

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR.

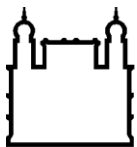
Desenvolvimento de métodos de diagnóstico, silenciamento gênico e caracterização molecular do vírus herpes simples tipo 1 e herpesvírus humano tipo 6 em pacientes imunocomprometidos do Rio de Janeiro.

Amanda Perse da Silva

Instituto Oswaldo Cruz (IOC)

Rio de Janeiro

Março/2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Amanda Perse da Silva

Desenvolvimento de métodos de diagnóstico, silenciamento gênico e caracterização molecular do vírus herpes simples tipo 1 e herpesvírus humano tipo 6 em pacientes imunocomprometidos do Rio de Janeiro.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor(a) em Ciências pela pós-graduação em Biologia Celular e Molecular.

Orientador(a): Prof. Dr^a Vanessa Salete de Paula

RIO DE JANEIRO

Março/2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S586 Silva, Amanda Perse da

Desenvolvimento de métodos de diagnóstico, silenciamento gênico e caracterização molecular do vírus herpes simples tipo 1 e herpesvírus humano tipo 6 em pacientes imunocomprometidos do Rio de Janeiro / Amanda Perse da Silva. – Rio de Janeiro, 2015.

xv, 111 f. : il. ; 30 cm.

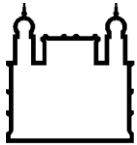
Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2015.

Bibliografia: f. 80-105

1. *Herpesviridae*. 2. HSV-1. 3. HHV-6. I. Título.

CDD 616.9112

Verso da folha inicial



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Amanda Perse da Silva

Desenvolvimento de métodos de diagnóstico, silenciamento gênico e caracterização molecular do vírus herpes simples tipo 1 e herpesvírus humano tipo 6 em pacientes imunocomprometidos do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof. Dr^a Vanessa Salete de Paula

Aprovada em 03/03/2015

Examinadores

Dr^a. Selma de Andrade Gomes (**Presidente e revisora**)

Prof. Dr^o Adilson José de Almeida

Prof^a. Dr^a. Monick Lindenmeyer Guimarães

Prof^a. Dr^a Silvia Maria Baeta Cavalcanti (**Suplente**)

Prof^a Dr^a Tatiana Xavier Castro (**Suplente**)

Rio de Janeiro, 3 de março de 2015.

À minha família, luz da minha vida, Nilma, Valdemir, Thais

...e Daniel....

Por sonharem junto comigo esse sonho, amo vocês...

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus, pois em sua infinita bondade me deu força para continuar no meu caminho, mesmo com tantas pedras e caminhos tortuosos. Protegendo-me e guardando sempre.

Aos meus pais, Nilma Bezerra e Valdemir Perse, obrigada pelo apoio incondicional, pelo investimento, pelo carinho, pelo amor, pela confiança depositada em mim. Enfim, obrigada por sempre acreditarem em mim. Vocês são a luz-guia do meu caminho. Meu amor por vocês é infinito e além.

A minha irmã, Thais Perse, pelo amor e carinho, por deixar nossas diferenças de lado tantas vezes para me apoiar e suportar. Amo você, mesmo demonstrando isso poucas vezes.

Ao meu amor, namorado, amigo, companheiro e futuro marido Daniel Ramos, pelo apoio incondicional a essa jornada acadêmica escolhida por mim. Obrigada pelo amor, afago, carinho e respeito. Por sempre despertar o melhor de mim, e sempre estar do meu lado todas as vezes que precisei. Por acreditar em mim, mesmo quando eu deixava de acreditar. Por ser meu escudo e proteção. Obrigada por tornar a vida mais leve, mais feliz. “Por onde for quero ser seu par”.

Agradeço a minha orientadora Dr^a.Vanessa Salete de Paula, obrigada pelo seu trabalho e orientação. Por me ensinar os primeiros passos dentro da biologia molecular, por permitir e apoiar que eu “voasse” a outros rumos quando foi preciso, pela paciência e carinho.

Agradeço aos amigos, funcionários e colegas de trabalho do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LDTV), pelas conversas, apoio acadêmico, desabafos e por todos esses anos de convivência. Em especial, agradeço a minha aluna nesse período Amanda Lopes, obrigada por todo o suporte.

Agradeço as amigas Yasmine Rangel e Lyana Lima, por serem meu braço direito e esquerdo dentro do LDTV e meu porto seguro. Obrigada pelo apoio acadêmico, pessoal, emocional. Obrigada pela amizade sem barreiras, pela cumplicidade, pelo companheirismo, pelas verdades, os milagres, as superações. Enfim, por proporcionarem ótimos momentos juntas no LDTV, fazendo meus dias mais felizes.

Ao Drº Adilson José de Almeida pela sua colaboração, profissionalismo e essencial apoio acadêmico nesses anos de trabalho.

Ao pessoal de apoio do Instituto de Pesquisas Evandro Chagas (IPEC) e Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG), pela coleta das amostras de pacientes.

Agradeço a amiga- madrinha Anna Carolina, obrigada por ser essa amiga maravilhosa e prestativa, pelos conselhos valiosos, pelo “abraço de urso”, os “puxões de orelha” quando necessário. Pelo apoio, amor, carinho e respeito. Sua amizade foi uma das melhores coisas que a FIOCRUZ me proporcionou.

As eternas amigas Rita Aragão, Carla Elias, Aline Pádua e, mais recente, Luar Monteiro. Obrigada pelas risadas, os momentos de descontração, o choppinho para relaxar, a praia e pela amizade que fizeram o meu caminhar muito mais leve e feliz.

Agradeço ao Drº Jonas Schmidt-Chanasit do Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine na Alemanha. Por me aceitar e receber tão bem no seu laboratório de pesquisa, propiciando que eu pudesse aprender novas metodologias e práticas científicas.

Agradeço a banca examinadora por aceitar o desafio de arguir esse trabalho.

Agradeço ao financiamento do programa Ciências Sem Fronteiras, pela oportunidade de realizar o doutorado sanduíche em Hamburgo na Alemanha.

Ao Conselho de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida nesses anos de trabalho.

A coordenação e a secretária do programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (BCM) pela oportunidade de participar do programa e a todos os seus funcionários pela boa vontade e disponibilidade.

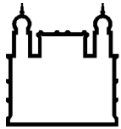
A todos que de alguma maneira, direta ou indiretamente me auxiliaram nessa jornada.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.

(Arthur Schopenhauer).

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

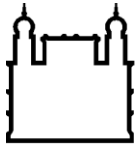
Desenvolvimento de métodos de diagnóstico, silenciamento gênico e caracterização molecular do vírus herpes simples tipo 1 e herpesvírus humano tipo 6 em pacientes imunocomprometidos do Rio de Janeiro.

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Amanda Perse da Silva

A família *Herpesviridae* abriga um grande número de vírus que infectam animais e o homem. Nove herpesvirus foram identificados que possuem o homem como hospedeiro primário e descritos através da análise filogenética foram classificados em três subfamília: *Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gamaherpesvirinae*. A família *Herpesviridae* agrupa vírus de genoma DNA e que estão associados a infecções latentes e a manifestações clínicas recorrentes. As infecções por herpesvírus podem se manifestar de forma assintomática ou sintomática, podendo causar diferentes síndromes clínicas. Estes vírus normalmente são benigno, sendo o aparecimento de lesões nas mucosas a forma mais comum da doença, podendo causar doenças neurológicas severas principalmente em pacientes imunocomprometidos. A incidência e severidade podem ser exacerbadas entre indivíduos imunocomprometidos. A presente tese é composta por três manuscritos, sendo dois trabalhos publicados e um submetido. Estes estudos se propuseram a padronizar métodos de silenciamento gênico, otimizar e comparar métodos para o diagnóstico e realizar a caracterização genotípica do herpes simples tipo 1 (HSV-1) e herpesvírus humano tipo 6 (HHV-6). Os estudos foram realizados em paciente imunocomprometidos do estado do Rio de Janeiro. No primeiro artigo “RNA interference inhibits herpes simplex vírus type 1 isolated from saliva samples and mucocutaneous lesions”, foi possível realizar a comparação da sensibilidade para detecção do HSV-1 por isolamento viral e pela metodologia da reação de PCR em tempo real em amostras de lesão, saliva e cultura celular . Além disso, neste estudo foi possível obter-se a inibição de mais 99% da replicação viral do HSV-1 *in vitro* utilizando a técnica de RNA de interferência. No segundo estudo “Genotypic characterization of herpes simplex vírus type 1 isolates in immunocompromised patients from Rio de Janeiro, Brazil” realizamos a primeira caracterização genotípica do HSV-1 no Rio de Janeiro. Os resultados demonstraram a existência de um único genótipo viral circulando nas amostras de pacientes imunocomprometidos. Além disso, as amostras brasileiras apresentam um alto grau de identidade estamos agrupadas no mesmo clado. No terceiro artigo “Acute liver failure in an immunocompetent patient”, foi possível a detecção do HHV-6B no soro e no fígado de paciente com hepatite fulminante. Neste estudo, foi possível mostrar a contribuição do HHV-6B na hepatite aguda fulminante sem etiologia definida. Esses estudos contribuem para o conhecimento das características clínicas e genéticas do HSV-1 e do HHV-6 circulantes em pacientes imunocomprometidos do Rio de Janeiro, Brasil.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Diagnóstico, terapia antiviral e caracterização genotípica do vírus Herpes Simples Tipo 1 (HSV-1) e Herpesvírus Humano Tipo 6 (HHV-6) em pacientes imunocomprometidos do Rio de Janeiro.

ABSTRACT

DOCTORAL THESIS

Amanda Perse da Silva

The Herpesviridae family has a large number of virus widespread in animals and human. Nine herpesvirus are identified that have humans as their primary host and described by phylogenetic analysis were classified into three subfamily: Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae and Gammaherpesvirinae. The family Herpesviridae is family of DNA virus and that are associated with latent infections and recurrent clinical manifestations. Herpesvirus infections can manifest themselves in asymptomatic or symptomatic form, may cause different clinical syndromes. These viruses are usually benign and the appearance of mucosal lesions are more common, but severe neurological diseases can occurred especially in immunocompromised patients. The incidence and severity may be exacerbated among immunocompromised individuals. This thesis consists of three manuscripts, two published papers and submitted. These studies set out to standardize methods of gene silencing, optimize and compare methods for the diagnosis and the genotypic characterization of herpes simplex type 1 (HSV-1) and human herpesvirus type 6 (HHV-6). The studies were conducted in immunocompromised patient Rio de Janeiro. In the first article "RNA interference inhibits herpes simplex virus type 1 isolated from saliva samples and mucocutaneous lesions", the comparison of sensitivity for detection of HSV-1 for viral isolation and PCR methodology in real time is possible for different types of samples. Furthermore, in this study it was possible to obtain the most 99% inhibition of viral replication of HSV-1 *in vitro* using RNA interference technique. In the second study "Genotypic characterization of herpes simplex virus type 1 isolates in immunocompromised patients from Rio de Janeiro, Brazil" held the first genotypic characterization of HSV-1 in Rio de Janeiro. The results demonstrated the existence of a unique viral genotype circulating in the samples of immunocompromised patients. Furthermore, viruses of the isolates show a high degree of identity and form a single clade. In the third article "Acute liver failure in an immunocompetent patient," HHV-6B detection in serum and liver of patients with fulminant hepatitis was possible. In this study, we show the HHV-6B contribution to acute fulminant hepatitis of unknown etiology. These studies contribute to the knowledge of clinical and genetic HSV-1 and HHV-6 circulating in immunocompromised patients in Rio de Janeiro, Brazil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1- Relação filogenética entre os membros da ordem Herpesvirales.	4
Figura 1.2: Esquema representativo da estrutura do Herpes Simples..	5
Figura 1. 3: Genoma do Herpes Simples.....	7
Figura 1.4: Entrada do HSV na célula hospedeira.....	9
Figura 1.5- Replicação viral. Fase α , Fase β e Fase γ	11
Figura 1.6: Latência e reativação do HSV-1.	13
Figura 1.7: Genótipos de Herpes Simples Tipo 1 e Herpes Simples Tipo 2.	15
Figura 1.8: Manifestações clínicas causadas por Herpes Simples Tipo 1 e Herpes Simples Tipo 2.....	17
Figura 1.9: Alvos envolvidos no silenciamento por siRNAs durante o ciclo replicativo viral	22
Figura 1.10: Características estrutural do HHV-6B-----	23
Figura 1.11: Diagrama demonstrando a estrutura gênomico do HHV-6A e HHV-6B... ..	24
Figura 1.12: Replicação do Herpesvírus Humano 6.....	26
Figura 1.13: Manifestações clínicas comuns em crianças infectadas com o HHV-6.....	27
Figura 1.14: Esquema representativo das diferentes manifestação do HHV-6A e HHV-6B	29

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1 : Glicoproteínas do Herpes Simples	6
---	---

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDAS

a.c- Antes de Cristo

ACV – Aciclovir

ACVMO- Aciclovir monofosfato

AIDS- Acquired Immunodeficiency Syndrome ou Síndrome da Imunodeficiência Adquirida - SIDA

ALKM-1- Autoanticorpo de fígado e rim tipo 1

AMA- Autoanticorpo antimitocôndria

ANA- Autoanticorpo antinúcleo

α -TIF- Fator indutor de transcrição de proteínas de fase α

CD46- Grupo de diferenciação 46

CMV- Citomegalovírus

CIHHV6- Herpesvírus humano tipo 6 integrado ao cromossoma humano

DNA- Ácido desoxirribonucleico

DR- Elementos de repetição terminal

DRR- Elementos de repetição terminal direita

DRL-Elementos de repetição terminal esquerda

E- Genes iniciais

EBV- Vírus Epstein-Barr

ELISA- Enzyme linked immunosorbent assay /Ensaio imunoenzimático

ES- Exantema súbito

FIOCRUZ-Fundação Oswaldo Cruz

GAG- Glicosaminoglicano

HAI- Hepatite auto-imune

HBLV-Vírus linfotrópico B humano

HCMV- Citomegalovírus Humano

HCF- Proteína estabilizadora de fator de transcrição

HIV- Vírus da imunodeficiência humana

HHV- Herpesvírus Humano

HHV-1-Herpesvírus Humano tipo 1

HHV-6 – Herpesvírus Humano tipo 6

HHV-6A- Herpesvírus Humano tipo 6 variante A

HHV-6B- Herpesvírus Humano tipo 6 variante B

HHV-7- Herpesvírus Humano tipo 7

HHV-8- Herpesvírus Humano tipo 8 (Vírus do sarcoma de Kaposi's)

HSV-1- Herpes Simples tipo 1

HSV-2- Herpes Simples tipo 2

HVEM- Mediador da entrada de herpesvírus .

