

APLICAÇÃO DE NIMESULIDA PREVINE LESÕES GENITAIS CAUSADAS POR *Herpes Simplex Virus-2*¹

THE APPLICATION OF NIMESULIDE PREVENTS GENITAL LESIONS CAUSED BY HERPES SIMPLEX VIRUS-2

**Carine Eloise Prestes Zimmermann², Namir Ferreira El Hodali³,
Gabriela Moraes Barbosa⁴ e Luiz Carlos Rodrigues Junior⁵**

RESUMO

A infecção por *Herpes Simplex virus -2* (HSV-2) é amplamente distribuída no mundo inteiro. A lesão produzida pelo vírus é dolorosa e também contribui para infecção com outros microrganismos infecciosos, como bactérias e fungos. A infecção com HSV-2 é perigosa durante a gravidez, uma vez que ela pode atingir o feto no momento do parto. A terapia antiviral é limitada, principalmente porque a manifestação da infecção está mais relacionada ao processo inflamatório local. A nimesulida, um anti-inflamatório inibidor preferencial da enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2), pode ser um alvo para a terapia do HSV-2, pois ela pode melhorar a lesão. Assim, o objetivo nesse estudo foi investigar a ação da nimesulida na resolução ou prevenção do desenvolvimento da lesão genital, causada por HSV-2 em modelo murino. Camundongos BALB/C foram infectados na mucosa genital com HSV-2 e diferentes esquemas de tratamento com a nimesulida foram aplicados. Grupos de camundongos receberam o fármaco no início da infecção, em uma fase avançada da infecção ou antes da infecção. As lesões herpéticas foram classificadas através de um score de intensidade como lesão ausente (zero), lesão leve (um), lesão moderada (dois) e lesão intensa (3). Os resultados indicam que o uso de nimesulida após a infecção com HSV-2 é ineficiente para reverter a inflamação, entretanto quando o fármaco foi administrado antes da infecção por HSV-2, ele é capaz de prevenir a manifestação da lesão herpética.

¹ Trabalho Final de Graduação - TFG.

² Acadêmica do Curso de Biomedicina - UNIFRA.

³ Acadêmico do Curso de Farmácia - UNIFRA.

⁴ Mestranda do Curso de Mestrado de Nanociências - UNIFRA.

⁵ Orientador - UNIFRA. *Email*: luizrdrgs@yahoo.com.br

Palavras-chave: vírus, ciclo-oxigenase, infecção.

ABSTRACT

The Herpes Simplex virus-2 (HSV-2) widely occurs throughout the world. The lesion produced by the virus is painful and it also contributes to infection with other infectious organisms such as bacteria and fungi. Infection with HSV-2 is dangerous during pregnancy, since it can reach the fetus during delivery. Antiviral therapy is limited, mainly because the infection manifestation is more related to a local inflammatory process. Nimesulide, a preferential anti-inflammatory inhibitor of the cyclooxygenase-2 enzyme (COX-2), may be a target for the HSV-2 therapy for it can improve the lesion. The objective of this study is to investigate the action of nimesulide in solving or preventing the development of genital lesions caused by HSV-2 in a murine model. Some BALB/C mice were infected in the genital mucous with HSV-2 and different treatment schemes with nimesulide were applied. Some groups of mice received the drug in the beginning of the infection, others in an advanced stage, and still others before the infection. The herpetic lesions were classified using a lesion score of intensity as absent (zero), light (one), moderate (two) and severe (3). The results indicate that the use of nimesulide after infection with HSV-2 is inefficient to revert inflammation, however when the drug is administered prior to infection with HSV-2, it is able to prevent the manifestation of herpetic lesions.

Keywords: virus, cyclooxygenase infection.

