	<b>12</b>
2.3.1. <i>Ganciclovir e Valganciclovir</i> .....	13
2.3.2. <i>Cidofovir</i> .....	13
2.3.3. <i>Foscarnet</i> .....	14
2.3.4. <i>Outros fármacos</i> .....	15
2.3.4.1. <i>Aciclovir</i> .....	15
2.3.4.2. <i>Maribavir</i> .....	15
2.3.4.3. <i>CMX001</i> .....	15
2.3.4.4. <i>Inibidores da clivagem do DNA</i> .....	15
<b>2.4. MUTAÇÕES</b> .....	<b>16</b>
2.4.1. <i>Como surgem</i> .....	16
2.4.2. <i>Sítios de resistência no gene da DNA polimerase</i> .....	16
2.4.3. <i>Métodos de detecção de mutações</i> .....	17
2.4.3.1. <i>Testes Fenotípicos</i> .....	17
2.4.3.2. <i>Testes Genotípicos</i> .....	17
<b>3. TRABALHO EXPERIMENTAL EM FORMATO DE ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	<b>19</b>
<b>4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>26</b>
<b>5. BIBLIOGRAFIA REFERENTE À INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>

## 1. LISTA DE ABREVIATURAS

- HCMV – citomegalovírus humano (*Human cytomegalovirus*)
- HHV-5 – herpesvirus humano 5 (*Human herpesvirus 5*)
- DNA – ácido desoxirribonucléico (*deoxyribonucleic acid*)
- ORF – fase de leitura aberta (*open reading frame*)
- U<sub>S</sub>/U<sub>L</sub> – sequência única curta/longa (*unique short/long*)
- TR<sub>S</sub>/TR<sub>L</sub> – sequência de repetição terminal curta/longa (*terminal repeat short/long*)
- IR<sub>S</sub>/IR<sub>L</sub> – sequência de repetição invertida curta/longa (*inverted repeat short/long*)
- HSPG – proteoglicanas de heparan sulfato (*heparin sulfate proteoglycans*)
- EGFR – receptor do fator de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor receptor*)
- MAPK – proteínas quinase ativadas por mitógeno (*mitogen-activated protein kinases*)
- NF-κB – fator nuclear kappa B (*nuclear factor kappa B*)
- SP-1 – proteína de especificidade (*specificity protein 1*)
- oriLyt – origem de replicação do ciclo lítico
- MCP – proteína maior do capsídeo (*major capsid protein*)
- SCP – proteína menor do capsídeo (*small capsid protein*)
- IE – genes imediatos (*immediate-early*)
- E – genes precoces (*early*)
- L – genes tardios (*late*)
- Pol – polimerase (*polymerase*)
- AP-1 – proteína ativadora 1 (*activator protein 1*)
- MIEP – promotor principal dos genes imediatos (*major immediate-early promoter*)
- HIV – vírus da imunodeficiência humana (*human immunodeficiency virus*)
- AIDS – síndrome da imunodeficiência adquirida (*acquired immune deficiency syndrome*)
- LDL – lipoproteína de baixa densidade (*low density lipoprotein*)
- MHC – complexo principal de histocompatibilidade (*Major histocompatibility complex*)
- IgM – imunoglobulina M (*immunoglobulin M*)
- IgG – imunoglobulina G (*immunoglobulin G*)
- pp28/65/150 – fosfoproteína 28/65/150 (*phosphoprotein 28/65/150*)

GCV – ganciclovir

vGCV – valganciclovir

CDV – cidofovir

FOS – foscarnet

ACV – aciclovir (*acyclovir*)

MBV – maribavir

dGTP – desoxiguanosina trifosfato (*deoxyguanosine triphosphate*)

dCTP – desoxicidina trifosfato (*deoxycytidine triphosphate*)

ELISA – ensaio imunoenzimático (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

PCR – reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

KTRs – receptores de transplante renal (*kidney transplant recipients*)

bp – pares de base (*base pairs*)

## 2. INTRODUÇÃO

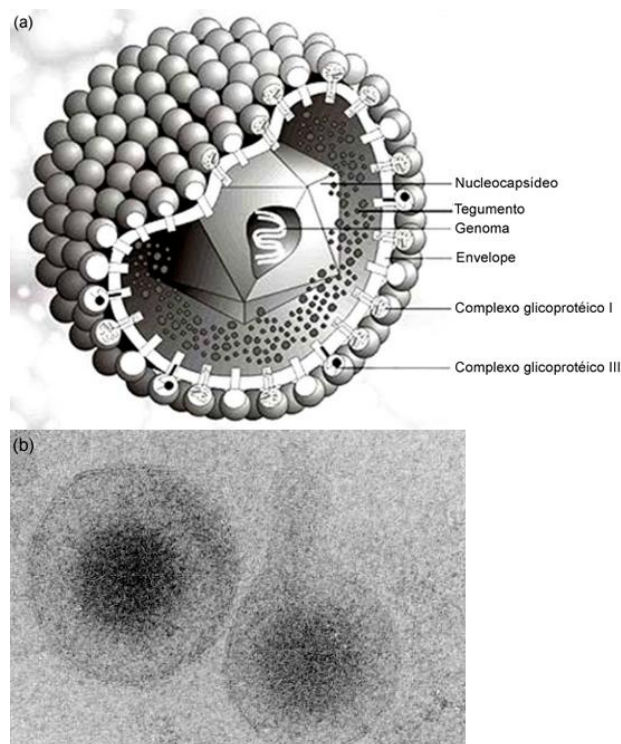
### 2.1. CITOMEGALOVÍRUS

#### 2.1.1. Taxonomia

O citomegalovírus humano (HCMV), também denominado herpesvirus humano tipo 5 (HHV-5), pertence à ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Betaherpesvirinae*, gênero *Cytomegalovirus* (ICTV, 2012).

#### 2.1.2. Estrutura

O HCMV possui capsídeo icosaédrico envolto por uma bicamada lipídica, o envelope, onde estão ancoradas glicoproteínas virais. Entre o capsídeo e o envelope existe uma matriz protéica denominada tegumento. A partícula viral completa (vírion) possui cerca de 200-300 nm de diâmetro, de acordo com a Figura 1 (SINZGER, 2008; FISHMAN, 2013).



**Figura 1.** Estrutura do citomegalovírus. (A) Desenho esquemático indicando as partes componentes do vírion (adaptado de TOMTISHEN III, 2012). (B) Eletro criomicrografia de citomegalovírus (BHELLA *et al*, 2000).

O HCMV apresenta genoma DNA de fita dupla linear com aproximadamente 235 kpb, e cerca de 208 fases de leitura abertas (ORFs). O genoma do HCMV é composto por duas sequências únicas, uma longa e outra curta ( $U_L$  e  $U_S$ , respectivamente). Estas são flanqueadas em uma extremidade por sequências de repetição terminais ( $TR_L$  e  $TR_S$ ) e na outra extremidade por sequências de repetição

invertidas ( $IR_L$  e  $IR_S$ ) (Figura 2). Assim, quatro isoformas podem surgir durante a replicação do vírus, sendo que as regiões  $U_L$  e  $U_S$  são encontradas em ambas direções uma em relação à outra (MA *et al*, 2012).



**Figura 2.** Organização estrutural do genoma do HCMV, baseada na sequência de DOLAN *et al* (2004). Os dois segmentos únicos, longo e curto ( $U_L$  e  $U_S$ , respectivamente) são flanqueados por sequências de repetição terminal ( $TR_L$  e  $TR_S$ ) e invertida ( $IR_L$  e  $IR_S$ ). As setas indicam a orientação das sequências de repetição. Os segmentos (a) são repetidos nas duas extremidades do genoma, e (a') é o segmento interno invertido.

### 2.1.3. Entrada do vírus na célula

Uma grande variedade de tipos celulares pode ser infectada pelo citomegalovírus: trofoblastos, neurônios e células da glia, células epiteliais, células endoteliais, hepatócitos, células mononucleares do sangue periférico, fibroblastos, células do músculo liso e células epiteliais da retina (FREIRE *et al*, 2004; CHAN *et al*, 2012; VANARSDALL & JOHNSON, 2012). Assim como outros herpesvírus, o HCMV possui a capacidade de estabelecer latência. A infecção latente é estabelecida em células precursoras da linhagem mielóide, em especial monócitos-macrófagos. Nessas células, o genoma apresenta-se na forma episossomal no núcleo e, embora não haja replicação viral, a mesma pode ser reativada sob certas condições (SINCLAIR, 2008).