ICP- Proteína da célula infectada

IE- Genes imediatamente iniciais

ICTV- Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

IgG- Imunoglobulina G

IgM-Imunoglobulina M

Kb- Kilobase

KSHV- Vírus do Sarcoma de Kaposi

L- genes tardios

LAT- Gene associado a latência

miRNA- micro RNA

nM- nanomolar

nm- Nanômetro

nt- nucleotídeo

NGF- Fator de crescimento do nervo

OMS-Organização Mundial de Saúde

OCT-Proteínas reguladoras de transcrição

ORF- Região de leitura aberta

pb – Pares de base

PBMC- Células Mononucleares de sangue periférico

PCR- Reação em cadeia da polimerase

RFPL-Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição

RNA- Ácido ribonucleico

RNAi- RNA de interferência

RNAm-RNA mensageiro

siRNA- pequenos RNAs de interferência

SMA-Autoanticorpo antimúsculo liso

TARV- Terapia antiretroviral

T CD 4+- Linfócito T auxiliar

TCD 8+- Linfócito T citotóxico

TNF α - Fator de necrose tumoral

TK-Timidina Kinase

VHS- Virus Host Shutt-off

VZV- Vírus da Varicela Zoster

SUMÁRIO

1- Introdução-----	1
1.1 Família Herpesviridae-----	1
1.1.1 Histórico-----	1
1.1.2 Subfamílias-----	2
1.2 Vírus Herpes Simples Tipo 1 e Herpes Simples Tipo 2 (HSV-1 \ HSV-2)----	5
1.2.1 Morfologia e Genoma dos HSVs-----	5
1.2.2 Replicação Viral-----	7
1.2.3 Latência-----	11
1.2.4 Epidemiologia-----	13
1.2.5 Manifestações clínicas e patogênese-----	16
1.2.6 Herpes em pacientes HIV positivos-----	17
1.2.7 Diagnóstico-----	18
1.2.8 Prevenção e Tratamento-----	20
1.3 Herpesvírus Humano Tipo 6 -----	23
1.3.1 Características Gerais-----	23
1.3.2 Morfologia e Genoma-----	23
1.3.3 Replicação Viral e Mecanismos de Latência-----	25
1.3.4 Patogênese e manifestações clínicas-----	27
1.3.5 Epidemiologia-----	28
1.3.6 Diagnóstico e Tratamento-----	29
2 Justificativa-----	31
3 Objetivos-----	32
3.1 Objetivo Geral da Tese-----	32
3.2 Objetivos Específicos-----	32
4 Resultados-----	33

4.1 Artigo I-----	34
4.2 Artigo II-----	39
4.3 Artigo III-----	61
5 Discussão-----	65
6 Conclusão-----	78
7 Perspectivas-----	80
8 Produção Complementar-----	81
9 Referência Bibliográfica-----	82
10 Anexos-----	108

1. INTRODUÇÃO

1.1. Família *Herpesviridae*

1.1.1 Histórico

O primeiro herpesvírus humano (HHV) descrito foi o vírus herpes simplex (simplex) tipo 1 (HSV-1), ou herpesvírus humano tipo 1 (HHV-1), foi primeiramente documentado pelo médico grego Hipócrates de Cós (460/377 a.c.), que o denominou de *herpes* (derivado do grego herpein = rastejar, réptil), e descreveu lesões causadas pelo vírus, como vesículas e ulcerações. Todas estas manifestações caracterizavam a doença *Herpes febrilis*, que foi descrita mais tarde por Heródoto (484/425 a.c.) (McGeoch, Rixon e Davison, 2006). No entanto, somente no século XX, entre 1920 a 1960, foi demonstrado que os isolados virais infectavam uma imensa gama de hospedeiros, como ratos, camundongos, coelhos, cobaias e macacos (Miranda *et al.*, 2002). Em 1968, Nahmias e Dowdle classificaram os herpesvírus no gênero *simplex* e, com base em diferenças imunológicas, epidemiológicas e clínicas, propuseram sua divisão em duas espécies, denominando-as de vírus herpes simplex tipo 1 e herpes simplex tipo 2 (HSV-1 e HSV-2, respectivamente). Em 1986, Salahuddin e colaboradores isolaram herpesvírus humano tipo 6 (HHV-6) em células mononucleares de sangue periférico em pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência adquirida (VIH, do inglês HIV-Human Immunodeficiency Virus) e foi designado vírus linfotrópico B humano, devido a seu tropismo por células B (HBLV) (Vírus linfotrópico de células B) (Salahuddin *et al.*, 1986). Posteriormente, estudos de microscopia demonstraram que as partículas eram semelhantes a de membros descritos na família *Herpesviridae* e que na infecção aguda o maior alvo desses vírus eram as células T, justificando assim a classificação do mesmo como herpesvírus humano tipo 6 (Pellett, Black e Yamamoto, 1992; Ward, 2005). Segundo o ICVT (International Committee for Viruses Taxonomy) a classificação das espécies dos herpesvírus é realizada pela sua distinção epidemiológica, biológica ou genômica independente da sua replicação (ICTV).

1.1.2 Subfamílias

A família *Herpesviridae* é uma família de vírus com genoma constituído de DNA altamente disseminados entre os animais. Os herpesvírus evoluíram há 400 milhões de anos (Weir, 1998; McGeoch, Dolan e Ralph, 2000). A taxa de substituição nucleotídica durante a divergência evolutiva dos herpes simples tipo 1 é herpes simples tipo 2 e estimada em 3×10^{-8} por ano, sendo pelo menos 20 vezes maior do que os genomas dos mamíferos (Dolan *et al.*, 1998; Markine-Goriaynoff *et al.*, 2003).

Os membros da família *Herpesviridae* possuem algumas características biológicas importantes, tais como: uma larga gama de enzimas envolvidas no metabolismo do ácido nucleico, síntese do DNA, processamento de proteínas, produção de uma progênie viral, em geral acompanhada da destruição da célula infectada, e a geração de mecanismos de latência, com mecanismos de persistência viral no hospedeiro (Roizman, Knipe e Whitley, 2013). Os herpesvírus são definidos basicamente com base na estrutura do vírion. Um típico herpesvírus consiste em uma fita dupla de DNA (variando de 124-295 kb), com capsídeo icosaédrico contendo aproximadamente 161 capsômeros e um envelope contendo glicoproteínas virais (Roizman, Knipe e Whitley, 2013).

Originalmente pertencentes a uma única família, com o estudo da disponibilidade de recombinações e a descoberta das sequências nucleotídicas, pode-se estabelecer uma nova taxonomia em nível de ordem conhecida como *Herpesvirales* (Davison *et al.*, 2009). Nessa ordem são incluídas três famílias, a família *Alloherpesviridae* que inclui espécies que infectam peixes e anfíbios, a família *Malacoherpesviridae* que inclui espécies que infectam bivalves e a família *Herpesviridae* que inclui espécies que infectam répteis, pássaros e mamíferos (Pellett e Roizman, 2013; Roizman, Knipe e Whitley, 2013).

A família *Herpesviridae* pode ser subdividida em três subfamílias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gamaherpesvirinae*. No total são nove membros representados nessas subfamílias (Pellett e Roizman, 2013).

A subfamília *Alphaherpesvirinae* tem como principais características um grande número de hospedeiros, a eficiente e rápida reprodução do ciclo celular e a capacidade de estabelecer infecção latente nos nervos sensoriais (Roizman e Whitley, 2001). Dentre

os membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* estão o Herpes Simples Tipo 1 (HSV-1) e Tipo 2 (HSV-2) e vírus da Varicela Zoster (VZV).

A subfamília *Betaherpesvirinae* tem como principais características serem citomegálicos (aumento das células infectadas), ter um ciclo replicativo longo, crescimento lento e infecções latentes nas glândulas secretórias e nos rins. Nessa subfamília encontramos o citomegalovírus (CMV), herpesvírus humano 6A, herpesvírus humano 6B e herpesvirus humano 7 (HHV6A, HHV6B, HHV7) (Davison, 2010).

A subfamília *Gamaherpesvirinae* tem como principais características causar infecções latentes nas células linfóides, podendo causar latência somente em alguns tipos celulares epitelióides ou fibroblásticos. Nessa subfamília encontramos o vírus Epstein-Barr (EBV) e o herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8) ou vírus do Sarcoma de Kaposi (KSHV) (Gilbert, Bestman-Smith e Boivin, 2002) .

A filogenia dos membros da família *Herpesviridae* está diretamente relacionada à relação com hospedeiro, suportada pelo grau de co-evolução entre vírus e hospedeiro (Mcgeoch *et al.*, 1995). Apesar de possuírem um número considerável de genes intrínsecos aos três grupos, acredita-se que pelo fato dos membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* incluírem viroses de pássaros e répteis, estes possuem linhagens mais diversas quando comparados aos membros da subfamília *Betaherpesvirinae* e *Gamaherpesvirinae* (Mcgeoch e Gatherer, 2005).

Inúmeros mecanismos ocorreram no desenvolvimento e divergências da família *Herpesviridae* que explicam a alta complexidade entre os membros da família, tais como: acumulação de substituições nucleotídicas, pequenas deleções e inserções, erros da DNA polimerase, troca gradual de nucleotídeos com conseqüente mudança no código de leitura, entre outras mudanças que contribuem para caracterização genômica entre os diferentes herpesvírus (Mcgeoch, Rixon e Davison, 2006).

A figura 1.1 mostra a relação filogenética existente entre os diferentes membros destas subfamílias.

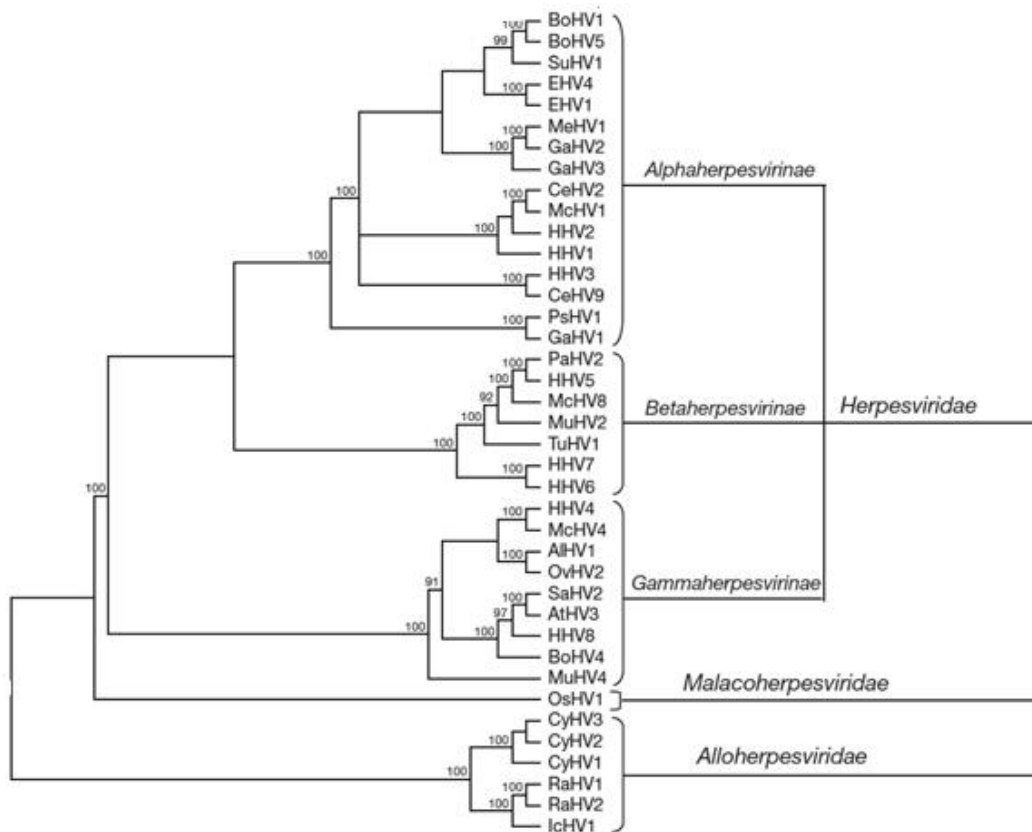


Figura 1.1- Relação filogenética entre os membros da ordem *Herpesvirales*(Michel *et al.*, 2010).

Principais membros estudados da Família *Herpesviridae*

1.2 Vírus Herpes Simples Tipo 1 e Herpes Simples Tipo 2 (HSV-1 \ HSV-2)

1.2.1 Morfologia e Genoma dos HSVs

O HSV (HSV-1/HSV-2) é um vírus envelopado, contendo no seu envelope lipídico glicoproteínas virais (Figura 1.2). A função de algumas dessas glicoproteínas está descrita no quadro 1.1. O capsídeo icosaédrico que consiste de 162 capsômeros, mede cerca de 100 nm (Kimberlin, 2003). O nucleocapsídeo é circundado por um tegumento proteico, que é composto pelas proteínas VHS e α -TIF, e principalmente pela proteína ICP5 (Mettenleiter, 2004).

O genoma do HSV (HSV-1 e HSV-2) é formado por uma molécula de DNA dupla fita, linear, com cerca de 150 kb e 155 kb (HSV-1 e HSV-2, respectivamente) (Figura 1.3). O genoma é constituído por dois componentes que são formados por sequências únicas (U) covalentemente ligadas chamadas L (Long) e S (Short). Estas sequências são denominadas UL e US e estão relacionadas ao tamanho do fragmento genômico (Sheldrick e Berthelot, 1975; Wadsworth, Jacob e Roizman, 1975). No genoma viral existem sequências para codificação de cerca de 70 proteínas. Durante a infecção ocorre a circularização do DNA viral no núcleo da célula hospedeira (Whitley, 1996; Roizman e Sears, 1996). Uma característica interessante do genoma dos HHVs é o arranjo das sequências.

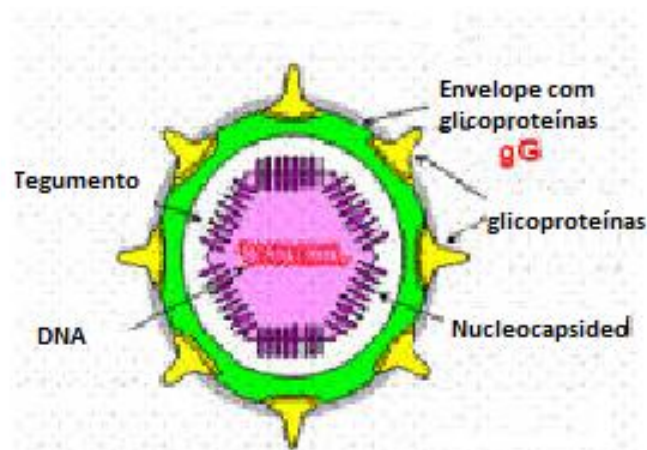


Figura 1.2: Esquema representativo da estrutura do HSV (Canavan T e Chrenek A, 2007)

Quadro 1.1 : Glicoproteínas do HSV's (adaptado de Wigg et al, 2008)

GLICOPROTEÍNAS	FUNÇÕES
gB	Interação com GAGs, adsorção e Fusão; formação de sincício
gC	Interação com GAGs (glicosaminoglicanos)
gD	Adsorção em receptores diferentes dos GAGs, espalhamento célula-célula; não forma sincício
gE	Receptor para Fc de Imunoglobulinas
gG	É maior no HSV-2, usada em testes sorológicos de ELISA, para diferenciar a infecção de HSV-1 e HSV-2.
gI	Forma complexo com gE; envolvido com o espalhamento pelas junções intercelulares
gH	Forma complexo com gL; está envolvido na fusão do envelope viral com a membrana plasmática
gL	Forma complexo com gH e provavelmente regula a atividade de fusão de gH.

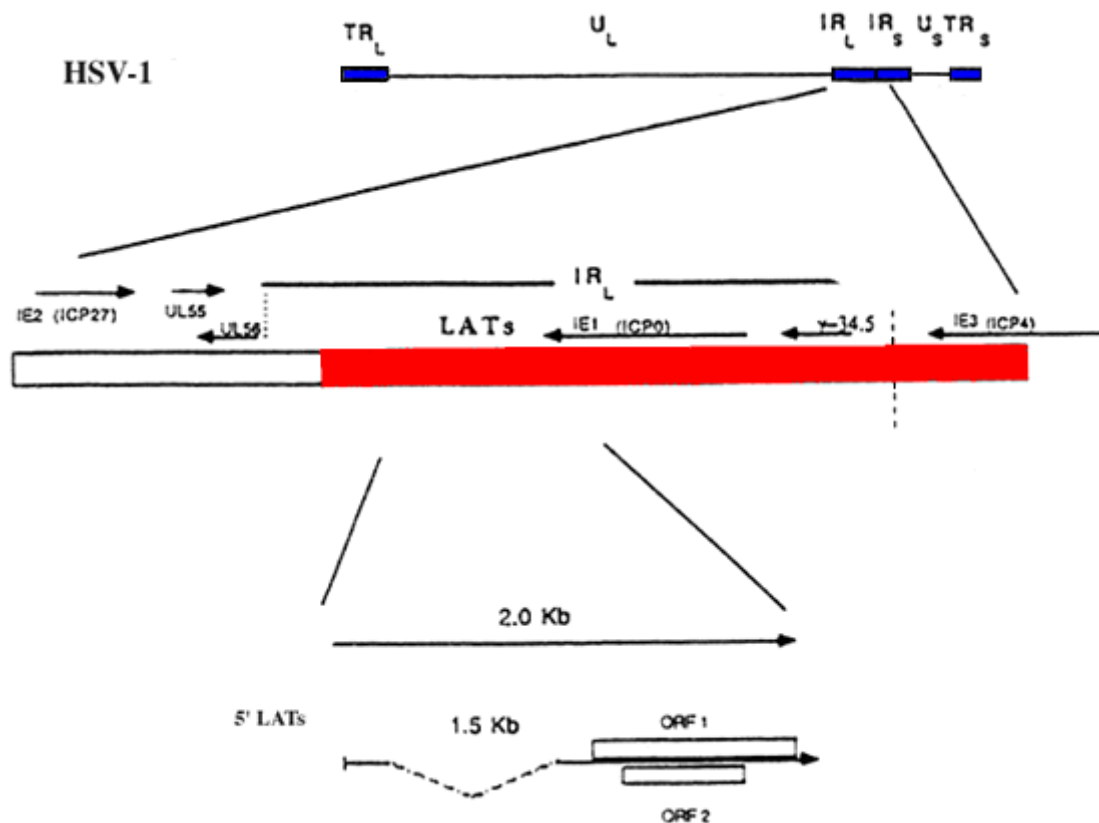


Figura 1.3: Genoma do HSV. Disponível em <http://bioinformatica.uab.es> (Acesso em 30 de dezembro de 2014).