INTRODUÇÃO

O *Herpes Simplex Virus* (HSV) pertence à família *herpesviridae* e subfamília *alfaherpesvirinae* e, dentro dessa subdivisão, estão o HSV-1, que causa lesão labial e o HSV-2, que causa lesão genital. A lesão herpética é caracterizada por um processo inflamatório local, mediado principalmente por linfócitos e neutrófilos, com a formação de microvesículas preenchidas por um líquido viscoso e cheias de vírus (SILVA, 2009). Quando ocorrem na cavidade oral, as lesões são definidas como gengivoestomatite herpética, quando acontecem na região genital são definidas como vulvovaginite herpética. Essas lesões destroem a células epiteliais regionais, são dolorosas, têm um período de sete até dez dias para cicatrização e pode potencializar a transmissão de outras doenças, como o

Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (JAMESON et al., 2010).

Com relação ao processo infeccioso, o HSV-1 entra na célula-alvo através de um mecanismo mediado por múltiplos receptores que são expressos em inúmeros tipos de células e tecidos (TAYLOR et al., 2007). O vírus se adsorve à superfície da célula através das proteínas do envelope viral (gB, gC, gH-gL) com receptores celulares (sulfato de heparano e nectinas), realizando uma fusão do envelope com a membrana citoplasmática, que permite a penetração na célula. Após a penetração, o vírus sofre replicação nas células da epiderme e derme, o que resulta em necrose e ulceração. A disseminação da doença é limitada de acordo com o estado imunológico do indivíduo. No início, ocorre a atuação dos neutrófilos, logo o infiltrado linfocítico, quando os macrófagos começam a aparecer, indica que está iniciando o processo de debridamento, cura e reepitelização (HELDWEIN; KRUMMENACHER, 2008). O HSV pode induzir a expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (PARRA; SLOTS, 1996).

Ainda não existe cura para a infecção causada pelo HSV, apenas poucos tratamentos reduzem os sintomas da expressão clínica. Em razão disso, existe uma grande demanda de pesquisas de fármacos para tratamento das espécies de HSV. Atualmente, a terapêutica utilizada é feita com análogos nucleosídicos do aciclovir, que inibem a replicação viral (SIMMONS, 2002). O aciclovir é um fármaco que funciona bem em indivíduos imunocompetentes, sendo administrado topicamente ou sistemicamente, dependendo do caso (SWEARINGEN; AILOR, 2007). Age como inibidor seletivo da replicação do HSV, sendo administrado sob a forma de pró-fármaco inativo. No organismo, ele é fosforilado pela enzima viral, timidina quinase e, posteriormente, transformando-se na forma ativada (trifosfato de aciclovir) por enzimas celulares. O fármaco ativado concentra-se apenas nas células infectadas, inibindo, especificamente, a replicação do DNA do HSV (LUPI, 2003).

Segundo Rodiles et al. (1999), juntamente ao processo infeccioso viral, inicia-se também uma reação inflamatória mediada pelas prostaglandinas (PGs). As PGs são as principais mediadoras da inflamação, sendo a inibição da sua biossíntese o principal mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não-esteroidais (CARNEIRO et al., 2004). A nimesulida pertence ao grupo dos anti-inflamatórios não esteroidais, tendo como ação principal a diminuição do infiltrado inflamatório e consequente diminuição do estímulo doloroso. Esse medicamento é um inibidor preferencial da enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2), e atua reduzindo sua atividade local (WANNMACHER; FERREIRA, 2006). Para bloquear a enzima, a nimesulida entra no canal hidrofóbico da COX-2, formando pontes de hidrogênio com um resíduo de arginina na posição 120,

impedindo que os ácidos graxos do substrato entrem no domínio catalítico, inibindo, assim, a oxidação do ácido araquidônico pela COX e consequente formação das PGs (CULLEM et al., 1998). Curiosamente, foi observado que, durante o seu ciclo replicativo, o HSV-1 induz a expressão da enzima COX-2 local (STEER; CORBETT, 2003).

A partir dessas propriedades, sugere-se que a nimesulida pode servir como adjuvante no tratamento ou prevenção da inflamação herpética local. Soma-se a isso que o aciclovir reduz a replicação viral, mas não é eficaz na resposta inflamatória, principalmente na infecção primária. Assim, a investigação da aplicação da nimesulida na resposta inflamatória herpética local é bastante relevante devido a suas propriedades. Portanto, o objetivo neste trabalho foi verificar a influência da nimesulida no desenvolvimento da lesão herpética genital causada por HSV-2.

MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS

No presente trabalho, foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, com idade entre 10-12 semanas e peso entre 20-25g, cada grupo de estudo teve n=4. Os camundongos foram obtidos do biotério da Universidade Federal de Santa Maria e mantidos no biotério do Centro Universitário Franciscano. Os animais foram divididos em 4 grupos. Cada grupo de animais ficou isolado em caixas separadas e foram alojados em uma sala com temperatura de 25°C, umidade relativa do ar de 60 a 66% e ciclos de claro/escuro controlados. A água e a comida aos animais foram fornecidas “*ad libitum*” durante todo o procedimento experimental.

O projeto foi submetido para análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM e o procedimento experimental seguiu as normas éticas para experimentação animal elaborada pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2003).

CÉLULAS E VÍRUS

Foi utilizado no estudo o vírus HSV-2, linhagem H33. Os vírus foram expandidos em células VERO (células de rim do macaco verde – ATCC CRL 1586), cultivadas em meio DMEM 1X suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SFB). Para a infecção foi utilizada a proporção de 0,01 PFU (Plate

Forming Units) de vírus para cada 100 células, em um período de 3h. Os efeitos citopáticos foram acompanhados até 72 horas. Após a destruição da monocamada, as células foram centrifugadas e os vírus extraídos através de ciclos imediatos de congelamento e descongelamento. O extrato celular viral foi aliquotado e armazenado em freezer -80 °C e título determinado em placas de 24 poços, através da técnica de TCID₅₀.

PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE NIMESULIDA

Devido às características lipofílicas da nimesulida, foi necessária a utilização de tensoativos para obter o fármaco na sua forma livre, em meio aquoso, e evitar sua precipitação. A nimesulida foi preparada a partir da solubilização do pó em monooleato de sorbitano (span 80®) e polissorbato 80 (tween 80®) na proporção de 0,766g/100 mL, utilizando copo graduado. A solução foi agitada até apresentar-se em aspecto homogêneo (ALVES, 2006). Foi utilizada nimesulida na concentração de 5mg/Kg de camundongo (RODRIGUES et al., 2007).

TRATAMENTOS

Os camundongos foram anestesiados, no peritônio, com cloridrato de quetamina 10% (Cetamin®), na quantidade de 0,028 mL/camundongo de peso médio 20g e cloridrato de xilazina 2% (Xilasin®), na quantidade de 0,004 mL/camundongo de peso médio 20g. Durante o período de anestesia, a mucosa genital foi raspada levemente com uma agulha de insulina estéril. Esse procedimento garante a remoção do estrato córneo superior e a exposição das células com receptores específicos para a entrada do vírus. Para a infecção foi utilizada a dose de 1×10^4 PFU/mL de HSV-2 diluído 10 µL PBS 1X autoclavado, previamente padronizado (HUNDERTMARCH et al., 2009, p. 31). A nimesulida preparada foi injetada no peritônio (5mg/Kg) dos animais. Os seguintes grupos foram preparados: Grupo 1: Somente PBS, grupo controle; Grupo 2: infecção com HSV-2 e administração de nimesulida após o aparecimento da primeira lesão herpética (período 1); Grupo 3: infecção com HSV-2 e administração de nimesulida durante a fase mais adiantada de lesão herpética (período 2); Grupo 4: infecção com HSV-2 em camundongos previamente tratados com nimesulida (período 3).

ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para a análise dos resultados foi estabelecida uma numeração crescente, relacionada com o grau de desenvolvimento da lesão genital. Grau 0 - sem lesão; Grau 1 (leve) - somente eritema; Grau 2 (moderada) - eritema com vesículas; Grau 3 (intensa) - eritema, vesículas e exsudato.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

LESÃO HERPÉTICA GENITAL

Inicialmente, para estudar o efeito da nimesulida na resolução da lesão herpética genital, foi padronizado um modelo de indução de lesão em camundongos. A infecção por HSV é caracterizada por um padrão inflamatório do tipo Th1, esse padrão é regulado por citocinas específicas (IL-12, TNF- α , e IFN- γ) que se diferenciam das do padrão Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) (MUCIDA; CHEROUTRE, 2010). Assim, foram utilizados camundongos isogênicos do tipo BALB/C, pois esses animais apresentam um padrão de resposta imunológica do tipo Th2, o que possibilita um balanço mais equilibrado de citocinas durante a evolução da infecção por HSV-2 e, conseqüentemente, a maior sobrevivência dos animais.