A entrada do citomegalovírus na célula envolve uma complexa via de ligação a receptores. A glicoproteína de envelope gB do HCMV é essencial para a ligação, ancoramento e fusão de membranas, tendo como receptores proteoglicanas de heparan sulfato (HSPGs), receptores de fatores de crescimento epidermais (EGFRs) e integrinas. Além disso, complexos de glicoproteínas virais estão envolvidos tanto na ligação inicial do vírus à célula, como o complexo gM/gN, que também se liga aos HSPGs, quanto na etapa de fusão de membranas, como o complexo glicoprotéico gH/gL que aparentemente apresenta diferentes receptores em diferentes tipos celulares (COMPTON, 2004; VANARSDALL & JOHNSON, 2012).

A ligação do HCMV com receptores celulares induz a ativação de várias vias de transdução de sinal na célula do hospedeiro, iniciando um influxo de  $Ca^{2+}$  na membrana celular, ativação de fosfolipases C e A2, proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) p38, NF- $\kappa$ B, e SP-1 (FREIRE *et al*, 2004). Todas essas alterações estão associadas com efeitos na expressão gênica da célula do hospedeiro, de modo que o vírus pode reprogramar a transcrição celular para benefício próprio.

### 2.1.4. Replicação

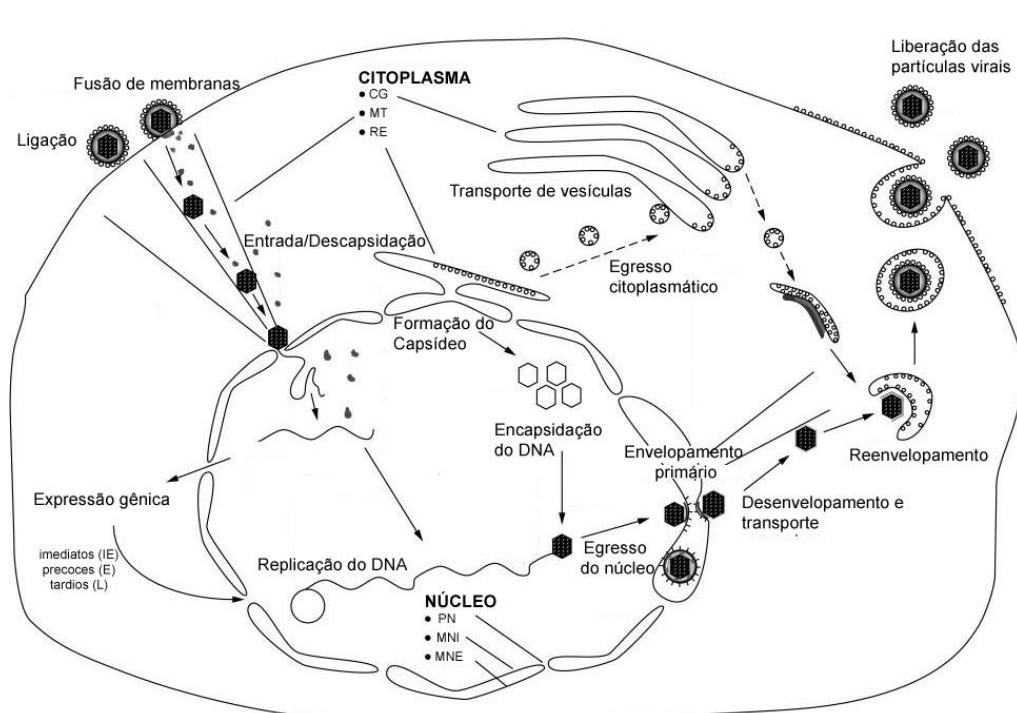
A replicação do HCMV ocorre no núcleo e, logo após a descapsidação, parte do genoma linear do citomegalovírus é circularizado para dar início à transcrição e replicação por círculo rolante, a partir de uma origem única, *oriLyt*. Nesse modelo



são gerados concatêmeros, produtos de alto peso molecular (ANDERS *et al*, 2007). Uma vez que o DNA é replicado no núcleo, ele é clivado e encapsidado por uma série de produtos gênicos codificados pelos genes *UL51*, *UL52*, *UL56*, *UL77*, *UL80*, *UL89*, *UL93* e *UL95* (MOCARSKI JR, 2007).

O nucleocapsídeo do HCMV é composto por 162 capsômeros com 150 hexons e 12 pentons. A proteína maior do capsídeo (MCP, codificada pelo gene *UL86*) e a proteína menor do capsídeo (SCP, codificada pelos genes *UL48-49*), são as mais abundantes formadoras dos capsômeros (BRITT, 2007). Após o empacotamento do DNA viral, o nucleocapsídeo interage com um complexo de proteínas do tegumento, seguido do primeiro processo de envelopamento, que ocorre na membrana nuclear interna. O capsídeo sofre o desenvolvimento na membrana nuclear externa, sendo re-envelopado no Complexo de Golgi. No segundo envelopamento, a partícula adquire, na membrana, os complexos glicoprotéicos, cujos principais são: gB, gM/gN e gH/gL. Algumas proteínas importantes nesse processo são: pp150 (codificada pelo gene *UL32*) e pUL96 (*UL96*), responsáveis pela estabilidade dos nucleocapsídeos durante a translocação citoplasmática; pUL94 (*UL94*), pUL48 (*UL48*) e pp28 (*UL99*) ligadas ao re-envelopamento; e a pUL71 (*UL71*) e a pUL103 (*UL103*), ligadas ao egresso citoplasmático das partículas, que ocorre por exocitose (MOCARSKI JR, 2007; TANDON & MOCARSKI, 2012).

A expressão gênica durante a replicação pode ser dividida em três fases: expressão de genes imediatos (IE), precoces (E) e tardios (L). Os genes IE não necessitam de síntese proteica *de novo* e codificam principalmente fatores de transcrição virais. A expressão dos genes E necessita de proteínas codificadas pelos genes IE e codificam basicamente proteínas relacionadas à replicação viral, enzimas de reparo e proteínas não estruturais. Os genes L são expressos após a replicação do DNA e estão relacionados à formação e egresso do vírion (MA *et al*, 2012).



**Figura 3.** O ciclo lítico do HCMV. (Adaptado de MOCARSKI JR, 2007). CG – complexo de Golgi; MT – microtúbulos; RE – retículo endoplasmático; PN – poro nuclear; MNI – membrana nuclear interna; MNE – membrana nuclear externa.

#### *2.1.4.1. DNA Polimerase*

A DNA polimerase (Pol) do HCMV é codificada pelo gene *UL54*, um gene precoce do ciclo lítico, e é responsável pela replicação do DNA viral. Essa proteína atua em complexo com outros componentes, incluindo a proteína acessória pUL44, a proteína de ligação do DNA de fita simples (pUL57), e o complexo primase-helicase (codificado pelos genes *UL70*, *UL102* e *UL105*). A Pol apresenta regiões funcionais conservadas não apenas entre os herpesvírus, mas entre uma grande variedade de organismos. Essas regiões conservadas compreendem a região de polimerização, responsável pela ligação de novos nucleosídeos trifosfatos e liberação de pirofosfato, e a 3'-5' Exonuclease, que atua na correção da síntese, permitindo alta fidelidade de replicação (LURAIN & CHOU, 2010).

#### *2.1.5. Latência e Reativação*

Durante a infecção latente não há a expressão dos genes imediatos, relacionados com a replicação viral e o ciclo lítico, uma vez que a região promotora desses genes está reprimida pela associação com histonas. A expressão de alguns genes parece estar ativa durante a latência, embora sua importância durante o ciclo ainda não esteja bem elucidada (SINCLAIR, 2008; MA *et al*, 2012; LIU *et al*, 2013).

Fatores ambientais como estresse, inflamação, e uso de certas drogas, como imunossupressores, podem levar à reativação do ciclo lítico do vírus. Essas alterações induzem ao aumento na produção de fatores de transcrição como NF-κB e AP-1, que atuam sobre o promotor principal dos genes imediatos (MIEP), levando a um remodelamento da cromatina viral (dissociação da histonas) e possibilitando a entrada no ciclo lítico (DE KEYZER, 2011; LIU *et al*, 2013).

## **2.2. ASPECTOS CLÍNICOS**

### *2.2.1. Epidemiologia*

O citomegalovírus apresenta-se amplamente disseminado na população mundial, com taxas de soroprevalência podendo variar entre 30% e 97% dependendo da região analisada (DE KEYZER *et al*, 2011). No Brasil, estudos indicam uma taxa de soropositividade de quase 90% entre a população adulta em geral (DO AMARAL *et al*, 2008; MATOS *et al*, 2010). De um modo geral, países com um pior desenvolvimento socioeconômico apresentam maior distribuição do vírus na população (CANNON *et al*, 2010).