1.2.2 Replicação Viral

A replicação viral se inicia com a ligação do vírus aos receptores celulares. A primeira etapa da infecção viral inicia-se no momento em que ocorre a adsorção do HSV na célula hospedeira. As cadeias de glicosaminoglicanas (GAGs) na superfície celular interagem com as glicoproteínas virais B e C do envelope do HSV-1. Nesta etapa, ocorre a interação das glicoproteínas virais gC e gB com proteoglicanos celulares, principalmente com moléculas de heparan sulfato. O próximo passo é a interação da glicoproteína gD com os receptores e a fusão entre o envelope e a membrana celular pelo heterodímero gH/gL e gB. Após este processo, a glicoproteína gD pode interagir com três tipos distintos de receptores secundários responsáveis pela entrada do vírus na célula hospedeira: o mediador da entrada de herpesvírus (HVEM – Mediador de entrada dos Herpesvírus) que é um membro da extensa família do fator de necrose tumoral (TNF) expresso em diferentes tipos de células e tecidos, incluindo células T e B; os

receptores da família da Nectina -1 e Nectina -2, isoformas dos receptores da Nectina capazes de permitir a entrada do HSV-1 e um isoforma modificada da molécula de heparan sulfato em sítios específicos pela ação da enzima 3-O – sulfotransferase heparan sulfato (3-OS HS) (Spear, Eisenberg e Cohen, 2000; Spear e Longnecker, 2003; Spear, 2004; Spear *et al.*, 2006; Campadelli-Fiume *et al.*, 2012) (Figura 1.4). O nucleocapsídeo desenvolvido segue para o núcleo da célula, sendo que proteínas do tegumento parecem estar associadas com o capsídeo. O nucleocapsídeo alcança os poros do núcleo sendo o DNA viral carregado para o nucleoplasma (Garner, 2003). A proteína do tegumento denominada VHS (virus host shutoff) permanece no citoplasma e interage com uma proteína celular para degradar o RNAm celular logo após a entrada do vírus na célula. A proteína do tegumento α -TIF (VP16) é liberada junto com o DNA viral regulando a expressão dos genes α (Whitley e Roizman, 2001). O gene UL36 codifica uma proteína do tegumento (VP1-2) que está estritamente ligada ao tegumento. Alguns estudos têm demonstrado que a proteína UL36 é requerida no processo de clivagem permitindo assim a liberação do DNA viral (Jovasevic, Liang e Roizman, 2008).

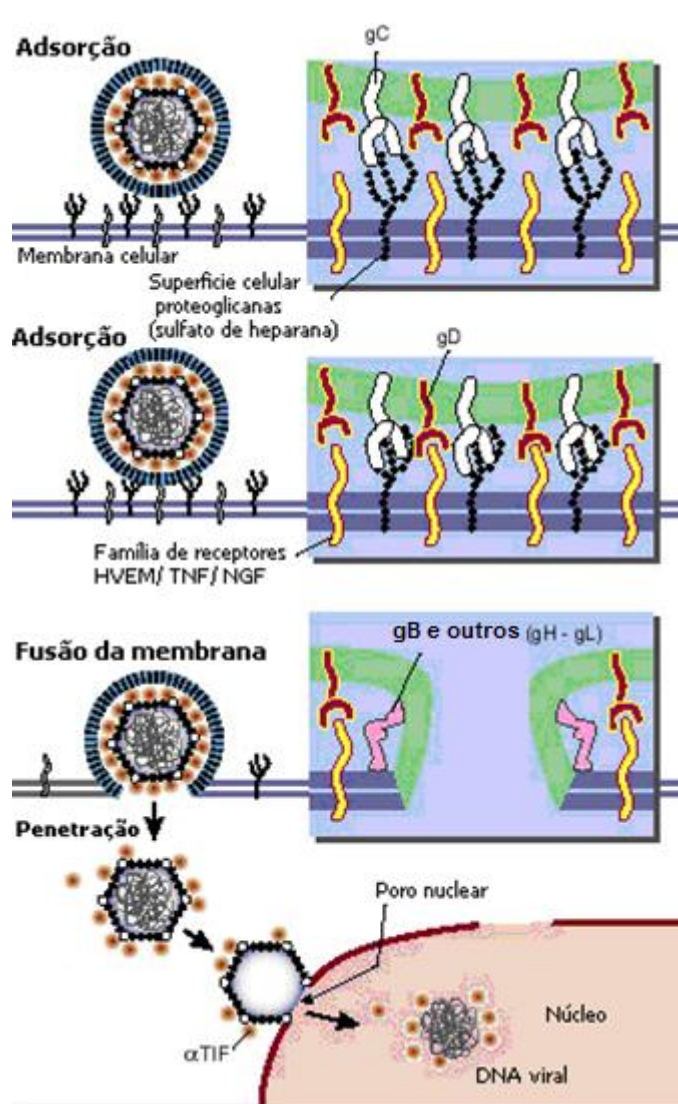


Figura 1.4: Entrada do HSV na célula hospedeira. gC-Glicoproteína C; gD-Glicoproteína D; gB- Glicoproteína B; HVEM- Mediador da entrada de herpesvírus; TNF- Fator de necrose tumoral; NGF- Fator de crescimento do nervo; α -TIF-Fator indutor de transcrição de proteínas de fase α (Adaptado de Wagner, 2003).

O ciclo lítico dos HSVs envolve a expressão de três conjuntos de genes virais: imediatamente iniciais ou de fase α , iniciais ou de fase β e fase γ ou tardios (Hancock, Corcoran e Smiley, 2006). A primeira delas (fase α), que tem início no momento em que a proteína do tegumento viral α -TIF, associada aos fatores nucleares OCT-1 e HCF, se liga ao TATA Box no genoma viral, formando o complexo de pré-iniciação viral. Esta fase é responsável pela produção de genes necessários a produção da progênie viral (Pellett e Roizman, 2013; Roizman, Knipe e Whitley, 2013).

Nesta fase são expressos seis genes: gene ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 e US1.5 (Roizman, Knipe e Whitley, 2013). Os genes ICP4 (Dixon e Schaffer, 1980;

Carrozza e Deluca, 1996) e ICP27 (Sacks *et al.*, 1985; Mccarthy, McMahan e Schaffer, 1989) são necessários para o crescimento do vírus em cultura de tecidos.

A proteína ICP4, geralmente, reprime a expressão dos genes imediatamente iniciais (Roberts *et al.*, 1988; Gu e Deluca, 1994; Carrozza e Deluca, 1996) e ativa a expressão dos genes E ou L através da interação com fatores da RNA polimerase II (Smith *et al.*, 1993; Gu e Deluca, 1994). A proteína ICP27 contribui para diminuição de genes celulares através da inibição do processamento do RNAm (Sandri-Goldin e Mendoza, 1992; Lindberg e Kreivi, 2002). A proteína ICP47 impede o transporte de peptídeos antigênicos para o retículo endoplasmático (Hill *et al.*, 1995), sendo crucial para a neurovirulência, uma vez que inibe a resposta da célula T do tipo CD8+. A ICP0 atua como um transativador de diversos genes, estimulando a expressão de genes do HSV pertencentes a todas as três classes temporais (fases α , β e γ) durante a infecção lítica (Hancock, Corcoran e Smiley, 2006). A proteína ICP22 não é essencial para a replicação do HSV-1 em cultura, mas é necessária a expressão eficiente de genes de fase α , assim como um subconjunto de genes da fase γ (O 'Toole *et al.*, 2003).

Na fase β ou fase inicial são produzidas enzimas e proteínas envolvidas na replicação e na síntese do DNA. Destacam-se a timidina quinase viral (TK) e a DNA polimerase viral (UL30) (Gong *et al.*, 2002) (Roizman, Knipe e Whitley, 2013). A fase γ , ou tardia, se caracteriza pela produção de proteínas estruturais do vírion, como as presentes no tegumento e no envelope, assim com a montagem da partícula viral (Roizman, 1996; Roizman e Sears, 1996; Whitley, 1996; Boehmer e Lehman, 1997). Após a montagem das partículas no núcleo da célula hospedeira, estas são envelopadas, sendo esta etapa bastante complexa e controversa, tendo pelo menos três caminhos. A posterior fusão do envelope viral com a membrana nuclear externa possibilita que as partículas virais sejam liberadas do núcleo da célula hospedeira, gerando um acúmulo de capsídeos sem envelope no citoplasma. O capsídeo é re-envelopado por vesículas derivadas do complexo de Golgi. Esta última etapa pode ser mediada por interações entre proteínas do tegumento viral e porções citoplasmáticas de glicoproteínas virais, as quais já estariam inseridas nas vesículas derivadas do complexo de Golgi (Melancon, Foster e Kousoulas, 2004). Em um segundo modelo, o nucleocapsídeo é envelopado na membrana nuclear interna (Epstein, 1962) e o terceiro modelo o envelopamento ocorreria através da formação de uma poro nuclear (Leuzinger *et al.*, 2005) (figura 1.5).

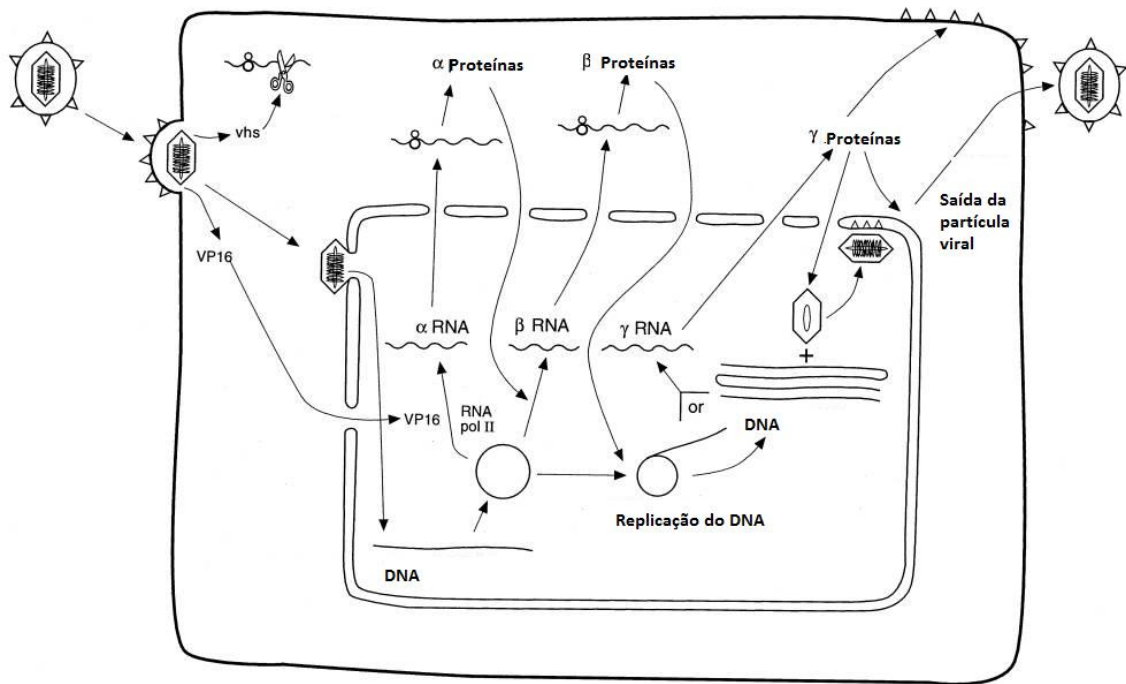


Figura 1.5 - Replicação viral. Fase α , Fase β e Fase γ (Figura adaptada de Roizman, 1996).

1.2.3 Latência

A habilidade de latência dos HSVs é um importante aspecto biológico para manutenção e disponibilidade do vírus no hospedeiro (Roizman, Knipe e Whitley, 2013). Após a infecção e replicação ativa nas mucosas o vírus é conduzido por transporte axonal retrógrado para os corpos das células nervosas, resultando muito frequentemente em uma infecção latente nestes neurônios (Quinn, Dalziel e Nash, 2000).

Em geral, nesta infecção ocorre uma abundante expressão de genes virais que não são requeridos na infecção ativa, mas são produzidos na fase de latência conhecidos como transcritos associados a latência (LAT's). Postula-se que estes transcritos desempenham vários papéis na latência e esta fase é também a fonte de miRNAs que podem também modular a infecção (Garber, Schaffer e Knipe, 1997; Umbach *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2014). A latência do HSV ocorre tipicamente nos gânglios trigêmeos e dorsais, e a reativação da infecção ocorre geralmente por diversos estímulos como estresse e imunossupressão, resultando novamente na reativação do vírus latente (Perng e Jones, 2010). Estes vírus, então, retornam pelos axônios, produzindo um novo ciclo de

infecção produtiva no sítio da infecção inicial ou próximo deste sítio, podendo resultar no reaparecimento da doença (Quinn, Dalziel e Nash, 2000; Kimberlin, 2003; Kimberlin e Whitley, 2005). Durante o período de latência o HSV associa-se a histonas, formando um DNA episossomal. Durante o período de latência, somente genes LATs são produzidos de forma abundante e também miRNAs que auxiliam a manter a fase de latência (Tang *et al.*, 2011). Além disso, a latência ocorre principalmente no sistema nervoso onde há uma maior expressão do fator nuclear OCT-2 em relação à isoforma OCT-1, que é expressa principalmente em outros tecidos. Na maioria dos tecidos a proteína do tegumento viral α -TIF interage preferencialmente com a proteína OCT-1. Esta ligação é estabilizada pelo fator HCF proporcionando a formação do complexo de pré-iniciação junto ao TATA Box do genoma do HSV, iniciando a transcrição de genes de fase alfa, com consequente infecção produtiva (Preston, 2000) (Figura 1.6).

A reativação da latência ocorre quando os níveis transcricionais dos genes LAT diminuem, e os principais genes de fase lítica aumentam (Kosz-Vnenchak *et al.*, 1993; Du, Zhou e Roizman, 2011). Na fase de latência, os genes LAT são produzidos em abundância, porém a infecção lítica do HSV-1 pode ser reativada em qualquer momento dependendo de diversos fatores do hospedeiro, muitas vezes esta reativação inicial não é visível ocorrendo a mesma de forma assintomática ou conduzindo lesões aparentes no hospedeiro (Bloom, Giordani e Kwiatkowski, 2010; Proença *et al.*, 2011; Roizman, 2011)

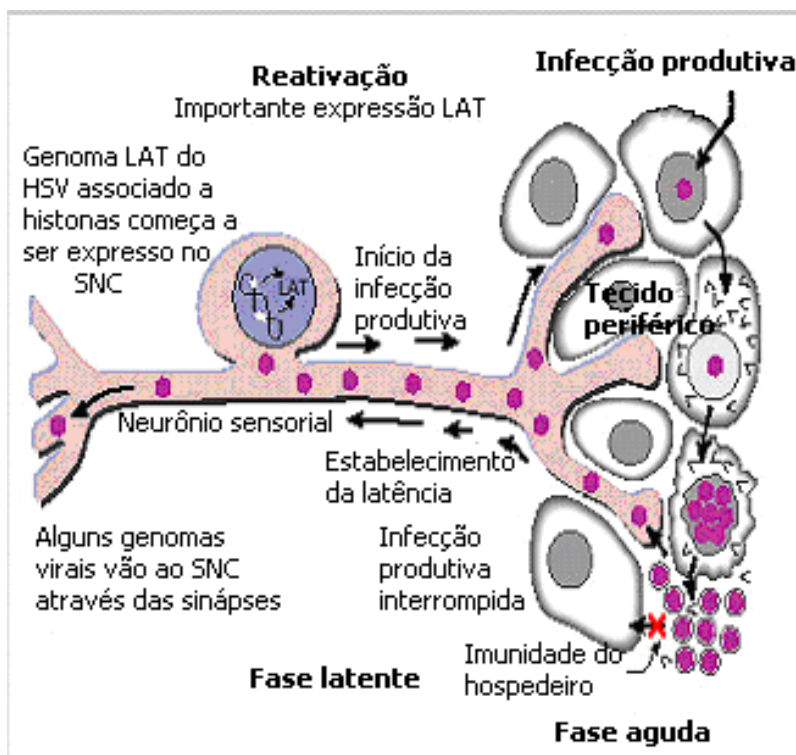


Figura 1.6: Latência e reativação do HSV-1 (Adaptado de Wagner, 2003).

1.2.4 Epidemiologia

O HSV-1 é um vírus prevalente em humanos em todo o mundo, e a infecção causada por esse agente ocorre mais frequentemente em crianças e adolescente (Schubert *et al.*, 2014). O HSV-1 está geralmente associado a exposição oral direta, mas diversos estudos têm demonstrado a infecção genital por este (Löwhagen, Tunbäck e Bergström, 2002; Mertz, Rosenthal e Stanberry, 2003). O HSV-2 é mais prevalente em adultos e adolescentes sexualmente ativos (Schomogyi, Wald e Corey, 1998; Xu *et al.*, 2006). Em muitas regiões geográficas a prevalência da infecção por HSV-1 é maior que a prevalência da infecção por HSV-2 (Chayavichitsilp *et al.*, 2009).

Muitos adultos são infectados com HSV, mas o sorotipo, gravidade, sintomas e modo de transmissão variam com a idade. Crianças possuem a infecção primária orolabial por HSV por volta dos 5 anos de idade, com a taxa de infecção variando entre 33% na população de baixo nível socioeconômico e 20% na população de elevado nível socioeconômico (Fatahzadeh e Schwartz, 2007). Globalmente, a prevalência do HSV-1 aumenta consideravelmente com a idade variando entre 40% até os 15 anos de idade e 60% a 90% a partir dos 21 anos (Smith e Robinson, 2002). O HSV-2 é uma das doenças

sexualmente transmissíveis mais comuns em todo o mundo com estimativas globais de 536 milhões de pessoas infectadas (Looker, Garnett e Schmid, 2008).