Foi realizado, inicialmente, um estudo para classificação da lesão herpética genital. Conforme descrito no item material e métodos, os camundongos foram infectados com HSV-2 na mucosa genital, foram anestesiados e o extrato córneo raspado com uma agulha de insulina, foi pingado 10 μ L da suspensão viral contendo 1x10⁴PFU/mL. Os animais foram transferidos novamente para a caixa e administrado analgésico ibuprofeno na água de beber. A classificação da lesão foi feita por meio de análise visual diária, sendo considerada como de grau zero quando não havia lesão, grau 1 quando apresentava um aspecto avermelhado e um discreto tumor; grau 2 quando apresentava maior inchaço bolhoso, eritema e leve exudato; a lesão de grau 3 foi caracterizada com um aspecto descamativo da mucosa, com vesículas e eritema intenso, além do exudado abundante (Figura 1).

Os resultados observados são característicos da patogênese da infecção herpética genital, com lesões do tipo vesículo bolhoso, preenchidas com um líquido viscoso, bordas eritematosas e com padrões de um processo inflamatório como dor, rubor e calor (SANTOS, 2008). O HSV-2 infecta as células epiteliais e vai infectando célula a célula no sentido longitudinal e transversal, até atingir o nervo mais próximo (MARTINHO et al., 2003).

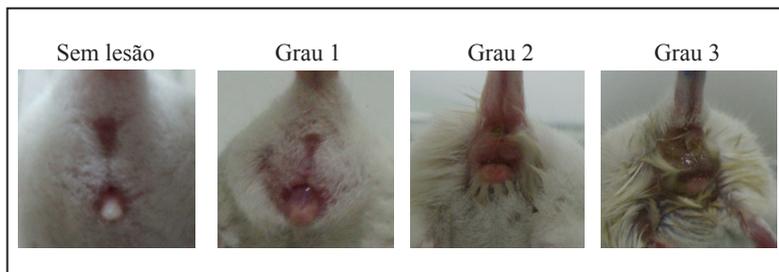


Figura 1 - Aspectos clínicos da lesão herpética genital por HSV-2: Camundongos fêmeas da linhagem BALB/C foram infectados ou não com 1×10^4 PFU/mL de HSV-2 e o desenvolvimento da lesão analisado diariamente e classificado em sem lesão, grau 1, grau 2 e grau 3, conforme intensidade.

TRATAMENTO COM NIMESULIDA

Conforme descrito no item material e métodos foram constituídos quatro grupos de camundongos com $n=4$ cada um grupo; o primeiro grupo foi o controle, o segundo grupo foi infectado com HSV-2 e tratado com nimesulida após o surgimento da primeira lesão, o terceiro grupo infectado e tratado com nimesulida na fase mais avançada da lesão e o quarto grupo tratado com nimesulida um dia antes da infecção.

Para tratamento do vírus é utilizado o aciclovir, um fármaco que se liga a GDT e compete com GTP no momento da replicação do DNA (SANTOS, 2008). Essa terapia atinge diretamente o vírus, impedindo sua replicação e contaminação de outras células. Entretanto, o processo inflamatório acontece, contribuindo para a patogênese e propagação do HSV-2. Atualmente, não existem estudos sobre a aplicação de anti-inflamatórios no tratamento da lesão herpética.

Nesse estudo, foi testada a atividade da nimesulida na resolução do infiltrado inflamatório gerado durante a infecção herpética com HSV-2, em genital de camundongos BALB/c. Os vírus HSV-2 foram produzidos por propagação em células VERO, purificados e quantificados, conforme descrito na metodologia. Após a infecção com uma dose de 1×10^4 PFU/mL, foram classificados os padrões de lesão (grau zero; grau 1; grau 2 e grau 3) de acordo com a tabela 1.