A transmissão do HCMV pode ocorrer pela urina, transfusão sanguínea, contato sexual, aleitamento materno, por via transplacentária, transplante de medula óssea ou de órgãos sólidos (DE KEYZER *et al*, 2011; LIU *et al*, 2013). Em indivíduos imunocompetentes, a infecção primária geralmente é assintomática,

embora possam ocorrer casos de síndrome de mononucleose (BIRON, 2006). Indivíduos com sistema imune imaturo ou imunodeprimidos podem apresentar infecção associada à alta morbidade e mortalidade, como é o caso de fetos e recém-nascidos (BUONSENSO *et al*, 2012), pacientes com HIV/AIDS (BUTLER. & THORNE, 2012) e receptores de órgãos transplantados (DA CUNHA-BANG *et al*, 2011).

Entre os pacientes transplantados de órgãos sólidos, o risco do desenvolvimento de doença é maior quando os receptores não apresentam imunidade prévia ao HCMV e quando o doador é soropositivo (perfil D+/R-). Nesses pacientes, o vírus latente no órgão do doador pode ser reativado no receptor causando infecção ativa. Outros fatores de risco incluem o quadro de imunossupressão (determinada pelas drogas utilizadas, dose e duração) e fatores do hospedeiro (como idade, fatores genéticos e comorbidades) (RAZONABLE *et al*, 2013; KOTTON, 2010).

### **2.2.2. Patogenia**

O HCMV apresenta potencial para infectar uma grande variedade de tipos celulares, embora os sítios mais frequentes de manifestação clínica sejam os pulmões, o trato gastrointestinal, o fígado e a retina. A infecção de células endoteliais contribui para a disseminação hematogênea do vírus, seja pela transferência para granulócitos, monócitos ou por despreendimento das células da parede do vaso sanguíneo (SINZGER, 2008). Além disso, a infecção de células dos vasos sanguíneos pode induzir a proliferação e migração de células de músculo liso, captação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) oxidadas, liberação de citocinas e quimiocinas, e aumento de atividade procoagulante das células endoteliais (COURIVAUD *et al*, 2013).

A infecção ativa por HCMV também aumenta o risco do surgimento de doenças causadas por patógenos oportunistas, sejam de origem bacteriana, fúngica ou viral, incluindo a reativação de outros herpesvírus em latência no hospedeiro (BOECKH, 2011; KOTTON, 2010; DE KEYZER *et al*, 2011).

Em transplantados, o ambiente pró-inflamatório logo após o transplante atua sobre o genoma viral, induzindo a reativação viral. Assim, o vírus inicia a disseminação local no órgão infectado, podendo posteriormente atingir a corrente sanguínea e infectar outros órgãos-alvo. Além disso, o aumento na expressão do MHC de classe I nas células do órgão transplantado por causa da infecção viral pode iniciar uma rejeição aguda pela ativação de células T citotóxicas com estimulação aloantigênica concomitante. No caso dos transplantes renais, o HCMV pode induzir o efeito citopático nas células epiteliais glomerulares e tubulares e em células endoteliais dos capilares (EMERY, 2012; SMITH & KHANNA, 2013).

### **2.2.3. Sintomas**

Os sintomas dependem basicamente do sítio de infecção do HCMV e do quadro de imunossupressão ou imunodepressão do indivíduo.

Pacientes transplantados podem apresentar febre, leucopenia, trombocitopenia, linfadenopatia, pneumonite, hepatite, pancreatite, complicações do trato gastrointestinal (como úlceras, dor abdominal, diarreia, sangramento e gastrite) ou até mesmo sintomas envolvendo o sistema nervoso central. A infecção pelo HCMV também está relacionada à rejeição ao órgão transplantado, muitas vezes relacionada a problemas circulatórios. Úlceras na pele podem ocorrer, embora sejam extremamente raras (CUKURANOVIC *et al*, 2012; ARDALAN, 2012; SMITH & KHANNA, 2013).

#### **2.2.4. Diagnóstico**

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo HCMV pode ser feito por análise histopatológica, cultura viral, sorologia, antigenemia e detecção de ácidos nucleicos virais.

A análise histopatológica associada à detecção de antígenos ou ácidos nucleicos virais é realizada mediante biópsia do tecido supostamente infectado. A detecção do vírus nos tecidos pode ser feita por imunohistoquímica ou hibridização *in situ*. A sensibilidade do teste depende dos anticorpos utilizados, e os resultados podem variar dependendo de como o tecido é processado (KOTTON, 2010). Apesar de ser o padrão ouro para a detecção de HCMV, é um método invasivo, de forma que outras análises são mais comumente utilizadas (CUKURANOVIC *et al*, 2012).

O cultivo viral mantém-se como uma alternativa para o diagnóstico da doença invasiva do HCMV, especialmente para amostras do trato gastrointestinal. Porém, a sensibilidade do teste pode variar de acordo com o material coletado para a cultura (sangue, urina ou tecido), e os resultados podem demorar a aparecer (KOTTON, 2010).

A sorologia detecta anticorpos IgM e IgG anti-HCMV, indicando exposição prévia ao vírus. Em caso de transplante, o teste deve ser feito antes do procedimento, tanto no doador quanto no receptor. Testes para IgG anti-HCMV são mais específicos que os testes para IgM (KOTTON, 2010). O uso desse método para diagnóstico de uma infecção ativa por citomegalovírus após um transplante é limitado, devido ao quadro de imunossupressão induzida pela medicação (RAZONABLE *et al*, 2013).

A antigenemia é um teste semiquantitativo que detecta a fosfoproteína 65 (pp65) do citomegalovírus em leucócitos infectados no sangue periférico. Apresenta alta sensibilidade e é um importante parâmetro para o início da terapia preemptiva, pois detecta a doença na fase ativa. Porém, a amostra de sangue deve ser processada em no máximo 6-8 horas após a coleta. Além disso, o teste não pode ser realizado em pacientes com leucopenia (KOTTON, 2010; RAZONABLE *et al*, 2013).

A detecção de ácidos nucleicos é a principal alternativa à antigenemia. Como a carga viral varia dependendo do material utilizado (sangue e urina, por exemplo) o mesmo deve ser utilizado durante toda a monitorização do paciente. O grande problema é a falta de uma padronização global dos testes de detecção, de modo que

cada laboratório pode apresentar diferentes resultados, não havendo assim limiares preestabelecidos para a aplicação de terapia preemptiva (KOTTON, 2010; RAZONABLE *et al*, 2013).

### **2.2.5. Tratamento**

O tratamento para a infecção pelo HCMV requer uma combinação de imunomodulação, uso de fármacos antivirais e redução da imunossupressão, se possível. Existem, basicamente, duas estratégias utilizadas para a prevenção da doença ativa do citomegalovírus, a profilaxia universal e terapia preemptiva.

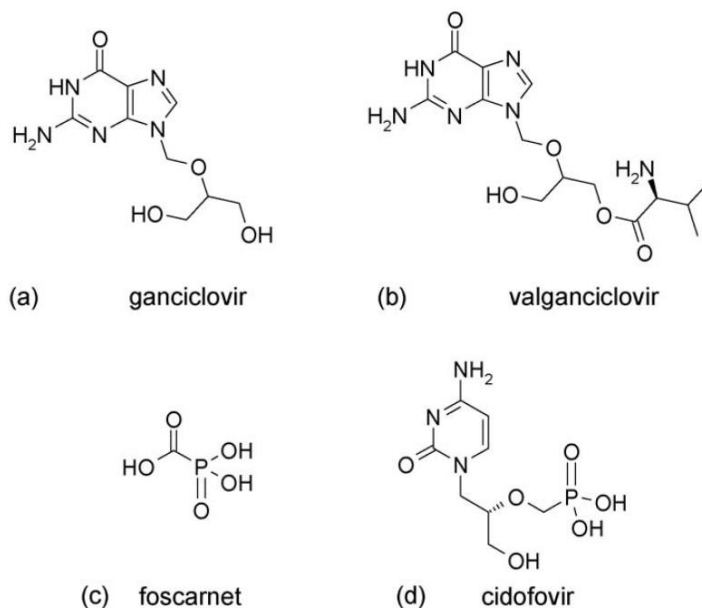
A profilaxia universal é iniciada imediatamente após o transplante e dura por um período determinado. Utilizam-se doses mais baixas de supressores, e podem ser usados antivirais menos potentes do que aqueles usados para o tratamento da doença ativa (BIRON, 2006). Geralmente não há aumento da viremia durante a profilaxia, mas pode ocorrer uma infecção tardia em receptores de alto risco (perfil D+/R-), (FISHMAN, 2012).