Com relação à epidemiologia molecular dos herpesvírus, a diversidade genética de cepas clínicas de HSV-1 e HSV-2 vem sendo caracterizadas nas últimas décadas (Norberg, 2010). Estudos têm demonstrado a presença de diferentes métodos de genotipagem para a caracterização dos genótipos de HSV-1, tais como a técnica de RFLP (polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição) e o sequenciamento nucleotídico (Norberg, 2010). Estudo de Sakaoka e colaboradores em 1985, demonstraram a aplicação da técnica de RFPL em isolados clínicos de HSV-1 do Japão resultando na estabilidade de 8 subtipos designados de A-H, sendo três subtipos principais A, C e H, na maioria das amostras analisadas (Sakaoka *et al.*, 1985). Diversos estudos utilizam frequentemente a técnica de RFPL para a investigação do genótipo de HSV-1 circulante, assim como a associação entre o genótipo circulante e infecções recorrentes (Umene e Kawana, 2000; Umene *et al.*, 2007), ceratoconjuntivite herpética (Umene *et al.*, 2003), eczema herpético (Umene *et al.*, 1996), estudos epidemiológicos (Buchman *et al.*, 1978; Haugen *et al.*, 1993) e estudos da distribuição geográfica dos genótipos de HSV-1 (Umene e Sakaoka, 1997).

Estudos baseados na comparação e análise filogenética de diversas regiões genômicas do HSV-1 revelaram informações importantes sobre a relação evolutiva de diferentes cepas circulantes. Estudos com 105 isolados de HSV-1 sobre a variabilidade do gene US4 em amostras clínicas demonstraram a presença de duas principais variantes, das quais possuíam quatro isolados que apresentaram recombinações. Estudos anteriores sobre os genótipos circulantes do HSV-1 em amostras clínicas têm demonstrado a presença de três clados distintos denominados de genótipo A, genótipo B e genótipo C, baseados no sequenciamento dos genes US4, US7 e US8 que codificam as glicoproteínas gG, gI e gE, respectivamente (Bowden *et al.*, 2004; Norberg *et al.*, 2004; Norberg *et al.*, 2006; Duan *et al.*, 2008; Schmidt-Chanasit *et al.*, 2009). Estudos mais recentes realizados através do sequenciamento nucleotídico completo de cepas de HSV-1 demonstraram a presença de clados separados por região geográfica (Kolb, Ané e Brandt, 2013 e Szpara *et al.*, 2014)

O HSV-2 é um dos alfa herpesvírus menos investigados com relação a variabilidade genética e evolutiva dos isolados clínicos (Norberg, 2010). Alguns

poucos estudos baseados na técnica de RFLP têm demonstrado a divergência entre os isolados. Um dos primeiros estudos baseados na divergência entre os diferentes isolados clínicos baseados na técnica de RFLP demonstraram uma significativa separação geográfica entre amostras do Japão e da Suécia sugerindo uma significativa separação geográfica através das amostras que apresentaram diferentes sítios de clivagem para cada país (Sakaoka et al., 1987). Estudo mais recentes baseado no sequenciamento nucleotídico sobre a filogenia das cepas circulantes de HSV-2 em amostras clínicas da Europa demonstram a presença de dois clados denominados de A e B, baseados na análise dos genes US4 e UL7 que codificam para as glicoproteínas gG e gB do HSV-2 (Schmidt-Chanasit *et al.*, 2010) No mundo, poucos dados foram publicados sobre a epidemiologia molecular dos herpesvírus, e até o momento não existem dados sobre os genótipos circulantes no território Brasileiro. (Figura 1.7).

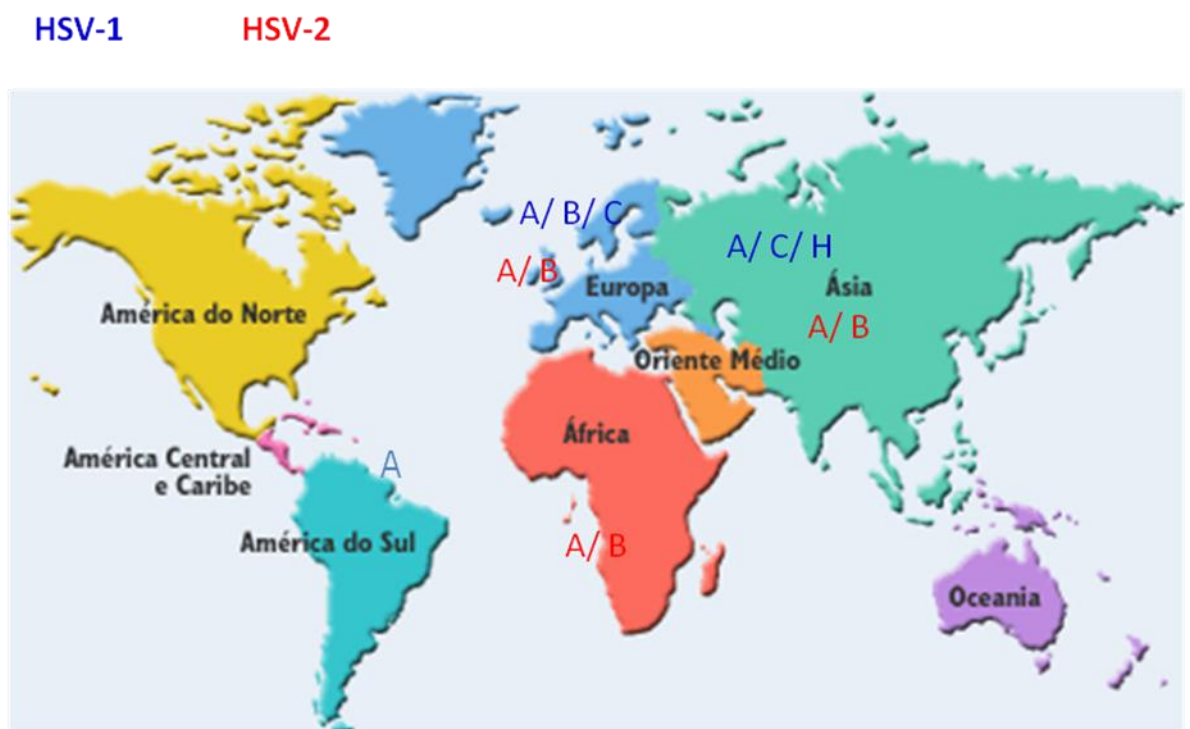


Figura 1.7: Distribuição Mundial dos genótipos de Herpes Simplex Tipo 1 (azul) e Herpes Simplex Tipo 2 (vermelho) (Modificado de <http://www.coladaweb.com/mapas/mapa-dos-continentes>). Acesso em 08 de agosto de 2014.

1.2.5 Manifestações clínicas e patogênese

A transmissão do HSV depende do contato do indivíduo soronegativo com o indivíduo positivo para HSV que esteja excretando o mesmo (Ministério da Saúde, 2014). Em geral, a replicação primária ocorre nas mucosas, sendo a porta de entrada do vírus no hospedeiro resultando em uma infecção no gânglio sensorial onde o vírus é transportado para a raiz do gânglio dorsal (Bastian *et al.*, 1972; Baringer e Swoveland, 1973). A transmissão do HSV ocorre quando a mucosa ou pele com algum tipo de abrasão entra em contato direto com secreções que contenham o vírus, podendo causar lesões mucocutâneas, encefalite em pacientes imunocomprometidos e neonatos, e ceratoconjuntivite (Corey e Spear, 1986; Whitley, 2002; Brady e Bernstein, 2004). A lesão orolabial recorrente causada pelo HSV-1 tem como sinais uma vermelhidão em torno dos lábios e pode ser precedida por “*formigamento*” ou queimação local (Whitley, 2002).

As manifestações clínicas da infecção do HSV-1 são variáveis e dependem do método de transmissão, idade e imunocompetência do hospedeiro. O HSV-1 infecta a mucosa oral e provoca a maioria das formas de herpes não genital, embora também possa infectar a mucosa genital em humanos. Muitos dos quadros infecciosos da infância e da adolescência erroneamente atribuídos a outros vírus e infecções bacterianas da orofaringe, são, na verdade, infecções herpéticas. Até 95% dos pacientes expostos primariamente ao HSV não apresentam sintomas clinicamente evidentes suficiente para plena caracterização do quadro da infecção (Lupi *et al.*, 2000). O quadro clássico desta infecção é caracterizado por cefaléia, febre, mialgias e adinamia. Em 24 horas surgem pápulas eritomas acompanhadas por dor, ardor e prurido (Lupi *et al.*, 1995) (Figura 1.8). Os quadros de infecção grave ocorrem em pacientes imunodeprimidos, especialmente quando a carga viral é elevada, podendo apresentar manifestações mais graves e duradouras (Schirren *et al.*, 1995).

A maioria das infecções por HSV-2 são adquiridas de pessoas sem história clínica de herpes genital (Mertz, 2008). Assim, o risco de transmissão sexual não se correlaciona com o reconhecimento de sinais e sintomas de HSV-2 clínicos, mas muito provavelmente se correlaciona com a transmissão viral assintomática (Schiffer *et al.*, 2009). A maioria das lesões causadas por HSV-2 se desenvolve na mucosa genital (Figura 1.8). O HSV também é facilmente transmitido pela saliva, podendo ser estável

no hospedeiro por curtos períodos de tempo, permitindo a transmissão deste pelo contato direto com o vírus. O HSV também pode ser transmitido por meio de gotículas respiratórias ou através da exposição mucocutânea em indivíduos assintomáticos (Chayavichitsilp *et al.*, 2009).



Figura 1.8: Manifestações clínicas causadas por HSV-1 e HSV-2 (Pinheiro, 2015).

1.2.6 Herpes em pacientes HIV positivos

A infecção pelo HIV é caracterizada por uma ativação crônica do sistema imune e uma inflamação sistêmica que não é totalmente revertida com a introdução da terapia antiretroviral (TARV) (Dolan *et al.*, 2005; Yi *et al.*, 2013). Atualmente acredita-se que 35 milhões de pessoas vivem com HIV/AIDS em todo o mundo (OMS, 2013) e cerca de 75% de pessoas infectadas com o HIV vivem com algum tipo de herpesvírose (Palella *et al.*, 1998; Schwartz, 2004; Springer e Weinberg, 2004; Weiss, 2004; Leidner e Aboulafia, 2005). No Brasil, dados do departamento de DSTs, AIDS e Hepatites Virais mostraram aproximadamente 757 042 casos reportados de HIV/AIDS de 1980 até 2014 (AIDS-GOV, 2014). A detecção do HSV ocorre mais freqüentemente em pacientes infectados pelo HIV em comparação com indivíduos infectados apenas pelo HSV (Strick, Wald e Celum, 2006; Nagot *et al.*, 2007; Baeten *et al.*, 2008; Mayaud *et al.*, 2008; Van De Perre *et al.*, 2008).

O aumento da utilização de terapia antiviral aumenta a incidência de infecções oportunistas de doenças causadas por HHVs (Miralles *et al.*, 1998; Clifford *et al.*, 1999; Antinori *et al.*, 2003). Estima-se que dois terços dos indivíduos que tenham contraído o HIV em todo o mundo estão co-infectados com HSV-1/2, devido as vias semelhantes de infecção (Baeten *et al.*, 2008; Chentoufi *et al.*, 2012; Dervillez *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012), sendo o HSV-2 uma das principais fontes de infecção para indivíduos HIV +.

Nesses indivíduos a co-infecção fica em torno de 52%-95% (Paz-Bailey *et al.*, 2007; Romanowski *et al.*, 2009). A infecção pelo HIV facilita a reativação do HSV-2 (Rebbapragada *et al.*, 2007), que por sua vez desencadeia aumento da ativação imune (Zhu *et al.*, 2009).

Ainda não se sabe se o uso da terapia antiviral para HIV altera a remeergência da habilidade de latência ou a habilidade de produzir manifestações clínicas do HSV-1, porém, já se sabe que a infecção do HSV em pacientes co-infectados com HIV aumenta significativamente a gravidade da doença (Wood e Harrington, 2005; Bower, Palmieri e Dhillon, 2006).

1.2.7 Diagnóstico

Diferentes métodos diagnósticos, atualmente estão disponíveis para identificar a infecção pelo HSVs, variando de métodos mais modernos a métodos tradicionais. O método clínico atualmente utilizado é o reconhecimento das vesículas características destas viroses. As vesículas são agrupadas, eritematosas, apresentando pápulas crostosas e placas em 1 a 3 dias. O método mais tradicional utilizado para diagnóstico do HSV ou VZV é o isolamento viral, porém o isolamento viral requer que o material seja coletado a fresco, com o vírus ainda viável (Storch, 2001). O maior problema desta técnica é principalmente o longo tempo para a detecção do vírus, com resultados variando entre 7 a 15 dias (Kimberlin, 2004).

O advento dos testes sorológicos HSV tipo específicos facilitou a identificação do HSV. Os testes sorológicos inicialmente disponíveis eram baseados em preparações de antígeno bruto, não sendo confiáveis como uma ferramenta de diagnóstico para identificação da infecção com o HSV-1 ou HSV-2 (Ashley *et al.*, 1991). Apesar do alto grau de reatividade sorológica cruzada entre o HSV-1 e o HSV-2, uma glicoproteína do envelope (g), gG, foi identificada como antigenicamente distinta entre as duas viroses (Dolan *et al.*, 1998). Os testes sorológicos gG tipo específicos, portanto, podem diferenciar com precisão infecções por HSV-1 (gG1) ou HSV-2 (gG2) e são cada vez mais utilizados em pesquisas para identificar infecções por esses vírus (Leyland *et al.*, 2009). Testes sorológicos incluindo imunofluorescência, imunoblotting e testes imunoenzimáticos (ELISA, do inglês, enzyme linked immunosorbent assay) vêm sendo

bastante utilizados para a realização do diagnóstico do HSV-1. Estes testes podem detectar anticorpos anti-HSV-1 e anti-HSV-2 (Wald e Ashley-Morrow, 2002).

O teste western blotting gG é considerado excelente para a detecção do HSV e pode discriminar as infecções entre o HSV-1 e o HSV-2, mas este método é demorado e caro, podendo ser de difícil interpretação (Corey *et al.*, 2004). Outro teste gG menos demorado e que pode discriminar entre as infecções por HSV-1 e o HSV-2 incluem testes de ELISA. No entanto, estes ensaios são menos sensíveis do que o western blotting. Apesar disso, os testes de ELISA tipo - específico são altamente precisos para a diagnóstico sorológico principalmente da infecção pelo HSV-2 em populações onde a prevalência da doença é alta (Mark *et al.*, 2007). Estudos recentes têm demonstrado a importância desses testes, principalmente relacionados a programas de prevenção a grupos de riscos, tais como: homossexuais e profissionais do sexo (Da Silva *et al.*, 2014). Entretanto, técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), estão sendo cada vez mais utilizadas e vêm sendo capazes de detectar pequenas quantidades de genoma viral (Schmutzhard *et al.*, 2004). Através da reação de PCR é possível a detecção do DNA do HSV em diferentes amostras clínicas, tais como: lesão orolabial e genital, fluido cérebro espinhal (Kimura *et al.*, 1991; Anderson, Powell e Croxson, 1993; Berrington *et al.*, 2009). Além disso, a reação de PCR permite a detecção do DNA do HSV em amostras de soro durante a infecção primária de pacientes imunocompetentes (Johnston *et al.*, 2008).

Nos últimos anos vêm crescendo a aplicação do ensaio de PCR em tempo real, no diagnóstico da infecção constituindo-se em uma técnica de detecção e quantificação de ácidos nucleicos com alta sensibilidade, rapidez e minimização de contaminações (Bustin e Mueller, 2005). A técnica de PCR em tempo real permite a detecção e quantificação do genoma viral em diferentes espécimes, sendo também bastante utilizada para a avaliação dos efeitos de candidatos a antivirais (Schloss *et al.*, 2009). Diversos estudos têm demonstrado a sensibilidade e rapidez desta técnica para a diferenciação rápida e precisa do HSV-1 e HSV-2 (Baeten *et al.*, 2008; Reil *et al.*, 2008; Weidmann, Armbruster e Hufert, 2008). Esta técnica é principalmente interessante para a detecção do DNA do HSV em amostras de pacientes assintomáticos, mostrando transmissão do HSV de forma inaparente. Estudos recentes têm mostrado através da técnica de PCR em tempo real a presença do genoma do HSV em amostras de saliva de pacientes assintomáticos (Liljeqvist, Tunbäck e Norberg, 2009; Silva, Lopes e Paula,

2014). A maior vantagem da reação de PCR em tempo real para o diagnóstico do HSV é a análise quantitativa das amostras, isto é particularmente importante principalmente para o diagnóstico e tratamento do HSV e VZV em pacientes transplantados e imunossuprimidos (Schmutzhard *et al.*, 2004).