O primeiro grupo (grupo 1) foi constituído somente dos animais controle, que foram injetados somente com PBS e não receberam infecção viral, e, conforme o esperado, esse grupo apresentou lesão de grau zero. O segundo grupo (grupo 2) foi infectado com HSV-2 e logo ao primeiro sinal de lesão foi administrada a nimesulida, sendo que foi observado um aumento gradativo do

grau da lesão. A nimesulida não foi efetiva na redução da expressão de COX-2, devido ao aumento da patogenicidade, conforme apresenta-se na tabela 1. No grupo 3, a nimesulida foi administrada na fase mais adiantada da infecção, verificando-se aumento da lesão e consequente aumento da patogenicidade. O vírus, por apresentar capacidade de aumentar a expressão de COX-2, pode levar ao aumento da severidade da inflamação. No grupo 4, foi administrada nimesulida antes de ser realizada a infecção, este grupo não apresentou sinal de inflamação. Considerando que o tempo de meia vida da nimesulida é de 3,2 a 6 horas, que a segunda dose da nimesulida foi administrada três dias após a aplicação da primeira dose e que também a infecção causada pelo vírus manifesta-se em torno de dois a quatro dias após a infecção, fica evidente que o uso do fármaco foi relevante na ausência do infiltrado inflamatório.

Tabela 1 - Ação da nimesulida na resolução da lesão herpética genital.

Regime de tratamento	Sem lesão	Lesão grau 1	Lesão grau 2	Lesão grau 3	Óbito
Nimesulida período 1					
2° dia	XX	XX			
3° dia		X	X	X	X
4° dia				XXX	X
Nimesulida período 2					
2° dia		XXX	X		
3° dia		XX		X	X
4° dia			X	X	XX
Nimesulida período 3					
2° dia	XXXX				
3° dia	XXXX				
4° dia	XXXX				
Controle/PBS					
2° dia	XXXX				
3° dia	XXXX				
4° dia	XXXX				

Tabela 1: camundongos BALB/C foram infectados ou não com 1×10^4 PFU/mL com HSV-2 e receberam diferentes esquemas de tratamentos com nimesulida. Nimesulida no início da infecção (período 1); nimesulida em fase mais adiantada da lesão (período 2); nimesulida na fase mais adiantada de lesão (período 3) e controle.

Os efeitos observados na lesão herpética genital por HSV-2, após o tratamento com nimesulida, indicaram que esse fármaco tem uma potencial ação anti-herpética. A perda do efeito anti-herpético quando a nimesulida é administrada, após a instalação do processo infeccioso/inflamatório, indica que esse fármaco pode influenciar etapas iniciais da replicação desse vírus. Existem inúmeras justificativas para utilização de anti-inflamatórios na infecção herpética. A terapia antiviral para a manifestação herpética é limitada, isso porque a patogênese e recorrência são principalmente mediadas por mecanismos imunológicos, ao invés de efeitos citopáticos (STREILEIN et al., 1997). Citocinas, que participam da resposta inflamatória, são induzidas a partir da atividade do fator de transcrição nuclear NF κ B e estudos anteriores demonstraram que a translocação desse fator para o núcleo é induzida por HSV-1 e essencial para a replicação viral (HARGETT et al., 2006).

Os resultados da nimesulida observados nesse estudo estão relacionados com outros já publicados com anti-inflamatórios que atuam na inibição da COX-2. O lornoxicam, um fármaco dessa classe, quando utilizado em animais infectados com HSV-1 e, posteriormente, expostos a luz UV, demonstrou ser eficiente na redução dos efeitos lesivos ocasionados pelo herpes, isso é relacionado com a menor quantidade de NF κ B e citocinas inflamatórias (YIN, et al., 2009).

CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi investigada a atividade do fármaco nimesulida em diferentes fases da infecção genital com HSV-2. Os resultados indicam que a administração prévia da nimesulida diminui e anula a inflamação decorrente da infecção por HSV-2

REFERÊNCIAS

ALVES, M. P. P. **Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea in vitro**. 2006. 166f. Tese (Doutorado)-UFRGS, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2006.