A terapia preemptiva é direcionada por testes laboratoriais de monitoramento da viremia em pacientes. Se o paciente é virêmico, inicia-se a terapia antiviral e/ou a redução da imunossupressão. Esse tipo de estratégia pode diminuir a exposição do paciente aos antivirais, consequentemente diminuindo a toxicidade e os custos associados ao tratamento. Porém, é necessário um acompanhamento constante dos níveis de replicação viral nos pacientes (CUKURANOVIC *et al*, 2012; FISHMAN, 2012).

Embora a resistência do HCMV aos antivirais possa surgir no decorrer dos dois tipos de tratamento (CUKURANOVIC *et al*, 2012), é mais comum na terapia preemptiva (FISHMAN, 2012; BIRON, 2006).

## **2.3. ANTIVIRAIS**

Existem alguns fármacos atualmente licenciados para o tratamento de infecções sistêmicas pelo HCMV: ganciclovir (GCV) e valganciclovir (vGCV), cidofovir (CDV) e foscarnet (FOS) (CHEVILLOTTE *et al*, 2010). Além desses, aciclovir (ACV) e maribavir (MBV) também podem ser utilizados em algumas situações, embora não tenham a mesma potência dos fármacos citados anteriormente (BIRON, 2006).



**Figura 4.** Estrutura química dos principais fármacos utilizados no tratamento da infecção pelo citomegalovírus (Adaptado de BIRON, 2006).

### 2.3.1. Ganciclovir e Valganciclovir

Ganciclovir (9-[1,3-dihidroxi-2-propoximetil]guanina) é um análogo de desoxiguanosina, que possui como alvo a DNA polimerase viral. Para se tornar ativo, o GCV precisa de três etapas de fosforilação, sendo que a primeira é realizada por uma quinase viral, a pUL97, seguida de duas fosforilações por quinases celulares do hospedeiro (ERICE, 1999; PRICHARD & KERN, 2011). Em sua forma ativa, o composto inibe competitivamente a síntese de DNA, de forma que a incorporação do ganciclovir trifosfato no lugar de uma dGTP (desoxiguanosina trifosfato) causa uma diminuição e posterior parada na síntese da cadeia de DNA viral (BIRON, 2006; ERICE, 1999).

Este foi o primeiro fármaco antiviral aprovado para o tratamento da doença causada por citomegalovírus e continua sendo a droga de escolha em pacientes transplantados. Entre os efeitos adversos estão neutropenia, anemia e trombocitopenia. O ganciclovir apresenta formulação intravenosa (BIRON, 2006).

Valganciclovir é a pró-droga do ganciclovir. É de administração oral, sendo rapidamente metabolizado na parede intestinal e no fígado. Possui alta biodisponibilidade (BIRON, 2006; PRICHARD & KERN, 2011).

### 2.3.2. Cidofovir

Cidofovir (1-[(S)-3-hidroxi-2-(fosfonometoxi)propil]citosina) é um análogo de desoxicitidina monofosfatado. Atinge sua forma ativa após duas etapas de fosforilação executadas por quinases do hospedeiro, e por isso não necessita de fosforilação prévia por quinases virais (ERICE, 1999; PRICHARD & KERN, 2011). O CDV difosfato atua como um inibidor competitivo da DNA polimerase viral, de forma semelhante ao GCV trifosfato, porém é incorporado no lugar de uma dCTP

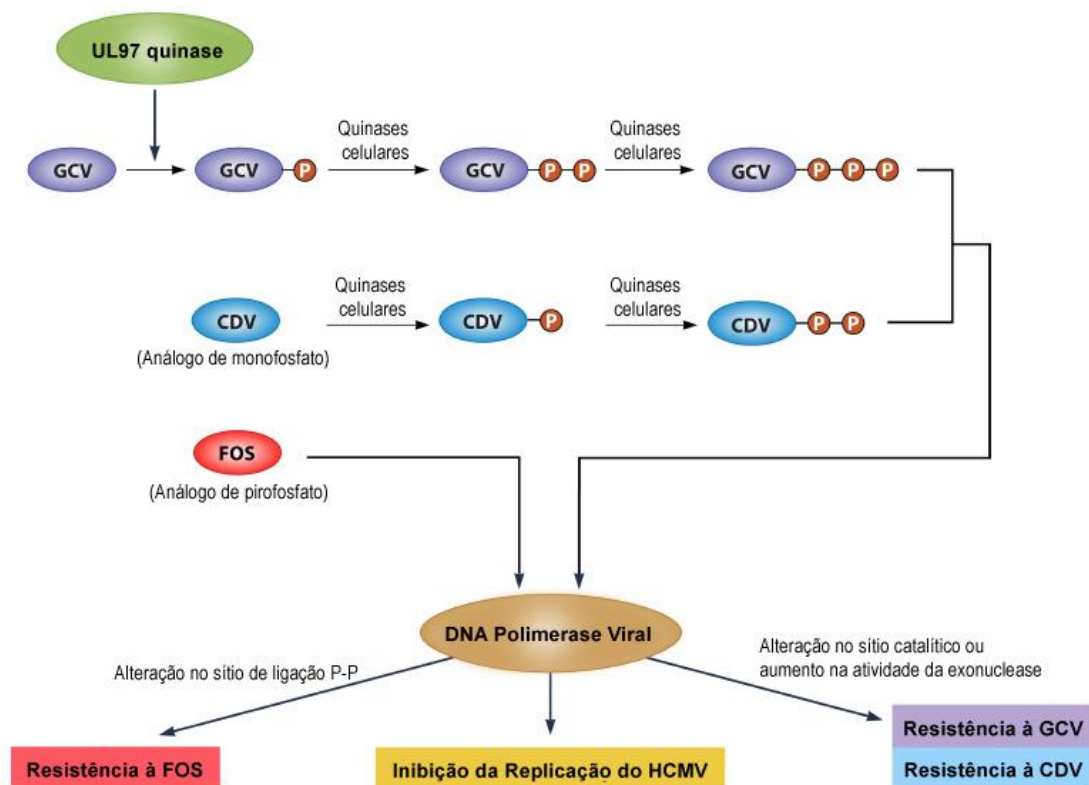
(desoxicitosina trifosfato), causando um término prematuro da síntese de DNA viral (BIRON, 2006; ERICE, 1999).

O uso desse fármaco no tratamento contra HCMV é limitado por sua alta nefrotoxicidade, de modo que o CDV permanece como droga de segunda opção (CUKURANOVIC *et al*, 2012; BIRON, 2006).

### 2.3.3. Foscarnet

Foscarnet (fosfonoformato trissódico) é um análogo de pirofosfato, que atua inibindo de forma reversível e não competitiva a atividade da DNA polimerase viral. Não necessita de ativação intracelular e não é incorporado à cadeia de DNA viral sintetizada (ERICE, 1999). O FOS bloqueia o sítio de ligação ao pirofosfato da polimerase, impedindo a clivagem do pirofosfato do desoxinucleosídeo trifosfato adicionado na cadeia de DNA, impedindo a sua síntese (PRICHARD & KERN, 2011; BIRON, 2006).

Neurotoxicidade e nefrotoxicidade são fatores limitantes para o uso de FOS na clínica, embora ainda seja importante por ser efetivo contra a maioria das cepas GCV-resistentes (CUKURANOVIC *et al*, 2012).



**Figura 5.** Esquema ilustrando o mecanismo de ação dos antivirais utilizados no tratamento contra HCMV, todos tendo como alvo a DNA polimerase viral. A pUL97 quinase atua na primeira etapa de fosforilação do GCV, que ainda é fosforilado por quinases celulares mais duas vezes até atingir sua forma ativa e ser incorporado pela DNA polimerase viral. O CDV é um análogo de monofosfato e necessita de duas etapas de fosforilação pelas quinases celulares para sua forma ativa trifosfatada. FOS é um análogo de pirofosfato e não necessita

de ativação prévia. Mutações em diferentes sítios da DNA polimerase podem conferir resistência aos antivirais. (Adaptado de LURAIN & CHOU, 2010).

#### **2.3.4. Outros fármacos**

##### *2.3.4.1. Aciclovir*

Aciclovir é um análogo de 2'-desoxiguanosina. Assim como o GCV, aciclovir também necessita de várias etapas de fosforilação para atingir sua forma ativa trifosfatada (BIRON, 2006).

##### *2.3.4.2. Maribavir*

Maribavir é um ribosídeo de benzimidazole, e atua como um inibidor ATP-competitivo da quinase pUL97 viral (HAKKI & CHOU, 2011). Seu uso pode anular o efeito antiviral do GCV, pela inibição da atividade da pUL97, embora apresente um aumento na atividade anti-HCMV quando combinada com FOS ou CDV (STRASFELD & CHOU, 2010).