1.2.8 Prevenção e Tratamento

A prevenção da transmissão é o primeiro passo para o controle da infecção pelo HSV. Além disso, alguns cuidados para o controle da infecção incluem uso do preservativo ou uso de métodos de barreira durante a relação sexual para a prevenção da infecção pelo HSV em área genital, evitar contato direto e indireto com lesões mucocutâneas em pacientes com a virose em atividade e abstinência sexual em mulheres grávidas soronegativas com parceiros soropositivos para a infecção primária. Além disso, múltiplos fatores como, estresse, exposição ao sol, imunossupressão, febre e traumas podem desencadear a recorrência da infecção pelo HSV (Chayavichitsilp *et al.*, 2009).

Infecções recorrentes por HSV são tratados com sucesso com o aciclovir (ACV), em parte devido ao pré-requisito de conversão de pró-fármaco do ACV para ACV-monofosfato (ACVMP) pela timidina kinase (TK) (Balfour, 1983). O ACV é uma guanina com grupamento ribosil que não apresenta os carbonos 2' e 3' e suas respectivas hidroxilas. Sendo assim, fosforilada pela timidina kinase viral e di e trifosforilado por enzimas celulares. Finalmente, a molécula é captada pela DNA polimerase viral resultando na terminação de cadeia da fita de DNA, pela ausência do 3'-OH (De Clercq, 2004).

No entanto, cepas resistentes ao ACV vêm sendo descritas, principalmente em pacientes imunocomprometidos, seja decorrente de uma co-infecção com outras viroses ou tratamento com corticosteróide após transplante de órgãos (Coen, 1996; Kimberlin e Whitley, 1996). Também têm surgido cepas resistentes em pacientes transplantados (Chayavichitsilp *et al.*, 2009). A resistência ao aciclovir é associada com a mutação de duas enzimas virais envolvidas no mecanismo de ação do aciclovir, que são a timidina kinase (UL23) e a DNA polimerase (UL30) sendo que, em 95% dos casos essa resistência está associada ao gene da timidina kinase. Cepas resistentes ao aciclovir podem ser tratadas com foscarnet ou cidoclovir, porém, estes são mais tóxicos que o aciclovir (Morfin e Thouvenot, 2003).

Embora uma série de antivirais esteja disponível para o tratamento da infecção, o HSV continua a ser altamente prevalente em todo o mundo. Portanto, o desenvolvimento de novos agentes antivirais com diferentes mecanismos de ação é uma questão de extrema urgência (Jin *et al.*, 2014). Uma alternativa viral que vêm sendo estudada nos últimos anos para diminuição e controle da replicação viral do HSV é o uso da técnica de RNA de interferência (RNAi). A habilidade de pequenos RNAs (siRNA-Small Interfering RNA) promoverem um eficiente silenciamento de genes específicos pode constitui uma nova terapia baseada em siRNA (Convertine *et al.*, 2010).

O siRNA vem sendo desenvolvido para diversas viroses como uma nova modalidade terapêutica antiviral (Bhuyan *et al.*, 2004). Dentre as muitas viroses nas quais foram utilizados siRNA contra patógeno humanos *in vitro* estão incluídas as infecções por HIV/AIDS, poliovírus, vírus da hepatite C, vírus da dengue e vírus da hepatite Delta (Adelman *et al.*, 2002; Capodici, Kariko e Weissman, 2002; Gitlin, Karelsky e Andino, 2002; Jiang e Milner, 2002; Mccaffrey *et al.*, 2002; Novina *et al.*, 2002; Chang e Taylor, 2003; Jia e Sun, 2003). Com base na literatura de inúmeros trabalhos sobre a capacidade de o siRNA atuar contra patógenos virais, observa-se que este funciona como um sistema de defesa antiviral, permitindo que a célula hospedeira restrinja a replicação viral em nível pós-transcricional. Apesar do sucesso desta técnica, muito vírus desenvolveram mecanismos de defesa antiviral, codificando proteínas ou moléculas de RNA que funcionam como supressores de silenciamento inibindo diferentes etapas e componentes da via de siRNA e permitindo a replicação viral com sucesso (Bivalkar-Mehla *et al.*, 2011). Os siRNA podem inibir diversos estágios do ciclo replicativo viral (Figura 1.9), atuando em diferentes etapas desde a multiplicação a liberação viral em alvos celulares (Colbere-Garapin *et al.*, 2005). Estudos recentes com siRNA contra HSV-1 têm demonstrado a inibição da expressão do gene e conseqüentemente a inibição da replicação do Herpes Simples Tipo 1 de forma eficiente tanto *in vitro* (Jin *et al.*, 2014; Silva, Lopes e Paula, 2014) como *in vivo* (Li *et al.*, 2014).

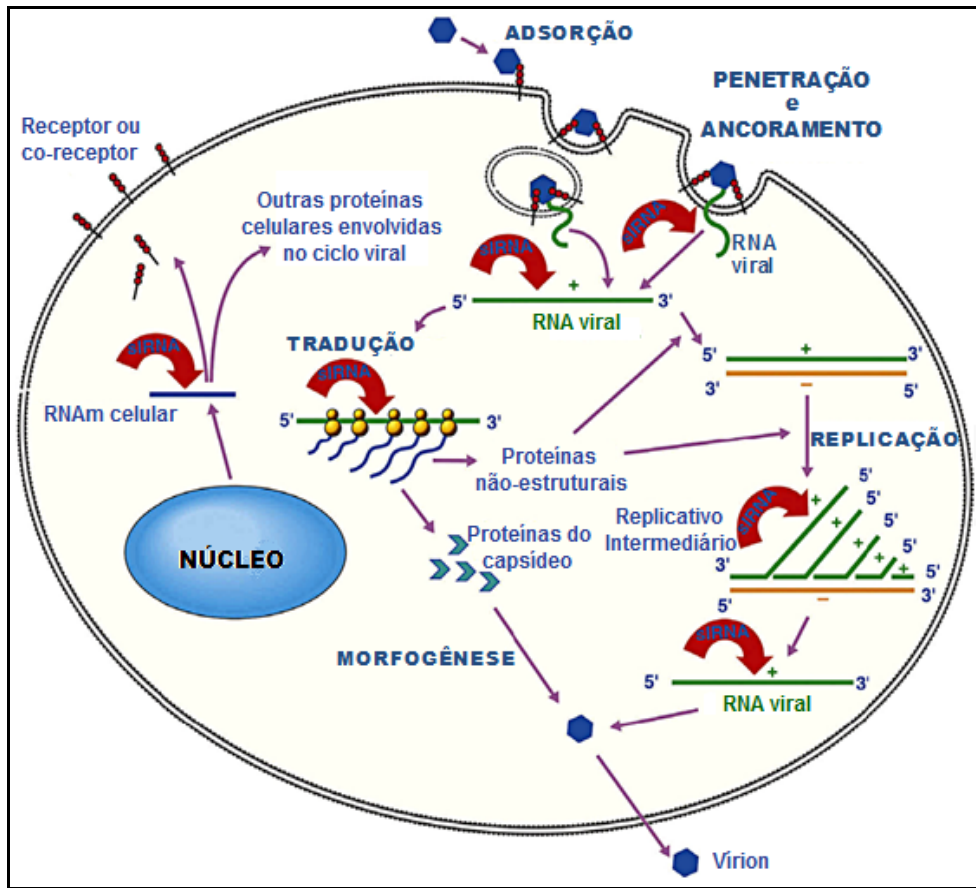


Figura 1.9: Alvos envolvidos no silenciamento por siRNAs durante o ciclo replicativo viral (Colbère-Garapin *et al.*, 2005 Adaptado).

1.3 Herpesvírus Humano Tipo 6 (HHV-6)

1.3.1 Características Gerais

O herpesvírus humano tipo 6 (HHV-6) possui muitas de suas propriedades semelhantes a outros herpesvírus, tais como: estrutura do vírion e características genômicas (Roizman, Knipe e Whitley, 2013). O herpesvírus humano tipo 6 é classificado na subfamília *Betaherpesvirinae*, gênero *Roseolovirus*, sendo um vírus linfotrópico que juntamente com o citomegalovírus humano (HCMV) persistem no hospedeiro podendo gerar doenças na ativação e reativação (Lacoste *et al.*, 2005).

1.3.2 Morfologia e Genoma

A estrutura do genoma viral é constituída de um capsídeo icosaédrico de 90 a 110 nm de diâmetro, com um envelope extracelular de aproximadamente 160 a 200 nm (Biberfeld *et al.*, 1987; Yoshida *et al.*, 1989)(Figura 1.10).

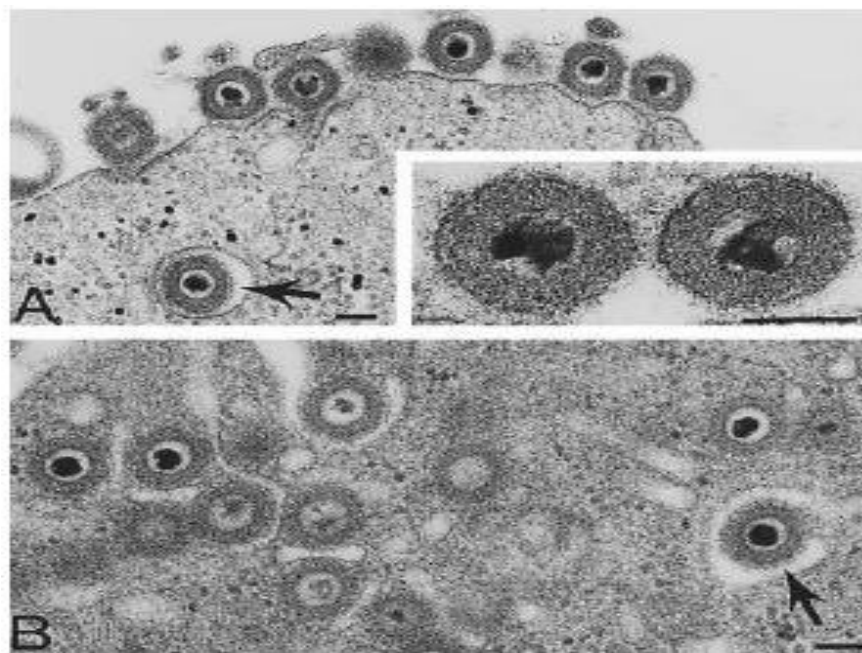


Figura 1.10: Características estrutural do HHV-6B. A- Partícula viral do HHV-6B acumuladas ao longo da membrana plasmática. Em destaque detalhe do vírion. B- Nucleocapsídeos coberto pelo tegumento com HHV-6B no citoplasma e aparentemente nas cisternas do complexo de golgi (Pellett e Dominguez, 2001).

O genoma do HHV-6 apresenta aproximadamente 170 kb, dos quais aproximadamente 144 kb constituem a região central constituída por longas sequências única (U) que contém sequências de leitura aberta conhecidas como ORFs numerada de

U1-U100. Cada ORF termina por elementos de repetição terminal conhecidos como DR (Terminal Direct Repeats) chamados de elementos de repetição terminal direita (DRR) e elementos repetição terminal esquerda (DRL) (Martin *et al.*, 1991; Lindquister *et al.*, 1996), sendo interrompidas por três repetições intermediárias, designadas R1, R2 e R3 (Santos, Wigg e Oliveira, 2008). Esses DRs são necessários para o empacotamento do DNA e a replicação viral e consistem em 25 a 29 pares de bases (bp), possuindo também sequências conservadas conhecidas como pac1 e pac2, assim como repetições de um único hexanucleotídeo (GGGTTA) sendo esta uma sequência característica dos telômeros das células dos vertebrados (Achour *et al.*, 2009; Borenstein e Frenkel, 2009).

Existem duas variantes para HHV-6: HHV-6A e HHV-6B. A cepa do HHV-6A (U1102) tem sido comparada com o HHV-6B (Z29) (Dominguez *et al.*, 1999; Isegawa *et al.*, 1999). Analisando o HHV-6B verificou-se que este possui 119 ORFs codificadas por 97 genes em comparação a 110 ORFs do HHV-6A. A similaridade nucleotídica dos dois vírus é de 90%, sendo as regiões U32 e U77, altamente conservadas e as regiões U86 e U100 apresentando divergências nucleotídicas que variam de 15 a 28% (Dominguez *et al.*, 1999). Outras diferenças genéticas, variações na reatividade com anticorpos monoclonais, tropismo celular e manifestações das doenças diferem essas variantes em distintos *Betaherpesvírus* (Dockrell, 2003) (Figura 1.11).

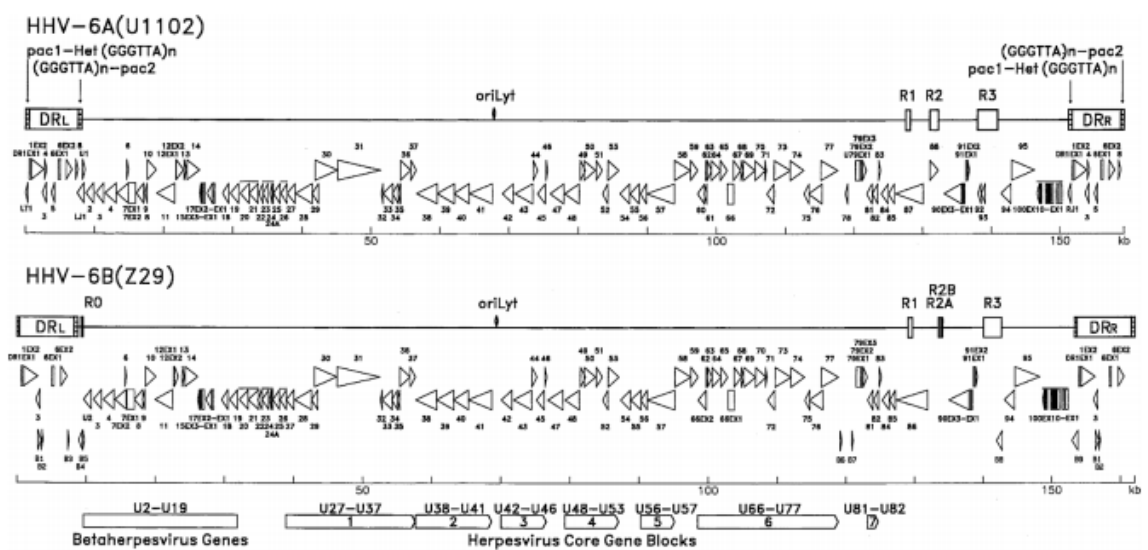


Figura 1. 11: Diagrama demonstrando a estrutura genômica do HHV-6A e HHV-6B (Yamanishi, Mori e Pellett, 2013).

1.3.3 Replicação Viral e mecanismos de latência

Tanto o HHV-6A como o HHV-6B infectam preferencialmente linfócitos TCD4+, e o HHV6 utiliza como receptor celular CD46, que está presente em todas as células nucleadas (Santoro *et al.*, 1999). O HHV-6A inicia a fusão viral sem requerer a síntese de proteínas virais (Mori *et al.*, 2002), porém o HHV-6B não, sendo este um processo dependente da expressão da CD46 (Pedersen *et al.*, 2006).

O complexo de glicoproteínas virais gH-gL do HHV-6 se associa com glicoproteínas do envelope viral denominada gQ1, formando o complexo gH-gL-gQ1 que interage com gQ2, formando o complexo gH-gL-gQ1-gQ2 interagindo com o receptor CD46 (Akkapaiboon *et al.*, 2004). Assim o complexo gH-gL-gQ1-gQ2 viral interage com o receptor celular, junto com outras glicoproteínas para mediar a entrada do vírus a célula (Mori *et al.*, 2003; Santoro *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2006).

O ciclo lítico do HHV-6 se inicia com a produção de três grupos de genes: genes imediatos iniciais (IE), genes iniciais (E) e genes tardios (L). As proteínas da fase IE são codificadas pelos genes virais U86, U89, U95, UL16 e U3, expressos imediatamente após a infecção. As proteínas iniciais da fase E são codificadas pelos genes U27, U41, U43, U74, U77, U73 e U94, são necessários para a replicação do DNA e montagem do genoma viral, enquanto proteínas da fase tardia auxiliam na maturação do vírion (Zou *et al.*, 1999; Dockrell, 2003; De Bolle, Naesens e De Clercq, 2005). O ciclo de replicação é bastante complexo, e leva de quatro a cinco dias, para que os vírus possam ser detectados no interior de vacúolos citoplasmáticos e extracelularmente. O gênero Roseolovirus segue o programa geral de replicação de outros herpesvírus, sendo que HHV-6B expressa 8 genes da fase IE, 44 genes da fase E e 8 genes que são bifásicos (Tsao *et al.*, 2009).

O processo de maturação e saída dos vírus envolve um processo de envelopamento e desenvolvimento, quando o vírion está dentro da célula. A replicação do DNA e o capsídeo ocorrem no núcleo três dias após a infecção (Black *et al.*, 1989). Uma característica resultante deste processo é a presença de nucleocapsídeos com tegumento, mas sem envelope no citoplasma da célula (Torrissi *et al.*, 1999). O tegumento aparece como sendo uma aquisição do citoplasma ou como alguns estudos propõem como sendo uma aquisição de uma estrutura da membrana nuclear conhecida

como tegussoma (Roffman *et al.*, 1990). Sendo assim, a partículas maduras saem por exocitose através da lise celular (Torrissi *et al.*, 1999) (Figura 1.12).