CARNEIRO, S. L. A. et al. **Ciclooxigenase-2 e Câncer, uma Breve Revisão. Pesquisa Médica**. Fortaleza. Edição 2, n. 07. Jan./Jun. 2004.

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. **Manual Sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório**. Goiânia: Brasil, 2003.

CULLEM, L. et al. Selective Cyclooxygenase-2 Inhibition by Nimesulide in Man. **The Journal of Pharmacology and Therapeutics**. v. 287, n. 2, p. 578-582, 1998.

HARGETT, D.; RICE, S.; BACHENHEIMER, S. L. Herpes simplex virus type 1 ICP27-dependent activation of NF-kappaB. **Journal of Virology**. v. 80, n. 21, p. 10565-78, 2006.

HELDWEIN, E. E.; KRUMMENACHER, C. Entry of herpesviruses into mammalian cells. **Cell Mol. Life Sci**. v. 65, n. 11, p. 1653-1668; junho, 2008.

HUNDERTMARCH, L. C. et al. **Padronização da Infecção Herpética Genital em Camundongos**. Santa Maria: Centro Universitário Franciscano, Ciências da Área da Saúde, Curso de Farmácia, 2009, p. 31.

JAMENSON, D. R. et al. The association between lack of circumcision and HIV, HSV-2, and other sexually transmitted infections among men who have sex with men. **Sex Transmission Disease**. v. 37, n. 3, p. 147-152, 2010.

LUPI, O. Herpes Simplex. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 75, n. 3, p. 261-275, 2003.

MARTINHO, A.; OLIVEIRA, A.; SILVA, C. **Monografia sobre herpes vírus humano**. 2003. 49f. Monografia (Graduação em Biologia) - Universidade de Evora, Evora, 2003.

MUCIDA, D.; CHEROUTRE, H. The many face-lifts of CD4 T helper cells. **Advanced Immunology**. v. 107, p. 139-152, 2010.

PARRA, B.; SLOTS, J. Detection of human viruses in periodontal pockets using polymerase chain reaction. **Oral Microbiol Immunol**. n. 5, p. 289-293, 1996.

RODRIGUES, L. A.; FRACASSO, J. F.; SIQUEIRA, C. E. Potencialização do efeito antiinflamatório e antinociceptivo do diclofenaco e da nimesulida por vitaminas do complexo B. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 28, n. 1, p. 45-49, 2007.

SANTOS, N. S. O. **Introdução à virologia humana**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 97-99, 2008.

SILVA, I. T.; **Triagem anti-herpética de alguns táxons da biodiversidade brasileira: Fracionamento e biomonitorado de *Cecropia glaziovii* Sneth., *Urticaceae* (embaúba)**. 2009. 133f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, 2009.

SIMMONS, A. Clinical Manifestations and Treatment Considerations of Herpes Simplex Virus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 1, n.186, p. S71-77, 2002.

STEER, S.A.; COBETT, J.A. The role and regulation of COX-2 during viral infection. **Viral Immunology**. v. 16, n. 4, p. 447-460, 2003.

STRELEIN, J. W.; DANA, M. R.; KSANDER, B. R. Immunity causing blindness: five different paths to herpes stromal keratitis. **Immunology Today**. v. 18, n. 9, p. 443-9, 1997.

SWEARINGEN, J. A.; AILOR, S. K. Herpes simplex virus: it's more than a cold sore. **Missouri Medicine**. v. 104, n. 2, p. 144-8, 2007.

TAYLOR, J. M. et al. Alternative entry receptors for Herpes Simplex Virus and their roles in disease. **Cell Host Microbe**. v. 2, n. 1, p. 19-28, 2007.

WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. Principio gerais no tratamento da inflamação, In: FUCHS, F. D. **Farmacologia clinica: fundamentos da terapêutica racional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 294, 2006.

YIN, J. et al. Lornoxicam suppresses recurrent herpetic stromal keratitis through down-regulation of nuclear factor-kappaB: an experimental study in mice. **Molecular Vision**. v. 15, n. 14, p. 1252-1259, jun., 2009.