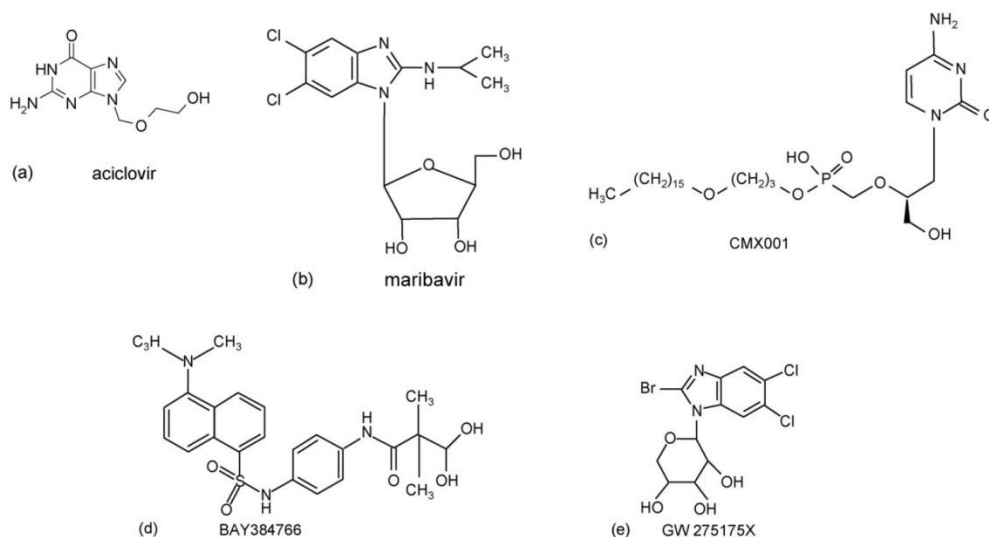
##### *2.3.4.3. CMX001*

CMX001 é um éster lipídico de cidofovir (hexadexiloxipropil-CDV), uma pró-droga com excelente biodisponibilidade oral, que foi reportada como mais potente e menos nefrotóxica do que a formulação intravenosa de CDV atualmente utilizada. Está em fase de estudos clínicos (PAINTER *et al*, 2012; MARTY *et al*, 2013).

##### *2.3.4.4. Inibidores da clivagem do DNA*

Tomeglovir (BAY-384766) e GW-275175X atuam inibindo a clivagem e processamento do DNA para empacotamento no capsídeo, importantes passos na replicação viral. As duas drogas encontram-se em fase de testes (LURAIN & CHOU, 2010; STRASFELD & CHOU, 2010).





**Figura 6.** Estrutura química de antivirais com ação contra HCMV. Aciclovir (a) e Maribavir (b) são usados em casos específicos, embora não tenham a mesma eficácia que os fármacos licenciados; CMX001 (c), BAY384766 (d) e GW 275175X (e) são drogas em fase de testes, surgindo como alternativas àquelas já presentes no mercado (Adaptado de BIRON, 2006).

## 2.4. MUTAÇÕES

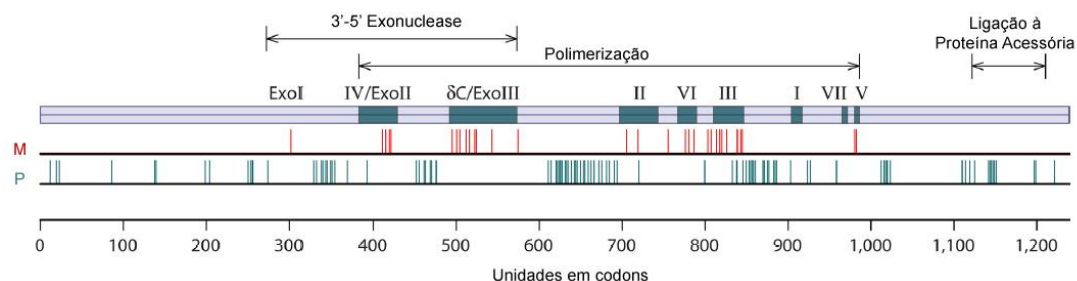
### 2.4.1. Como surgem

Quando o tratamento com antivirais não é capaz de suprimir totalmente a replicação viral, seja por doses insuficientes de fármaco ou pelo estado de imunossupressão do hospedeiro, ocorre um processo de seleção que favorece variantes do vírus resistentes ao fármaco utilizado na terapia. Por terem a capacidade de se replicar na presença dos antivirais, essas variantes podem adquirir mutações adicionais que melhoram sua capacidade replicativa, aumentando ainda mais sua resistência (CHEVILLOTTE *et al*, 2010). Na clínica, esse fenômeno pode ser observado pela persistência ou aumento da carga viral no plasma, ou mesmo pelo surgimento de doença ou de sintomas clínicos, apesar da terapia. Embora tenham sido descritos casos de infecções assintomáticas causadas por vírus resistentes a drogas, essas variantes geralmente estão associadas a casos mais graves de doença, talvez porque os fatores associados com o surgimento da resistência sejam também fatores predisponentes das formas mais sérias da doença do citomegalovírus (STRASFELD & CHOU, 2010).

### 2.4.2. Sítios de resistência no gene da DNA polimerase

Mutações no gene da DNA polimerase estão concentradas em regiões conservadas, podendo conferir resistência a um fármaco ou resistência cruzada (mais comum entre GCV e CDV). Alterações na região da exonuclease podem aumentar a atividade de correção da polimerase, de modo que os análogos GCV e CDV serão mais facilmente identificados e eliminados. Portanto, nesse domínio concentram-se

mutações relacionadas à resistência a esses antivirais. Outras mutações podem levar a um decréscimo na afinidade a compostos antivirais, o que afeta a atividade de GCV, CDV e FOS, e pode levar a uma resistência cruzada (CHEVILLOTTE *et al*, 2010; LURAIN & CHOU, 2010).



**Figura 7.** Organiza o estrutural do gene *UL54* do citomegalovírus, com indica es das regiões funcionais e regiões conservadas do gene. No desenho esquemático estão indicadas, acima do genoma viral, as regiões g nicas que estão relacionadas com fun es específicas. A linha M, com marca es em vermelho, mostra sócios onde já foram identificadas muta es relacionadas   resistência aos antivirais. A linha P, com marca es em azul, indica sócios de polimorfismos sem liga o com resistência. (Adaptado de LURAIN & CHOU, 2010).

#### 2.4.3. Métodos de detec o de muta es

Quando há suspeita do surgimento de uma cepa resistente, alguns testes laboratoriais podem ser feitos para verificar a presença de muta es. Existem dois tipos de testes para detec o de vírus resistentes: fenotípicos e genotípicos.

##### 2.4.3.1. Testes Fenotípicos

São baseados na determina o da concentra o de droga necessária para reduzir a replica o viral em uma cultura celular.

O ensaio de redu o de placas   considerado o padrão ouro, pois pode-se observar e quantificar o efeito citopático viral, obtendo-se assim uma medida da infectividade viral. Para isso, inocula-se a amostra viral de interesse em uma cultura celular, sob concentra es conhecidas do fármaco ao qual a amostra   supostamente resistente.   um teste demorado, podendo levar de 3 a 4 semanas para se obter um bom resultado de uma amostra clínica (LURAIN & CHOU, 2010; ERICE, 1999).

Além disso, existem testes baseados na hibridiza o de DNA-DNA, ensaios imunoenzimáticos (ELISA), imunofluorescência, citometria de fluxo e PCR real-time (LURAIN & CHOU, 2010; ERICE, 1999).

##### 2.4.3.2. Testes Genotípicos

São importantes para a confirma o de suspeitas clínicas, além de fornecer informa es sobre possíveis resistências cruzadas com outras drogas. Porém, não   possível distinguir polimorfismos de muta es associadas   resistência sem informa es de bancos de dados ou sem proceder testes fenotípicos. Entre os testes

genotípicos encontram-se análise com enzimas de restrição, PCR Real-time e sequenciamento.

A análise por enzimas de restrição baseia-se no fato de que algumas mutações podem levar ao surgimento ou perda de sítios de restrição, alterando o padrão de bandas de produtos de PCR visualizado em um gel de agarose. A grande desvantagem é que poucas mutações são capazes de produzir esse tipo de efeito, além da possibilidade de que a mudança de padrão de digestão tenha sido causada por um polimorfismo, próximo a uma região de mutação, levando a uma interpretação errada do resultado (LURAIN & CHOU, 2010).