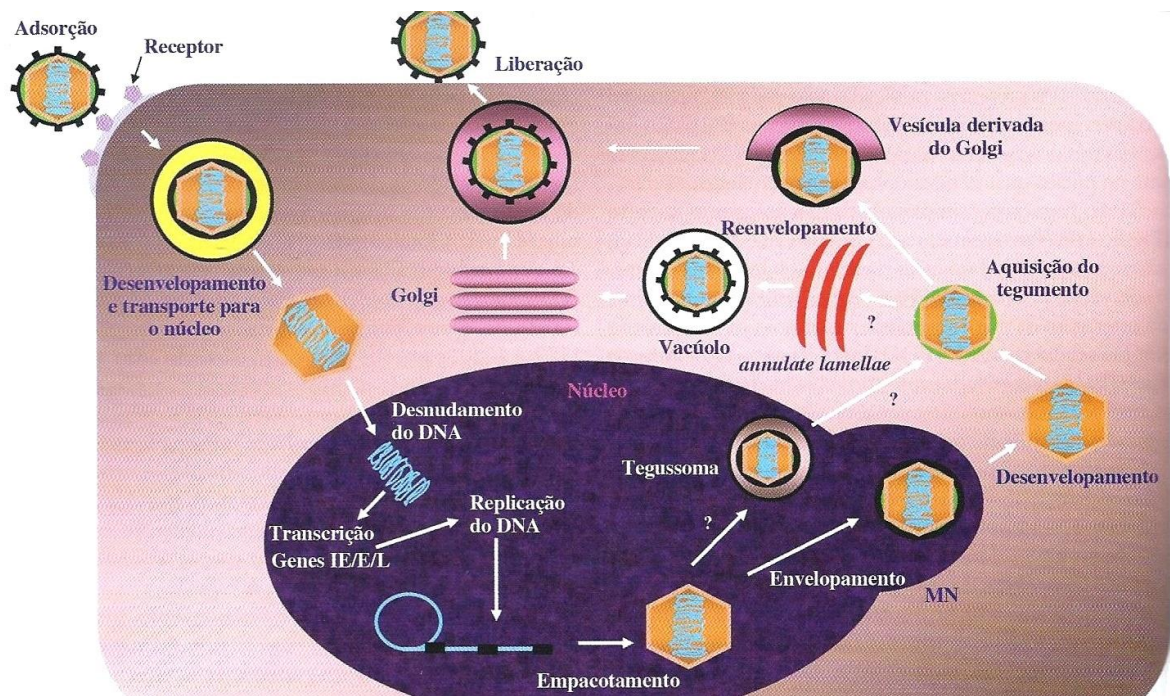


Figura 1.12: Replicação do HHV-6 (Fonte: Santos, Wigg e Oliveira, 2008)

Após a infecção lítica, o vírus HHV-6 estabelece um estado de latência, sendo esta uma característica marcante na família *Herpesviridae*. Durante este mecanismo, o HHV-6 fica como DNA circular no interior das células infectadas, tais como: linfócitos e monócitos provavelmente (Luppi *et al.*, 1999). Em raros casos, o HHV-6 se integra ao cromossoma humano sendo conhecido como CIHHV-6 (HHV-6 integrado ao cromossoma humano). Tanto o HHV-6A como o HHV6B, pode ser encontrado com esta habilidade (Abdel Massih e Razonable, 2009). Alguns estudos demonstram que o CIHHV-6 pode ser transmitido verticalmente (da mãe para o filho) (Tanaka-Taya *et al.*, 2004).

Indivíduos com CIHHV-6 apresentam persistência em altos níveis de cópias do DNA do HHV-6 no sangue, no soro e nos folículos piloso, podendo causar a doença clínica (Ward *et al.*, 2006). Estudos demonstram que os genes associados à latência são originados da região IE do gene U94 (Caserta *et al.*, 2004).

1.3.4 Patogênese e manifestações clínicas do HHV-6

O HHV-6 pode ser detectado na saliva, secreções nasais, cérebro, pulmão e medula óssea, acometendo principalmente bebês com idade de 6 a 12 meses (Yamanishi *et al.*, 1988; Santos, Wigg e Oliveira, 2008). Geralmente ocorre a infecção na infância causada pelo HHV-6B.

A infecção primária acomete o trato respiratório, incluindo as tonsilas que são ricas em linfócitos e a cavidade nasal (Yamanishi, Mori e Pellett, 2013). Este pode infectar uma gama de células se ligando principalmente ao receptor CD46 nas células hospedeiras, e infectando preferencialmente os linfócitos T CD4+ (Black e Pellett, 1999). A maioria dos casos de infecção primária é caracterizada por um estado febril, com temperaturas de febre aproximando ou superior a 40 ° C sendo a infecção por HHV-6 responsável por 10-40% das internações hospitalares de crianças com febre alta (Portolani *et al.*, 1996). A febre pode durar por 3-7 dias, após a febre, geralmente aparece um exantema súbito (ES) conhecido popularmente como roséola, que persiste por 1 ou 2 dias, não sendo este um meio de transmissão (Pruksananonda *et al.*, 1992). Esta erupção pode aparecer por todo o corpo da criança podendo causar desconforto a mesma (Figura 1.13).



Figura 1.13: Manifestações clínicas comuns em crianças infectadas com o HHV-6 Disponível em [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Human_Chromosomal_Integration_of_Latent_State_Human_Herpes_Virus_6_\(HHV-6\)](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Human_Chromosomal_Integration_of_Latent_State_Human_Herpes_Virus_6_(HHV-6)) (Acesso em 25 de dezembro de 2014).

Além da febre alta, em alguns casos a criança pode desenvolver convulsão febril (De Bolle, Naesens e De Clercq, 2005). Em casos raros, alto títulos virais podem ser

encontrado a partir do cérebro e fluído espinhal, podendo ser associados a sintomas do sistema nervoso central, como a encefalite (Zou *et al.*, 1999). As manifestações clínicas mais severas são encontradas na reativação do vírus em pacientes imunocomprometidos e pacientes imunossuprimidos como pacientes que recebem transplantes de órgãos, e possuem a sua imunocompetência reduzida terapêuticamente (De Bolle, Naesens e De Clercq, 2005). Nestes indivíduos, em geral o HHV-6 se desenvolve de forma sintomática, possivelmente provocada por uma reativação do HHV-6 latente no receptor ou infecção exógena (Pellett, Black e Yamamoto, 1992; Abdel Massih e Razonable, 2009). Nesses indivíduos podem ser associadas manifestações clínicas diretas ou indiretamente geradas pelo efeito da infecção pelo HHV-6, tais como: febre alta, mielossupressão, hepatite, pneumonia e doenças neurológicas, que apesar de raras manifestações já foram descritas na literatura (Lautenschlager *et al.*, 1998; Humar *et al.*, 2002; Montejo *et al.*, 2002; Grima *et al.*, 2008; Paula *et al.*, 2014).

1.3.5 Epidemiologia

A infecção por HHV-6 é prevalente, é muito comum na população mundial, sem restrição geográfica (Knowles e Gardner, 1988), sendo inicialmente adquirida nos primeiros 2 anos de vida, com pico de incidência ocorrendo entre os 6-9 meses (Caserta, Mock e Dewhurst, 2001). Estudos de soroprevalência não são específicos sobre a variante mais comum nas infecções, porém, acredita-se que a maioria das infecções clínicas em hospedeiros imunocompetentes são HHV-6B (Hall *et al.*, 1998).

Ainda não é bem entendido o modo de transmissão do HHV-6. Verifica-se que o HHV-6 está presente na saliva e replica em células epiteliais, sugerindo que as secreções orais auxiliam para contribuir para a transmissão oral, principalmente relacionada ao HHV-6B (Levy, Landay e Lennette, 1990; Simmons *et al.*, 1992; Clark, 2000). Estudos de Martins e colaboradores, 2012 mostraram a presença de HHV-6B em amostras de saliva tanto em pacientes que realizaram transplante renal como em pacientes saudáveis do Rio de Janeiro. Alguns estudos demonstram que HHV-6B ocorre geralmente nos primeiros dois anos de vida, replicando nas glândulas salivares (Levy *et al.*, 1990). O HHV-6A está mais associado a infecções neurotrópicas (Dewhurst *et al.*, 1993), sendo comumente detectado em pacientes imunodeficientes (Knox, Harrington e Carrigan, 1995). Em indivíduos transplantados a incidência do

HHV-6 é alta de 14% a 82% dos casos (Dockrell e Paya, 2001; Emery, 2001; Mendez *et al.*, 2001) (Figura 1.14).

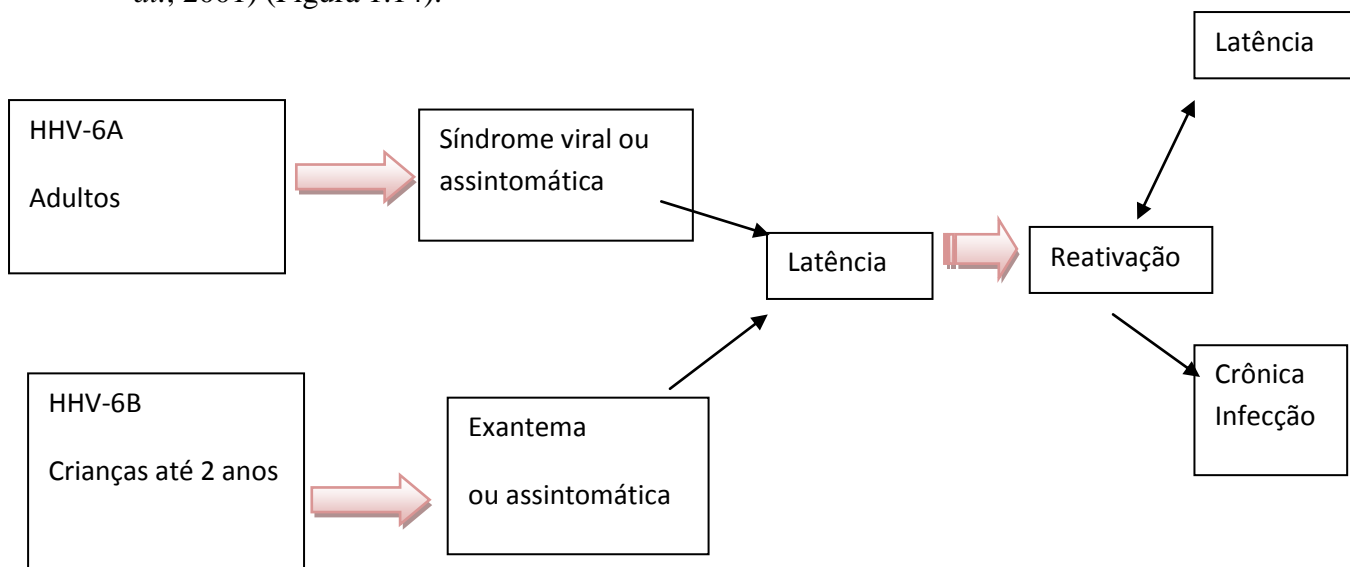


Figura 1.14: Esquema representativo das diferentes manifestação do HHV-6A e HHV-6B . Figura adaptada, disponível em http://www.wisconsinlab.com/images/reactivation_diagram.jpg Acesso em 09 de janeiro de 2015.

1.3.6 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico laboratorial do HHV-6 pode ser feito de diferentes maneiras dependendo, muitas vezes, do espécime coletado para a análise. O HHV-6 pode ser isolado em cultura celular de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), porém, para que se realize tal análise é necessária à coleta de PBMC dos pacientes que apresentem o exantema súbito ainda na fase aguda da doença (Yamanishi *et al.*, 1988).

Os testes sorológicos incluindo imunofluorescência, imunoblot, western blotting e imunoenzimáticos, também são bastante utilizados para a detecção do HHV-6. As principais limitações desses testes são: baixa sensibilidade, possibilidade de reação cruzada e não diferenciação entre as variantes (Santos, Wigg e Oliveira, 2008), porém estudos têm demonstrado o desenvolvimento de testes sorológicos variantes-específicos, realizando a distinção entre HHV-6A e HHV-6B (Thäder-Voigt *et al.*, 2011).

Para a detecção do genoma viral, é muito comum o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) e da reação de PCR em tempo real. Numerosos primers vêm sendo descritos para identificar, discriminar e quantificar HHV-6A e HHV6B, assim como a simultânea detecção de HHV-6 e HHV-7 (Minjolle *et al.*, 1999; Safronetz, Humar e

Tipples, 2003; Li *et al.*, 2009). O DNA do HHV-6 é facilmente detectado pela reação de PCR no sangue de pacientes com exantema súbito durante a fase aguda (Caserta *et al.*, 2010). Devido ao fato do exantema súbito e outros sintomas relacionados ao HHV-6 e HHV-7 serem bastante inespecíficos e relacionados também a outras doenças, e cada vez mais importante a utilização de técnicas que possam identificar simultaneamente diferentes agentes, principalmente em casos neurológicos e em casos de crianças recém-vacinadas (Ward, 2005; Ward *et al.*, 2006).

A infecção do HHV-6 em crianças é geralmente autolimitada e não necessita de tratamento específico (Santos, Wigg e Oliveira, 2008), contudo em pacientes que apresentam casos mais graves relacionados a infecção por HHV-6, pacientes imunocomprometidos e pacientes imunodeprimidos a inibição da replicação do HHV-6 é realizada com o uso do ganciclovir, foscarnet e cidociclovir que são potentes inibidores da replicação viral dos Roseolovirus. O aciclovir e outras drogas timidina kinase dependente são usados somente como drogas adicionais efetivas (Braun, Dominguez e Pellett, 1997; De Bolle, Naesens e De Clercq, 2005).

2. JUSTIFICATIVA

Os membros da família *Herpesviridae*, no geral, causam infecções benignas, contudo, casos mais graves podem levar a infecções neurológicas, podendo evoluir rapidamente, com graves sequelas levando o paciente a morte. A presença de um determinado herpesvírus em um paciente pode demonstrar imunossupressão, sendo utilizado como um marcador (Pessa, 2011). Estes vírus são, geralmente, adquiridos na infância ou na idade adulta jovem, estabelecem um estado de latência assintomática e podem, eventualmente, reativar com o aparecimento dos sintomas clínicos nas idades mais avançadas ou devido a infecção pelo HIV (Chakraborty *et al.*, 2010).

Sendo importante conhecer a incidência dos diferentes herpesvírus no Rio de Janeiro, este projeto visa investigar a presença do HSV e do HHV-6 em pacientes imunocomprometidos, realizando o diagnóstico e a caracterização genotípica desses vírus, pois, estas viroses acabam gerando infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos, podendo gerar sérias complicações devido à baixa do sistema imunológico. O potencial dos herpesvírus em produzir doenças neste pacientes precisa ser definido. A clarificação do papel patogênico desses vírus é necessária, tendo em vista a multiplicidade de quadros clínicos observados (Studahl *et al.*, 2000).

Este trabalho visa o estabelecimento de técnicas moleculares que possibilitaram a rápida e eficiente detecção do HSV-1 e do HHV-6 em diferentes tipos de amostras, tais como soro, raspado da lesão e saliva. Além disso, a caracterização genotípica desses vírus é de suma relevância, pois através desta é possível à análise de mutações que possam levar a mudança de genótipos ou mecanismos de resistência no hospedeiro. Além disso, não existem trabalhos sobre a caracterização genotípica dos genótipos circulantes de HSV-1 no território brasileiro. Neste estudo pretende-se realizar a caracterização genotípica das amostras clínicas analisadas.

Neste projeto também será avaliada a técnica de RNAi através da utilização de siRNA que inibem a replicação do HSV-1 *in vitro* e nos permiti mais facilmente prosseguir nos estudos de controle da infecção através da diminuição da replicação viral pela função da ribonucleotídeo redutase fornecendo assim dados que auxiliem o desenvolvimento de aplicações do siRNA *in vivo*. A rápida detecção de tais agentes e a introdução de uma terapia antiviral específica podem diminuir a morbidade e mortalidade causada por essas viroses (Pessa, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral da Tese

Desenvolver métodos de diagnóstico, promover o silenciamento gênico do HSV-1 e caracterizar molecularmente do vírus herpes simples tipo 1 e herpesvírus humano tipo 6 em pacientes imunocomprometidos.

3.2 Objetivos Específicos

➤ Objetivo do Artigo 1

- Avaliar o método mais eficiente para o diagnóstico da infecção HSV-1, por meio da comparação entre a detecção do HSV-1 por isolamento em cultura celular “padrão ouro” e a técnica de PCR em tempo real.
- Estabelecer um método para diagnosticar a infecção pelo HSV-1 por meio da detecção e quantificação do genoma viral.
- Avaliar o uso do siRNA para inibição do ciclo replicativo do HSV-1 “*in vitro*”.

➤ Objetivo do Artigo 2

- Caracterizar os genótipos circulantes do HSV-1 em pacientes imunocomprometidos do estado do Rio de Janeiro
- Caracterizar mutações nos genes US8, UL44 e UL23 dos genótipos circulantes entre os pacientes imunocomprometidos.