Na PCR Real-time pode-se utilizar sondas com corantes fluorescentes diferentes para cada sítio de mutação, de forma a analisar mais de uma mutação em cada reação. É necessária pouca concentração de DNA para amplificação. Porém, polimorfismos próximos a mutações conhecidas podem afetar a leitura, e é necessária uma sonda para identificar cada codon mutado (LURAIN & CHOU, 2010).

A amplificação por PCR seguida de sequenciamento permite analisar todas as alterações presentes na região amplificada. Porém, a qualidade da amostra é importante, para evitar artefatos e erros de sequenciamento e leitura (LURAIN & CHOU, 2010; HAKKI & CHOU, 2011).

Considerando a alta frequência de infecção pelo HCMV em humanos e a importância da infecção por esse vírus em pacientes submetidos ao transplante de órgãos, é importante monitorar a presença de mutações associadas ao uso de antivirais. Portanto, os objetivos desse trabalho foram detectar o genoma de citomegalovírus em amostras de urina de pacientes transplantados renais e amplificar e sequenciar regiões do gene *UL54*, a fim de verificar a existência de mutações relacionadas à resistência a antivirais atualmente licenciados para o tratamento da infecção por HCMV.

### 3. TRABALHO EXPERIMENTAL EM FORMATO DE ARTIGO CIENTÍFICO

Este trabalho foi escrito conforme as normas de revista *Virus Genes* (ISSN: 0920-8569).

#### **Detection of resistance-associated mutations in *UL54* gene of human cytomegalovirus detected from urine samples of kidney transplant recipients**

**Josiane Slongo<sup>a</sup>, Fernanda Luz de Castro<sup>a</sup>, Fabrício Souza Campos<sup>a</sup>, Marcos Iuri Roos Kulmann<sup>b</sup>, Paulo Michel Roehé<sup>a</sup>, Ana Cláudia Franco<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>b</sup>Laboratório de Biologia Molecular de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Address:

Rua Sarmiento Leite, 500

Porto Alegre, RS, Brazil

CEP: 90050-170

E-mail: josiane.slongo@gmail.com

Phone: +55 (51) 3308 3655

#### **Abstract**

Human cytomegalovirus infections are important causes of morbidity and mortality in kidney transplant recipients. Anti-viral therapy usually consists of a combination of immunomodulatory and antiviral drugs. The emergence of mutations in the viral genome may lead to a drug-resistance phenotype, which thwarts the anti-viral treatment. In this study, the existence of these mutations was assessed in virus DNA detected from urine samples of kidney transplant recipients. Nested-PCR amplification of specific regions of HCMV *UL54* gene targeted the 3'-5' exonuclease and the polymerization sites. A total of 86 urine samples were analyzed, and the viral genome was detected in 48 samples (55.8%). No resistance-associated mutations were found in the polymerization site, whereas a mutation with unknown phenotype (A449V) was found in the 3'-5' exonuclease region of one sample. Some facts may be linked to the lack of detection of resistance-associated mutations: these samples in fact did not display drug resistance-associated mutations or the resistance-associated mutations were present in other genomic sites. To examine such hypothesis, further investigations will proceed, including the analysis of a higher number of clinical samples and the sequence analysis of a broader genomic region of the HCMV *UL54* gene.

**Keywords** Human cytomegalovirus, DNA polymerase, *UL54*, mutation, antiviral resistance, kidney transplant

## Introduction

*Human cytomegalovirus* (HCMV) is a widespread betaherpesvirus which remains an important cause of morbidity in immunocompromised hosts, such as kidney transplant recipients (KTRs) [1-3]. The most important risk factor for the development of HCMV associated disease ensues when a seronegative recipient receives the organ from a seropositive donor (D+/R-). In addition, immunosuppression (determined by the antiviral treatment of choice, genetic host factors, comorbidity, and others) is also a risk factor for the development of disease [1]. The HCMV syndrome is characterized by fever, neutropenia, thrombocytopenia, atypical lymphocytosis and malaise, or by tissue-invasive disease. The severity of those manifestations may vary according to the immune status of the patient [3]. Two strategies may be used for the treatment of the patient: preemptive and prophylactic therapies. Both approaches, however, can lead to the emergence of drug resistance, caused by mutations in the viral DNA [1, 4-6].

Current antiviral drugs used for the treatment of HCMV infections are Ganciclovir (GCV), Cidofovir (CDV) and Foscarnet (FOS), all targeting the viral DNA polymerase. GCV and CDV need two-step phosphorylations by cellular protein kinases (in addition GCV needs a prior step of phosphorylation by a viral protein kinase, pUL97), while FOS doesn't need any previous activation [7-9]. Drug doses and bioavailability, long exposure and overall state of host's immunosuppression are important factors that lead to emergence of drug resistance [10, 11].

Two conserved sites in the HCMV *UL54* gene (which codes the DNA polymerase) seem to concentrate drug resistance-associated mutations: 3'-5' exonuclease region, ranging from the codons 379 to 588, and the polymerization region, from codon 700 to 845. Mutations of the exonuclease region are commonly linked with GCV, CDV or GCV/CDV resistance, while mutations in the polymerization region may be related with resistance to any of the drugs [9, 12]. New drug-resistance mutations (as well as polymorphisms) can be discovered using molecular biology tools, once there's a suspected case of resistance, or even in routine tests [9, 13].

In this study, urine samples from kidney transplant recipients were analyzed in order to identify HCMV positive samples and to detect the presence of known resistance-associated mutations or new undescribed mutations.

## Material and Methods

### DNA samples

Total DNA was extracted from urine samples of subjects submitted to kidney transplant at the Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, from March to November 2007. The samples have been stored in -20°C until processing. A total of 86 samples were analyzed.

### Nested-PCR amplification of *UL54*

Specific primers were designed to amplify the regions of interest in the *UL54* gene by Nested-PCR (Table 1).

**Table 1.** List of primers used in this study.

Region	Primer	Sequence (5'-3')	Size (bp)
3'-5' Exonuclease region	1F	AAGATGACACGCCGCAACG	578
	1R	CCTTCCGAATACGAGCTGC	
	2F	GCAACGGAATTTTAGCCAGC	534
	2R	GCTTTTCTTTCAACGGTACGC	
Polymerization region	1F	CTGATGATGTTTCGAGCCCC	497
	1R	CAACCTCTGCTACTCCACC	
	2F	TGCTGCTCTCCTCCGAATCC	368
	2R	CTTTGTGCGTGCTTCGGTGC	

The first reaction conditions to amplify both regions were identical, and performed in a Mastercycler Personal (Eppendorf) as follows: 94°C for 3 min, 35 cycles of 94°C for 50s, 54°C for 50s and 72°C for 50s, with a final extension step of 72°C for 3 min. The PCR reaction was performed with 2.5µL 10X PCR Buffer, 1µL dNTP 10mM, 0.5 µL MgCl<sub>2</sub> 50mM, 5pM of each primer, 1.5U Taq DNA Polymerase, 2µL DNA template and sterile deionized water to complete a total volume of 25µL.

The second round of amplification was performed with 1µL of the DNA template obtained from the first reaction, with 2.5µL 10X PCR Buffer, 1µL dNTP 10mM, 0.5 µL MgCl<sub>2</sub> 50mM, 5pM of each primer, 1.5U Taq DNA Polymerase, 0.5µL DMSO and sterilized deionized water to complete a total volume of 25µL. The reaction conditions were 94°C for 3 min, 35 cycles of 94°C for 50s, 57°C for 50s (for the polymerization region) or 56°C for 50s (for 3'-5' for the exonuclease region) and 72°C for 50s, with a final extension step of 72°C for 3 min.

The amplification results were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide and visualized in a transilluminator. The DNA fragments were compared with a commercial molecular weight marker (100bp DNA Ladder, New England BioLabs®).

#### Sequencing and Analysis

Amplicons of the expected size were sequenced using the *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Each sample was sequenced using the forward (2F) and the reverse (2R) primers separately, in order to obtain both DNA strands. Sequence assembly and analysis of the data obtained were performed with SeqMan Pro™ (Lasergene®) [14]. BioEdit 7.0 [15] was used for alignment, translation of sequences and identification of mutations. The mutations and polymorphisms found here were analyzed by an algorithm developed by AG Bioinformatics and Systems Biology, Institute of Neural Information Processing / Institute of Virology (ULM University) [16].

The strain Merlin (NC\_006273) was used as the reference sequence.

## Results

### Cytomegalovirus genome detection

The amplification of both target amplicons, the 534 bp fragment from the 3'-5' exonuclease region and the 368 bp fragment from the polymerization region, were obtained from all positive

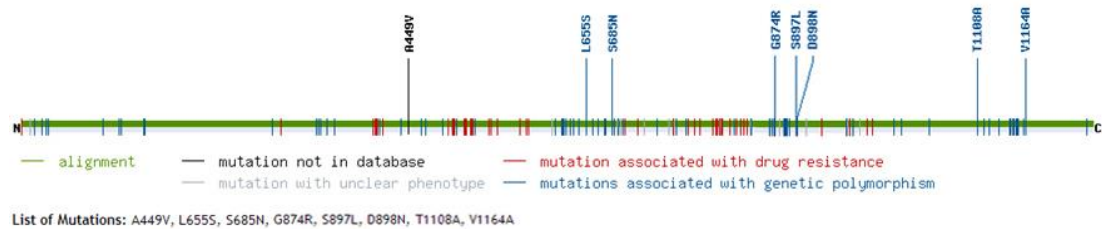
samples (48 out of 86). The fragment sizes of the amplicons were compared with a commercial molecular weight marker by an electrophoresis analysis.

#### Sequence analysis of the polymerization region

All the amplicons (n= 48) obtained from the amplification of the polymerization region were submitted to sequencing. In the analyzed fragment, only one sample displayed a polymorphism that differed from the sequence displayed from the reference sequence (G874R) [17]. The remaining obtained sequences were identical to the reference strain (Table 2).

#### Sequence analysis of the 3'-5' exonuclease region

From the 48 amplicons obtained, 39 were sequenced. A mutation without previous description in literature was found in one sample, A449V (Table 2). The localization of this mutation can be seen in Figure 1. Other samples did not show mutations in the fragment analyzed.



**Figure 1.** Map of DNA polymerase gene showing the position of the mutation (in black) and the polymorphism (in blue) found in this study. The mutations were inserted in the strain Merlin sequence and analyzed using the algorithm developed by ULM [16], which compares the inserted sequence with the wild-type HCMV sequence. The Merlin strain natural polymorphisms are also shown in blue.

**Table 2.** List of samples analyzed and mutations found in comparison with the reference sequence (strain Merlin).

Sample ID	Resistance-associated mutations	Unknown mutations	Polymorphisms
C121-308	-	-	-
C122-216	-	-	-
C122-495	-	-	<b>G874R</b>
C122-500	-	-	-
C122-501	-	-	-
C122-503	-	-	-
C122-514	-	-	-
C122-515	-	-	-
C122-516	-	-	-
C122-563	-	-	-
C122-567	-	-	-
C122-594	-	-	-
C122-622 <sup>+</sup>	-	-	-
C122-860 <sup>+</sup>	-	-	-
C123-017	-	-	-
C123-018	-	-	-
C123-019	-	-	-
C123-021 <sup>*+</sup>	NS	NS	NS
C123-025 <sup>+</sup>	-	-	-
C123-062	-	-	-
C123-066 <sup>+</sup>	-	-	-
C123-069	-	-	-
C123-070	-	-	-
C123-071 <sup>*</sup>	-	-	-
C123-128 <sup>+</sup>	-	-	-
C123-133 <sup>*</sup>	-	-	-
C123-135	-	-	-
C123-136	-	-	-
C123-142 <sup>+</sup>	-	-	-
C123-234	-	-	-
C123-257 <sup>*</sup>	-	-	-
C123-306 <sup>*+</sup>	NS	NS	NS
C123-307	-	-	-
C123-308	-	-	-
C123-309	-	-	-
C123-310	-	-	-
C123-322	-	-	-
C123-338	-	-	-
C123-342 <sup>*</sup>	-	-	-
C123-349	-	-	-
C123-377 <sup>*</sup>	-	-	-
C123-405	-	-	-
C123-562 <sup>*</sup>	-	-	-
C123-694 <sup>+</sup>	-	-	-
C123-695	-	-	-
C123-825	-	-	-
C123-827	-	<b>A449V</b>	-
C123-979	-	-	-

\* Not sequenced for polymerization region

<sup>+</sup> Not sequenced for 3'-5' exonuclease

NS = Not sequenced

- = No mutations found



## Discussion

In this study, nested-PCR amplifications targeting two different regions of the *UL54* gene of HCMV were designed and applied to total DNA extracted from urine obtained from 86 patients previously submitted to kidney transplantation. The obtained amplicons were submitted to sequencing and sequence analysis in search of drug resistance associated mutations.

From the 86 samples analyzed, 48 were HCMV positive in both PCRs. From the total, some amplicons, eight for the polymerization region and nine for the 3'-5' exonuclease region, were not included in the sequence analysis due to the low quality of the sequenced material obtained, despite the amplification of a correct size fragment. The analysis of the polymerization region resulted in the detection of a previously described polymorphism in one sample, G874R, which apparently does not affect the virus susceptibility to the drugs [17]. Meanwhile, the amplification and sequencing of the 3'-5' exonuclease region resulted in the detection of a mutation in one sample. This is a mutation of unknown nature, A449V, and it is described here for the first time. As a consequence, it is at the moment impossible to know if this mutation leads to the resistance to the commonly used drugs used in the treatment of HCMV infections. A phenotypic study, in which a virus isolate harboring this mutation is used in plaque reduction assay or DNA hybridization assay, is necessary to characterize this mutation [9, 13, 18].

No previously described resistance-associated mutations were found among the 48 HCMV positive samples analyzed here. This may reflect a recent establishment of the treatment, as the emergence of resistance-associated mutations takes time after the therapy starts, commonly around 100 or 200 days [19-21]. The regions analyzed in this study were chosen for amplification and analysis because they seem to concentrate most of the resistance-associated mutations described in literature [9, 12]. However, such mutations may indeed appear in other sites of the DNA polymerase gene or in other genes (e.g. the *UL97* gene), depending partially on which drug has been used in treatment [7, 9, 12]. In addition, a single mutation may have no association with a resistance phenotype, but two or more mutations together can lead to this phenotype [18]. Here, the lack of information about the clinical and pharmacological history of patients restricts the conclusions of this study. If treatment has begun recently, for instance, there is little chance to find any antiviral-induced mutation in the HCMV genome [5, 10].

The infection with a HCMV resistant strain does not necessarily lead to the development of more severe symptoms; however, the association with predisposing factors usually led to a worse prognostic of the disease [12]. Consequently the knowledge on the circulation of drugs resistant HCMV isolates in humans is important to avoid wrong therapeutic approaches, which may lead to the emergence of more resistance-associated mutations. To our knowledge, this is the first study that describes the search for these mutations in HCMV positive samples obtained from KTR in the Southern Region of Brazil.

## References

1. R.R. Razonable, A. Humar, *Am. J. Transplant.* **13**, 93-106 (2013)
2. J. Cukuranovic, S. Ugrenovic, I. Jovanovic, M. Visnjic, V. Stefanovic, *ScientificWorldJournal* **2012**, 820621-820639 (2012)
3. K. De Keyzer, S. Van Laecke, P. Peeters, R. Vanholder, *Am. J. Kidney Dis.* **58**(1), 118-126 (2011)
4. C.N. Kotton, *Nat. Rev. Nephrol.* **6**, 711-721 (2010)
5. J.A. Fishman, *Am. J. Transplant.* **12**, 13-14 (2012)
6. L. Couzi, S. Helou, T. Bachelet, K. Moreau, S. Martin, D. Morel, M.E. Lafon, B. Boyer, A. Alain, I. Garrigue, P. Merville, *Am. J. Transplant.* **12**, 202-209 (2012)
7. K.K. Biron, *Antiviral Res.* **71**, 154-163 (2006)
8. M.N. Prichard, E.R. Kern, *Virus Res.* **157**, 212-221 (2011)
9. N.S. Lurain, S. Chou, *Clin. Microbiol. Rev.* **23**(4), 689-712 (2010)
10. M. Hakki, S. Chou, *Curr. Opin. Infect. Dis.* **24**(6), 605-611 (2011)
11. E. Nogueira, K.S. Ozaki, H. Tomiyama, C.F.H. Granato, N.O.S. Camara, A. Pacheco-Silva, *Int. Immunopharmacol.* **6**, 2013-2037 (2006)
12. L. Strasfeld, S. Chou, *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **24**, 809-833 (2010)
13. A. Erice, *Clin. Microbiol. Rev.* **12**(2), 286-297 (1999)
14. T.G. Burland, *Methods Mol. Biol.* **132**, 71-91 (2000)
15. T.A. Hall, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**, 95-98 (1999)
16. M. Chevillotte, J. von Einem, B.M. Meier, F.-M. Lin, H.A. Kestler, T. Mertens, *Antiviral Res.* **85**, 318-327 (2010)
17. S. Chou, N.S. Lurain, A. Weinberg, G.-Y. Cai, P.L. Sharma, C.S. Crumpacker, *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**(6), 1500-1502 (1999)
18. M. Chevillotte, I. Ersing, T. Mertens, J. von Einem, *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**(12), 5004-5011 (2010)
19. S. Alain, S. Hantz, C. Scieux, A. Karras, M.C. Mazon, J.C. Szlag, B.M. Imbert, A.M. Fillet, S. Gouarin, C. Mengelle, A. de Wilde, N. Cogne, G. Champier, S. Rogez, C. Legendre, F. Denis, *J. Med. Virol.* **73**, 566-573 (2004)
20. G. Boivin, N. Goyette, M. Farhan, J. Ives, R. Elston, *J. Clin. Virol.* **53**, 208-213 (2012)
21. I. Gracia-Ahufinger, J. Gutiérrez-Aroca, E. Cordero, E. Vidal, S. Cantisán, D. del Castillo, C. Martín-Gandul, A. Rivero, J. Torre-Cisneros, *Transplantation.* **95**(8), 1015-1020 (2013)

#### 4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O uso de técnicas de biologia molecular para a detecção de mutações associadas à resistência aos fármacos utilizados no tratamento da infecção pelo HCMV em pacientes de grupos de risco é relativamente comum, e conforme novas tecnologias vão surgindo, são também elas empregadas nesse tipo de estudo, como o sequenciamento de nova geração (SAHOO *et al*, 2013). O sequenciamento se sobrepõe a outras técnicas pois permite visualizar a mutação, diminuindo drasticamente a possibilidade de erros de interpretação. Porém, a identificação de mutações ainda não descritas exige ainda a associação destas abordagens com técnicas de avaliação fenotípica, como o ensaio de redução de placa, para a caracterização de novas amostras resistentes (LURAIN & CHOU, 2010; ERICE, 1999).

Na população estudada, a frequência de HCMV foi de 55,8%. Porém, o uso de amostras de descarte não permitiu o acesso aos históricos clínico e farmacológico dos pacientes, de modo que não podem ser feitas maiores inferências a respeito dos resultados obtidos. O fármaco utilizado, o estado de imunossupressão do paciente e o tempo de terapia são fatores determinantes para o surgimento de mutações relacionadas à resistência no genoma viral (CHEVILLOTTE *et al*, 2010). Mesmo assim, uma mutação de fenótipo desconhecido foi encontrada. Na continuidade desse trabalho, poderia ser construído um vírus recombinante com a mutação no gene *UL54* (CHOU *et al*, 2003) a fim de empregar os já referidos testes fenotípicos e poder caracterizar a mutação como associada ou não à resistência a drogas anti-virais.

## 5. BIBLIOGRAFIA REFERENTE À INTRODUÇÃO

ANDERS, D.G, KERRY, J.A. & PARI, G.S. DNA synthesis and late viral gene expression. In: ARVIN A., CAMPADELLI-FIUME G., MOCARSKI E., et al. **Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2007, Cap. 19. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47419/>>. Acesso em: 05 de julho de 2013.

ARDALAN, M. Rare Presentations of Cytomegalovirus Infection in Renal Allograft Recipients. **Nephro-Urology Monthly**, v. 4(2), p. 431-436, 2012.

BHELLA, D., RIXON, F.J., DARGAN, D.J., Cryomicroscopy of human cytomegalovirus virions reveals more densely packed genomic DNA than in herpes simplex virus type 1. **Journal of Molecular Biology**, v. 295, p.155-161, 2000.

BOECKH, M. Complications, Diagnosis, Management, and Prevention of CMV Infections: Current and Future. **Hematology ASH Education Program**, v. 2011, p. 305-309, 2011.

BRITT, B. Maturation and egress. In: ARVIN A., CAMPADELLI-FIUME G., MOCARSKI E., et al. **Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2007, Cap. 20. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47422/>>. Acesso em: 05 de julho de 2013.

BUONSENSO, D. et al. Congenital cytomegalovirus infection: current strategies and future perspectives. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 16(7), p. 919-935, 2012.

BUTLER, N.J. & THORNE J.E. Current status of HIV infection and ocular disease. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 23(6), p. 517-522, 2012.

CANNON, M.J. et al. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. **Reviews in Medical Virology**, v. 20, p. 202-213, 2010.

CHAN, G. et al. Human cytomegalovirus induction of a unique signalsome during viral entry into monocytes mediates distinct functional changes: a strategy for viral dissemination. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, p. 743-752, 2012.

CHOU, S., LURAIN, N.S., THOMPSON, K.D., MINER, R.C., DREW, W.L. Viral DNA Polymerase Mutations Associated with Drug Resistance in Human Cytomegalovirus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188 (1), p. 32-39, 2003.

COMPTON, T. Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. **Trends in Cell Biology**, v. 14(1), p.5-8, 2004.

COURIVAUD, C. et al. Cytomegalovirus Exposure and Cardiovascular Disease in Kidney Transplant Recipients. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 207, p. 1569-1575, 2013.

DA CUNHA-BANG, C. et al. Factors associated with the development of cytomegalovirus infection following solid organ transplantation. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 43(5), p. 360-365, 2011.

DO AMARAL, R.P. et al. Serological Profile of Potential Solid Organ Donors in Santa Catarina, Brazil. **Transplantation Proceedings**, v. 40, p. 665-667, 2008.

EMERY, V.C. Cytomegalovirus: recent progress in understanding pathogenesis and control. **Quarterly Journal of Medicine**, v. 105, p. 401-405, 2012.

FISHMAN, J.A. Overview: Cytomegalovirus and the Herpesviruses in Transplantation. **American Journal of Transplantation**, v. 13, p. 1-8, 2013.

FREIRE, A.L. et al. Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. **PNAS**, v. 101(43), p. 15470-15475, 2004.

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org>>. Acesso em: 30 de junho de 2013.

LIU, X.F. et al. Epigenetic Control of Cytomegalovirus Latency and Reactivation. **Viruses**, v. 5(5), p. 1325-1345, 2013.

MA, Y. et al. Human CMV transcripts: an overview. **Future Microbiology**, v. 7(5), p. 577-593, 2012.

MARTY, F.M., WINSTON, D.J., ROWLEY, S.D., VANCE, E., PAPANICOLAOU, G.A., MULLANE, K.M., BRUNDAGE, T.M., ROBERTSON, A.T., GODKIN, S., MOMMÉJAMARIN, H., BOECKH, M. CMX001 to prevent cytomegalovirus disease in hematopoietic-cell transplantation. **The New England Journal of Medicine**, v. 369(13), p. 1227-1236, 2013.

MATOS, S.B. et al. Seroprevalence of cytomegalovirus infection among healthy blood donors in Bahia State, Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 45-49, 2010.

MOCARSKI JR, E.S. Betaherpes viral genes and their functions. In: ARVIN A., CAMPADELLI-FIUME G., MOCARSKI E., et al. **Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2007, Cap. 15. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47435/>>. Acesso em: 05 de julho de 2013.

PAINTER, W., ROBERTSON, A., TROST, L.C., GODKIN, S., LAMPERT, B., PAINTER, G. First pharmacokinetic and safety study in humans of the novel lipid antiviral conjugate CMX001, a broad-spectrum oral drug active against double-stranded DNA viruses. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56(5), p. 2726-2734, 2012.

SAHOO, M.K., LEFTEROVA, M.I., YAMAMOTO, F., WAGGONER, J.J., CHOU, S., HOLMES, S.P., ANDERSON, M.W., PINSKY, B.A. Detection of Cytomegalovirus Drug Resistance Mutations by Next-Generation Sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51 (11), p. 3700-3710, 2013.

SMITH, C. & KHANNA, R. Immune Regulation of Human Herpesviruses and Its Implications for Human Transplantation. **American Journal of Transplantation**, v. 13, p. 9-23, 2013.

SINCLAIR, J. Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage. **Journal of Clinical Virology**, v. 41(3), p. 180-183, 2008.

SINZGER, C. Entry route of HCMV into endothelial cells. **Journal of Clinical Virology**, v. 41, p. 174-179, 2008.

TANDON, R. & MOCARSKI, E.S. Viral and host control of cytomegalovirus maturation. **Trends in Microbiology**, v. 20(8), p. 392-401, 2012.

TOMTISHEN III, J.P. Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). **Virology Journal**, v. 9(22), 2012.

VANARSDALL, A.L. & JOHNSON, D.C. Human cytomegalovirus entry into cells. **Current Opinion in Virology**, v. 2, p. 37-42, 2012.