➤ Objetivo do Artigo 3

- Investigar a infecção por herpesvírus em pacientes com hepatite fulminante sem etiologia definida.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos na presente tese serão apresentados sob a forma de artigos científicos e serão listados na ordem em que serão discutidos.

1. Perse, AS. ; Lopes, JF. ; De Paula, VS. RNA interference inhibits herpes simplex virus type 1 isolated from saliva and mucocutaneous lesions. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* , v. 1, p. 1, 2014.
2. Perse, AS; Lopes AO; Vieira, YR; De Almeida, AJ; Sion; FS; Grinsztejn B; Wagner, S; De Paula, VS. Genotypic characterization of herpes simplex virus type 1 isolates in immunocompromised patients from Rio de Janeiro, Brazil, artigo em processo de submissão.
3. De Paula, VS; Perse, AS, Detlef, M; Melgalço, JG; Vieira, YR; Dos Santo, DC; De Araujo, CCV; Pacheco-Moreira, LF, Pelajo-Machado, M, Nascimento, CM; Schmidt-Chanasit, J; Pinto, MA. Acute liver failure in an immunocompetent patient. *Journal of Clinical Virology*, v. 60, p. 1-3, 2014.

4.1 ARTIGO I

Breve Contextualização e metas alcançadas

Este estudo teve como objetivo avaliar o uso da técnica de RNA de interferência (RNAi) através da utilização de siRNAs para inibir a replicação do herpes simples tipo 1 *in vitro* e avaliar o método mais eficiente para o diagnóstico da infecção do HSV-1, comparando as técnicas de isolamento viral e PCR em tempo real. Este estudo foi realizado através da utilização de amostras clínicas de lesão mucocutâneas e de saliva provenientes de pacientes infectados por HSV-1. Para o silenciamento gênico foram utilizadas três sequências de siRNAs (si-UL 39-1, si-UL 39-2, e si-UL 39-3) que visam inibir a replicação do gene UL-39. Neste estudo foram utilizados isolados de HSV-1 a partir de amostras clínicas de lesões mucocutâneas e da saliva de pacientes infectados. Os resultados demonstraram que todas as amostras de lesões mucocutâneas foram positivas para HSV-1 para ambas as técnicas analisadas (isolamento viral e PCR em tempo real). Nas amostras de saliva, 50% das amostras foram positivas para a técnica de isolamento viral e 100% foram positivas para a técnica do PCR em tempo real. Neste estudo também foi quantificado os níveis de DNA do HSV-1, após o tratamento com siRNA, em uma amostra de paciente que apresentava alto título viral. Os resultados demonstraram que o efeito do siRNA depende da concentração de siRNA utilizado. As três sequências de siRNA utilizadas foram capazes de inibir a replicação viral, avaliada pela a reação de PCR em tempo real e ensaios de placas (PFU). A sequência de si-UL39-1 foi a mais eficiente no silenciamento gênico, inibindo até 99% da replicação viral do HSV-1 *in vitro*. Este estudo demonstrou que o siRNA é capaz de inibir eficazmente a replicação do HSV-1, podendo ser utilizado como futura alternativa antiviral.



The Brazilian Journal of INFECTIOUS DISEASES

www.elsevier.com/locate/bjid



Brief communication

RNA interference inhibits herpes simplex virus type 1 isolated from saliva samples and mucocutaneous lesions



Amanda Perse da Silva, Juliana Freitas Lopes, Vanessa Salete de Paula*

Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 November 2013

Accepted 6 January 2014

Available online 15 May 2014

Keywords:

Herpes simplex virus type 1

Real-time PCR

siRNA

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the use of RNA interference to inhibit herpes simplex virus type-1 replication *in vitro*. For herpes simplex virus type-1 gene silencing, three different small interfering RNAs (siRNAs) targeting the herpes simplex virus type-1 UL39 gene (sequence si-UL 39-1, si-UL 39-2, and si-UL 39-3) were used, which encode the large subunit of ribonucleotide reductase, an essential enzyme for DNA synthesis. Herpes simplex virus type-1 was isolated from saliva samples and mucocutaneous lesions from infected patients. All mucocutaneous lesions' samples were positive for herpes simplex virus type-1 by real-time PCR and by virus isolation; all herpes simplex virus type-1 from saliva samples were positive by real-time PCR and 50% were positive by virus isolation. The levels of herpes simplex virus type-1 DNA remaining after siRNA treatment were assessed by real-time PCR, whose results demonstrated that the effect of siRNAs on gene expression depends on siRNA concentration. The three siRNA sequences used were able to inhibit viral replication, assessed by real-time PCR and plaque assays and among them, the sequence si-UL 39-1 was the most effective. This sequence inhibited 99% of herpes simplex virus type-1 replication. The results demonstrate that silencing herpes simplex virus type-1 UL39 expression by siRNAs effectively inhibits herpes simplex virus type-1 replication, suggesting that siRNA based antiviral strategy may be a potential therapeutic alternative.

© 2014 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is a member of the *Herpesviridae* family and is characterized by its ability to establish latency after primary infection and subsequently reactivated.¹ Herpes simplex virus (HSV) is an enveloped, double-stranded (ds) DNA virus. The HSV-1 genome consists of 152 kb of linear dsDNA arranged as long and short unique segments (UL and US) flanked by inverted repeated sequences (TRL/IRL and

IRS/TRS, respectively).² Worldwide prevalence of HSV ranges from 65% to 90%. HSV-1 gives rise to a spectrum of clinical manifestations and can still be a major cause of morbidity and mortality.³ HSV-1 is the causative agent of encephalitis, corneal blindness, and several peripheral nervous system disorders.⁴ Beyond the neonatal period, most childhood herpes simplex virus infections are caused by HSV-1.

* Corresponding author at: Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Pavilhão Helio e Peggy Pereira, Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, 21040-360, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

E-mail address: vdepaula@ioc.fiocruz.br (V.S. de Paula).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2014.01.011>

1413-8670/© 2014 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

The seroprevalence of HSV-1 antibodies increases with age, reaching 20% by the age of five years. No increase occurs until 20–40 years of age, when 40–60% of individuals are HSV-1 seropositive. Mortality associated with herpes simplex virus is primarily related to perinatal infection, encephalitis, and infection in individuals who are immunocompromised.^{4,5}

Recently, RNA interference (RNAi) has emerged as a new therapeutic strategy against viral infection.⁶ RNAi is now widely used to knockdown gene expression, in a sequence-specific manner.⁶ It can inhibit the expression of crucial viral proteins by targeting viral mRNAs for degradation instead of the proteins they encode.⁷ RNAi is mediated by 21–25 nucleotide double-stranded small interfering RNA (siRNA) molecules. siRNAs are incorporated into the RNA-induced silencing complex (RISC), which mediates mRNA sequence-specific binding and cleavage.⁸ In particular, siRNAs, processed from double-stranded (ds) RNA precursors by the type III endoribonuclease Dicer, mediate post-transcriptional gene silencing (PTGS).⁹ Some studies confirm that siRNA-directed transcriptional gene silencing is conserved in mammalian cells.¹⁰ Small RNAs may guide mammalian transcriptional silencing in many different biological contexts.¹⁰ HSV-1 encodes its own ribonucleotide reductase (RR), which reduces ribonucleoside diphosphates to the corresponding deoxyribonucleotides and is essential for replication. The HSV-1 RR is formed by a large subunit designated ICP6, encoded by the UL39 gene, and a small subunit which is encoded by the UL-40 gene. The HSV-1 cannot utilize cellular RR and therefore is dependent upon its own reductase for replication.¹¹ siRNA-based antiviral therapy may be a potential effective therapeutic alternative for patients with acyclovir-resistant HSV strains.

This study evaluated the effects of siRNAs targeting the HSV-1 UL39 gene on the replication of HSV-1 isolated from mucocutaneous lesions and saliva samples. Infected patients with blisters and sores characteristic of herpes skin disease who had HSV-1 DNA detected were included in this study. For this purpose, samples were collected between 2009 and 2010 after obtaining informed consent statement from each individual. This study was approved by Ethics Committee of Oswaldo Cruz Foundation (protocol number: 544/09). The saliva samples were collected using ChemBio (Medford, New York) and samples from mucocutaneous lesions were collected using Salivette (Sarsdedt, Germany) devices, respectively. The detection of HSV-1 was confirmed by virus isolation in cell culture and real-time PCR. In brief, samples from mucocutaneous lesions or saliva samples were suspended in 3 mL of medium 199 (Sigma) containing antibiotics and antifungal (2.5 µg/mL of each one respectively). Vero cell cultures were inoculated with 300 µL of solution containing mucocutaneous or saliva samples. The HSV-1 strain KOS was used as control of infection.¹² During 15 days cell cultures were observed for viral cytopathic effect typical for HSV infection. HSV DNA was extracted from clinical specimens using commercial kits (Qiagen, Valencia, CA, USA) following the manufacturer's instructions. HSV-1 specific PCR analysis was conducted with a SYBR Green real-time PCR assay according to manufacturer's instructions. The real-time quantitative PCR was performed with oligonucleotide primer pairs specific for the coding region of the glycoprotein D (gD) of HSV-1, as reported previously.¹³

The primers used were HSV-FP (5'-CGGCCGTGTGACTATCG-3') and HSV-RP (5'-CTCGTAAAATGGCCCTCC-3').¹³ A standard curve was prepared by serial dilution (10¹–10⁷) from DNA extracted from KOS strain (10⁸ copies/mL).

After confirming HSV1 infection, the replication of HSV-1 was inhibited using three siRNA molecules against the UL-39 gene from HSV-1 (si-UL 39-1, si-UL 39-2, si-UL39-3).¹⁴ One sequence not targeting any known gene was used as a negative control of siRNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Vero cells were grown in 6-well plates to 80%–90% confluence and then transfected with specific or control siRNA using the commercial kit siPORT™ Amine (Ambion/Applied Biosystems, Foster city, CA, USA). After four hours, the cells were infected with HSV-1 from the infected patients (25 PFU/mL). At 48–72 h post-infection, plates were fixed with 10% paraformaldehyde for two minutes and then stained with 1% crystal violet for 30 minutes to count the number of plaques per well. The effects of siRNA in infected cells were also measured by quantification of HSV DNA. After 48 h, the DNA from the infected cells was extracted using a commercial kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. Real-time PCR relative quantitative reactions were performed using SYBR Green real-time PCR Master Mix (Roche, New Jersey, USA) and 18S RNA was used as the endogenous control. The statistical analysis was performed using the programs "Graph Pad Prism" 5.0 and Excel. The data were reported as mean ± standard deviation (SD) and the levels of significance were evaluated using the Student's t-test and ANOVA. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

All samples of mucocutaneous lesions were positive for HSV-1 by real time-PCR and by virus isolation. The viral load in mucocutaneous lesions samples ranged from 3.85×10^3 to 9.78×10^4 copies/mL. The saliva samples were all positive for HSV-1 by real-time PCR, and only 50% of samples were positive by viral isolation. The virus load in saliva samples ranged from 2.44×10^3 to 1.54×10^4 copies/mL. Previous studies have shown that the isolation of HSV DNA from saliva, using the method of viral isolation, is hampered by the presence of substances with anti-HSV activity in saliva.^{15,16} Using the highly sensitive technique of real-time PCR, we detected the HSV-1 even in those samples with low viral load. The concentration of siRNA is important to suppress virus replication. Aiming to evaluate the best concentration of siRNA required to suppress HSV replication, cells were transfected with siRNAs in different concentrations (final concentration 3 nM, 6 nM, 9 nM, 12 nM, 15 nM, 18 nM, 21 nM). In this experiment two controls were used: (1) cells infected with HSV-1 that were transfected with non-specific siRNA (NC) and cells infected with HSV-1 and not transfected (CIN).

The results demonstrated that these siRNAs could potentially inhibit HSV-1 replication *in vitro* and was observed that the concentration of UL39 specific siRNAs to achieve the highest inhibition of HSV transcription was 6 nM (Fig. 1). This concentration is considerably less than those used in other studies of gene silencing in mammalian cells, which has typically ranged from 20 to 200 nM.^{17–19} However, low concentrations around 10 nM have also been shown to be sufficient for an effective silencing of genes.^{20,21} Following the establishment of the concentration of siRNA that had the highest inhibitory

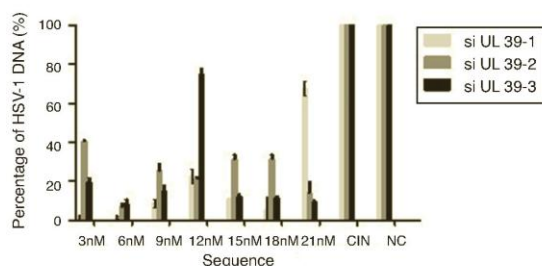


Fig. 1 – Effect of different siRNAs on the expression levels of HSV-1 DNA. The expression level of HSV-1 DNA in cells treated with different concentrations (3–21 nM) of siRNAs (si-UL-39 1, si-UL-39 2, si-UL39 3) was determined by real-time quantitative PCR. The result was normalized to the housekeeping gene 18S RNA. NC – cells transfected with non-specific siRNA (negative control). CIN cells infected with HSV-1 but not transfected.

effect on UL-39 transcription, a sample from mucocutaneous lesions with the highest viral load (9.78×10^4 copies/mL) was used to evaluate the efficiency of gene silencing. The concentration of 6 nM of siRNAs was used for transfection and gene silencing was evaluated 48 hours post-infection. Analysis by real-time PCR showed that 99, 90 and 88.5% of gene silencing were achieved upon transfection with siRNAs targeting si-UL-39-1, si-UL39-2, and si-UL 39-3 sequences, respectively (Fig. 2). In our study, the siRNA specific to the UL-39-1 sequence showed the highest level of silencing. By plaque assays from 63 to 69% inhibition of viral plaque formation upon silencing the UL-39 gene. Previous study demonstrated that the inhibition rates of siRNA1 and siRNA2 on HSV-1 plaque formation were 35.51 and 51.62%.¹⁴ The differences in the level of silencing determined by these siRNA sequences may be due to the concentration of siRNA, conditions of transfection, viral strains, type of cell used and differences in the thermodynamic properties of the siRNAs. Currently, there has been increasing number of studies exploring the potential for RNAi

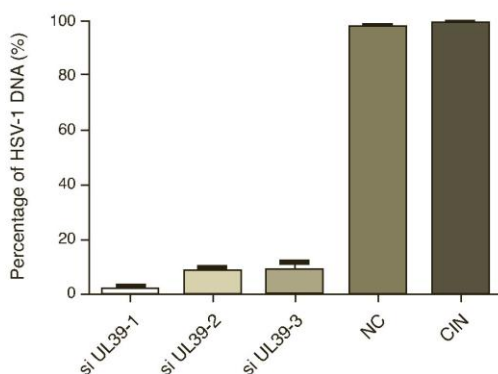


Fig. 2 – Inhibition of HSV-1 replication in an infected patient. The inhibition of UL-39 gene was performed using siRNAs (si-UL-39 1, si-UL-39 2, si-UL39 3). NC, negative control; CIN, cells infected with HSV-1 but not transfected.

approaches to HSV-1. The siRNAi used in this study silenced specifically the HSV-1 UL39 gene, which encodes the large subunit of ribonucleotide reductase, ICP6.^{14,22} RNAi has also been reported to inhibit HSV-1 replication by using siRNAs targeting glycoprotein E that plays key role in cell-to-cell spread and virus-induced cell fusion²⁰; DNA polymerase gene and VP16 play vital roles in initiation of viral gene expression and viral proliferation²² and ICP4 is a major regulatory gene required for efficient transcription of early and late viral genes making it essential for lytic infection.¹⁹ These studies that applied RNAi to interfere HSV-1 infection suggested that these small sequences might have the potential for effective therapeutic alternative in patients with HSV-1 infection. One important aspect of using siRNA activity against DNA viruses is the need to show the inhibition of viral DNA replication, and when the amounts of viral DNA were quantified almost no viral DNA could be detected, which demonstrated the inhibition of genome replication. Herein, the siRNAi were effective to inhibit replication of HSV-1 in a strain adapted in cell culture (KOS) and also in wild-type virus isolated directly from an infected patient with high viral load. The inhibitory effects were related to the concentration of siRNAi transfected, thus determining the right concentration siRNAi can improve the inhibition of virus replication.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

National Council of Technological and Scientific Development (CNPq), 478979/2009-6 and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), E-26/111.561/2010 were acknowledged for financial support.

REFERENCES

- James SH, Whitley RJ. Treatment of herpes simplex virus infections in pediatric patients: current status and future needs. *Clin Pharmacol Ther.* 2010;88:720-4.
- Roizman B. The function of herpes simplex virus genes: a primer for genetic engineering of novel vectors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:11307-12.
- Nahmias AJ, Roizman B. Infection with herpes-simplex viruses 1 and II. *N Engl J Med.* 1973;289:719-25.
- Steiner I, Benninger F. Update on herpes virus infections of the nervous system. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2013;13:414-8.
- Chayavichitsilp P, Buckwalter JV, Krakowski AC, Friedlander SF. Herpes simplex. *Pediatr Rev.* 2009;30:119-29.
- Looker KJ, Garnett GP. A systematic review of the epidemiology and interaction of herpes simplex virus types 1 and 2. *Sex Transm Infect.* 2005;81:103-7. PMID: 15800084.
- Raza A, Shareef H, Salim H, Khushal R, Bokhari H. Selection of predicted siRNA as potential antiviral therapeutic agent against influenza virus. *Bioinformation.* 2011;6:340-3.
- Tokatlian T, Segura T. siRNA applications in nanomedicine. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2010;2:305-15.

9. Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*. 2000;101:25-33.
10. Morris KV, Chan SW, Jacobsen SE, Looney DJ. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science*. 2004;305:1289-92.
11. Zhe R, Mei-Ying Z, Kitazato K, et al. Effect of siRNA on HSV-1 plaque formation and relative expression levels of UL39 mRNA. *Arch Virol*. 2008;153:1401-6.
12. Macdonald SJ, Mostafa HH, Morrison LA, Davido DJ. Genome sequence of herpes simplex virus 1 strain KOS? *J Virol*. 2012;86:6371-2.
13. Weidmann M, Armbruster K, Hufert FT. Challenges in designing a Taqman-based multiplex assay for the simultaneous detection of Herpes simplex virus types 1 and 2 and Varicella-zoster virus. *J Clin Virol*. 2008;42:326-34.
14. Zhe R, Shen L, Qiao-Li W, et al. Effect of siRNAs on HSV-1 plaque formation and relative expression levels of RR mRNA. *Virol Sin*. 2011;26:40-6.
15. Chichili GR, Athmanathan S, Farhatullah S, et al. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of herpes simplex virus, varicella-zoster virus and cytomegalovirus in ocular specimens. *Curr Eye Res*. 2003;27:85-90.
16. Valimaa H, Tenovuo J, Waris M, Hukkanen V. Human lactoferrin but not lysozyme neutralizes HSV-1 and inhibits HSV-1 replication and cell-to-cell spread. *Virol J*. 2009;6:53.
17. Semizarov D, Frost L, Sarthy A, Kroeger P, Halbert DN, Fesik SW. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:6347-52.
18. Wu H, Hait WN, Yang JM. Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells. *Cancer Res*. 2003;63:1515-9.
19. Duan F, Ni S, Nie Y, Huang Q, Wu K. Small interfering RNA targeting for infected-cell polypeptide 4 inhibits herpes simplex virus type 1 replication in retinal pigment epithelial cells. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2012;40:195-204.
20. Bhuyan PK, Kariko K, Capodici J, et al. Short interfering RNA-mediated inhibition of herpes simplex virus type 1 gene expression and function during infection of human keratinocytes. *J Virol*. 2004;78:10276-81.
21. Huang F, Zhou J, Yang Z, et al. RNA interference inhibits hepatitis E virus mRNA accumulation and protein synthesis in vitro. *Vet Microbiol*. 2010;142:261-7.
22. Zhang YQ, Lai W, Li H, Li G. Inhibition of herpes simplex type 1 by small interfering RNA? *Clin Exp Dermatol*. 2008;33:56-61.

4.2 ARTIGO II

Breve Contextualização e metas alcançadas

O HSV-1 é um vírus que causa uma variedade de doenças, podendo desenvolver formas mais graves em indivíduos infectados pelo HIV. No Brasil, não há informações sobre a epidemiologia molecular do HSV-1, especialmente em indivíduos infectados pelo HIV. O objetivo deste estudo foi realizar a caracterização genotípica do HSV-1 em pacientes co-infectados com o vírus HIV. Um total de 214 amostras de soro de pacientes HIV+ sem sintomas clínicos do HSV-1 foram analisadas. Estas amostras foram provenientes de dois hospitais referência no tratamento de pacientes HIV+ do Rio de Janeiro. A caracterização genotípica das amostras foi realizada através da técnica de RFLP pela análise dos genes gG e gI e pelo sequenciamento nucleotídico seguido de análise filogenética realizado pelos genes US8 (1601 pb), o UL44 (1996 pb) e o UL23 (1244 pb). A análise pelo RFLP permitiu a classificação das amostras positivas para o HSV-1 como genótipo A. A análise filogenética das amostras brasileiras demonstrou alta identidade nucleotídica, sendo esta superior a 97% para todos os genes analisados, estando as amostras brasileiras relacionadas entre si e agrupadas em um mesmo clado. Nestas amostras não foram encontradas mutações de resistência ao aciclovir. Este é o primeiro registro da caracterização molecular do HSV-1 no Rio de Janeiro, Brasil.

Artigo em processo de submissão

Genotypic characterization of herpes simplex virus type 1 isolates in immunocompromised patients in Rio de Janeiro, Brazil.

Amanda Perse da Silva¹, Amanda de Oliveira Lopes¹, Yasmine Rangel Vieira¹, Adilson José de Almeida², Fernando Samuel Sion², Beatriz Grinsztejn³, Sandra Wagner³ & Vanessa Salete de Paula^{1*}

¹ Oswaldo Cruz Foundation, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

² Gaffrée & Guinle University Hospital, Federal University of the State of Rio de Janeiro (UNIRIO), Rio de Janeiro, Brazil

³ Evandro Chagas National Institute of Infectology (INI), Rio de Janeiro, Brazil

*Corresponding author:

E-mail: amandaps@ioc.fiocruz.br (AP) or vdepaula@ioc.fiocruz.br (VSP)

Abstract

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is a prevalent human pathogen that causes a variety of diseases, including an increased risk of developing more severe disease in HIV-infected individuals. In Brazil, there is no information about the molecular epidemiology of HSV-1 infection, especially in HIV-infected individuals. The aim of this study was to perform the genotypic characterization of HSV-1 among HIV-infected patients. A total of 214 serum samples from HIV-positive patients without HSV infection symptoms were enrolled in one of two reference hospitals for HIV infection managing in Rio de Janeiro. The gG and gI genes were analyzed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and full nucleotide sequencing of the US8 (1601 bp), UL44 (1996 bp), and UL23 (1244 bp) regions was performed. A total of 38.3% (82/214) and 32.7% (70/214) of the serum samples tested positive for gG and gI genes, respectively. RFLP analysis classified the HSV-1 as belonging to genotype A. Phylogenetic analysis of the Brazilian samples for the US8, UL44, and UL23 regions demonstrated that the nucleotide identity between Brazilian samples was higher than 97% for all genes. No acyclovir mutation was detected in the patients. The shedding of HSV in the serum samples from HIV-positive patients who were asymptomatic for HSV infection was detected in this work. This is the first report of molecular characterization of HSV-1 in Brazilian samples since there is no previous data available in the literature concerning the genotypic classification and stable distribution of Brazilian strains of HSV-1 in Rio de Janeiro, Brazil. **Key words: HSV-1, HIV, genotype.**

Introduction

Herpes simplex infection is caused by either Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) or Herpes simplex virus type 2 (HSV-2), with tropism for mucosa surfaces where it causes skin vesicles or mucosal ulcers or it can simply be excreted in the absence of symptoms [1]. Herpes simplex virus (HSV) infections contribute substantially to hospitalization, morbidity, and mortality in HIV-infected patients [2].

HSV-1 is one of the most common viruses in humans, and infection caused by this agent occurs often during childhood and adolescence [3]. Some studies have demonstrated an increasing frequency of HSV-1 as the agent of genital herpes in developed countries [4, 5]. HSV-2 is more prevalent in sexually active adults and adolescents [6, 7]. In most geographic regions, the prevalence of HSV-1 infection is greater than HSV-2 infection [8].

HSV-1 infections may occur in a primary or a recurrent form and may lead to substantial physical morbidity [3]. In primary infection, the replication of the virus at the portal of entry, usually oral or genital mucosa, results in infection of sensory nerve endings [1]. The ability of the virus to replicate in mucosa and to be transported to the dorsal root ganglia is associated with the pathogenesis of the infection. Primary infection can spread beyond the dorsal root ganglia, thereby becoming systemic. HSV-1 is able to establish a lifelong latent infection of sensory ganglia with intermittent reactivation and neuronal spread of the virus to innervating tissues [9]. HSV-1 can be reactivated from latency [10] and, during reactivation, the virus is detected at mucocutaneous sites, and appears as skin vesicles or mucosal ulcers, or it can be excreted without any symptoms [1].

Information about the frequency and clinical correlates of HSV viremia is limited. No HSV viremia has been detected in patients with recurrent herpes labialis but otherwise in healthy individuals. Thus, the detection of HSV viremia is possible, but seems to be limited to primary infections since it has not been detected in recurrent infections [11]. In a previous study to evaluate HSV viremia during primary genital infection, 24% of the patients had HSV DNA detected when assayed by polymerase chain reaction (PCR) in their peripheral blood [12].

HSV-1 reactivation is more common in immunocompromised individuals and may result in viral shedding in saliva [13]. Patients with immunodeficiencies or treatment-related immunosuppression are at increased risk of developing severe generalized or prolonged HSV excretion [14]. PCR-based assays can rapidly and accurately detect and quantify HSV DNA from clinical specimens of lesion, saliva, serum, and plasma [15-17].

The genome of HSV consists of two components that are formed from unique sequences (U) covalently bound to either L (long) or S (Short) sequences, and are identified in relation to the size of the genomic fragment, using the abbreviations UL or US [18, 19]. HSV-1 is a double-stranded DNA virus with a 152 kb genome that encodes at least 74 proteins [14]. Molecular recombination generates new combinations of genetic material. These mechanisms are poorly understood but are associated with DNA replication [20] and different cell factors [21, 22].

Acyclovir (ACV) is one of the antiviral drug indicated for the treatment of herpes infections. ACV acts through the inhibition of viral DNA polymerase (pol) by acting as a competitive inhibitor of viral DNA. Initial phosphorylation of ACV by viral thymidine kinase (TK) in infected cells provides this competitive inhibition [23]. Resistance to ACV in the majority of cases (95%) is due to a mutation in TK or by alteration in substrate specificity [24, 25].

The aim of this study was to detect and molecularly characterize the circulating strains of HSV-1 in HIV-positive patients. Many studies on HSV-1 phylogeny have analyzed the viral strains in different geographic regions such as Europe, North America, East Asia, and Eastern Africa [26, 27]. These studies have described three genotypes for HSV-1 (A, B, and C) when analyzed through the glycoprotein E (gE), C (gC), and I (gI) [10, 28]. In Brazil, until now, there are no data available concerning the genotypic characterization of circulating HSV-1 isolates.

Materials and Methods

Ethics Statement

This study was approved by the Human Research Ethics Committee of Evandro Chagas National Institute of Infectology (protocol number: 0039.0.009.000-10) and Gaffrée & Guinle University Hospital (protocol number: 11350212.3.0000.5258). All the subjects participating in the study signed a consent form after being provided all the necessary and sufficient information to make an informed decision.

Study Population

In this study, 214 serum samples were tested for HSV-1. Between January 1988 and December 2012, a total of 173 serum samples of HIV-infected patients followed up at Gaffrée & Guinle University Hospital of the Federal University of the State of Rio de Janeiro were collected. In the course of 2012, 41 serum samples of HIV-infected patients followed up at the Evandro Chagas National Institute of Infectology of Oswaldo Cruz Foundation were also collected. Both Institutions are Public Health Care Units localized in Rio de Janeiro, Brazil. Inclusion criteria were as follows: 18 years old or older, male or female, any race, HIV infection confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay and Western blot. All patients included were asymptomatic for HSV-1.

At Gaffrée & Guinle University Hospital 61.8% (107/173) of patients were males, with a median age of 45 years old (ranging from 18 to 72 years old). At Evandro Chagas National Institute of Infectology, 68.29% (28/41) of patients were males, with a median age of 40 years old (ranging from 21 to 60 years old).

HSV-1 detection and quantification

Viral DNA was isolated from serum samples using the QIAmp DNA Mini kit (QIAGEN®, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Extracted DNA was analyzed by qualitative PCR specific for gG (269 bp) and gI (410 bp) for partial genome amplification. The following reagents were used in the PCR assays: 5x Phusion Buffer, 1X Phusion DNA Polymerase (Phusion® High Fidelity DNA Polymerase, New England BioLabs, MA, USA), primers 10 µM (forward/reverse), dNTPs 20 µM, and 5 µL of DNA. Single-positive samples were tested by restriction fragment length (RFLP), according to published protocols [28, 29].

In order to quantify the viral load, DNA samples were evaluated in duplicate by Real Time PCR using Real Star® HSV PCR Kit 1.0 Multiplex (Altona Diagnostic, Hamburg, Germany), according to manufacturer's instructions. This kit contains all the components (buffer, enzymes, primers, and probes) to allow simultaneous detection and quantification of HSV-1 and HSV-2.

Partial genome amplification and direct nucleotide sequencing

The US8 (1601 bp), UL44 (1996 bp), and UL23 (1244 bp) regions were subjected to partial genome amplification under the conditions established in this study: 20 µL reaction volume consisted of 2 µL DNA, HotStar Taq Plus Master Mix 1X (QIAGEN®, Hilden, Germany), primers 0.3 µM (forward/ reverse), and H₂O RNase free. Cycling conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 55°C for 45 s and extension at 72°C for 90 s, and a final extension at 72°C for 10 min. Amplicons were analyzed by electrophoresis on 2.5% agarose gel, stained with ethidium bromide (0.2 µg/mL) and observed under UV light.

PCR products with expected size were purified using reagents and protocols of the QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN®, Hilden, Germany) and sequenced using reagents and protocols of the ABI Kit Big Dye® Terminator version 1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA,USA) at the sequencing platform of LGC Genomics. Samples were sequenced using primers previously used in PCR reactions (Table 1).

Table 1: Primers used for amplification and sequencing of the UL23, UL44, and US8 genes of HSV-1.

Gene and primer orientation*	Sequence (5'→3')	Fragment length (bp)
UL-23		
UL-23 1F	CGTTATTTACCCTGTTTCG	290
UL-23 272R	ATTGTCTCCTTCCGTGTT	
UL-23 253F	CCGAAACAGGGTAAATAACG	468
UL-23 720 R	GTTCTGGCTCCTCATATCG	
UL23 702F	CGATATGAGGAGCCAGAAC	486
UL23 1187R	ATCTTGGTGGCGTGAAAC	
UL-44		
UL44 1F	AGGCATTAGTCCCGAAGA	573
UL44 331R	TGGTGTTGTTCTTGGGTTT	

UL44 311F	CCAAACCCAAGAACAACAC	392
UL44 702R	CACCTCGCCGATAATCAG	
UL44 643F	CCTCCGTTGTATTCTGTCA	404
UL44 1104R	ATCTGGCAGGTGAAGGTC	
UL44 1090F	CTTCACCTGCCAGATGAC	627
UL44 1551R	GGATCGACCAAGGATGAC	
US-8		
US8 21F	TTCTTCTCGGTGTTTGTGTTG	657
US8 739R	TCTCCATACGCACGGTCAC	
US8 724F	ACCGTGCGTATGGAGACT	440
US8 1163R	GCGTGAATATGGTCGTTGA	
US8 1144F	GTCAACGACCATATTCACG	564
US8 1707R	CCAGAAGACGGACGAATC	

*F, forward; R, reverse; bp, base pairs.

Phylogenetic analysis

HSV-1 sequences were manually checked in the BioEdit. Bayesian phylogenetic trees were constructed with partial nucleotide sequences from positive samples for US8 (1601 bp), UL44 (1996 bp), and UL23 (1244 bp), as well as sequences from GenBank. Consensus trees were visualized using the FigTree program. A nucleotide identity matrix was also constructed using the Brazilian strains and nucleotide sequences available in the literature.

For the US8 region, multiple nucleotide sequence alignment was analyzed by using the Markov Chain Monte Carlo method implemented in the program MrBayes version 3.1.2 under the HKY + γ + I nucleotide substitution model, selected by using the jModeltest program (ngen = 8,000,000). For the UL44 region, multiple nucleotide sequence alignment was analyzed by using the Markov Chain Monte Carlo method implemented in the program MrBayes version 3.1.2 under the GTR + γ nucleotide substitution model, selected by using the jModeltest program (ngen = 10,000,000). For the UL23 region, multiple nucleotide sequence alignment was analyzed by using the Markov Chain Monte Carlo method implemented in the program MrBayes version 3.1.2 under the GTR + γ + I nucleotide substitution model, selected by using the jModeltest program (ngen = 12,000,000). Nucleotide sequence accession numbers are indicated below.

Nucleotide Sequence Accession Numbers:

US8

BR- I15- KM279031, BR8-KM279032, BR61- KM279033, BR60-KM279034, BR54 - KM279035, BR52- KM279036, BR19 - KM279037, BR18-KM279038, BR16- KM279039, BR15- KM279040, BR12-KM279041, BR 9- KM279042, BR6- KM279043, BR3-KM279044, BR67-KM279045, BR5-KM279046, BR I18- KM279047, BR23- KM279048, BR-10- KM279049, BR 4- KM279050

UL23

BR I15- KM279052, BR68- KM279053, BR61- KM279054, BR60- KM279055, BR54 KM279056, BR 52- KM279057, BR19- KM279058, BR18- KM279059, BR16-KM279060, BR15-KM279061, BR12- KM279062, BR9-KM279063, BR6-KM279064, BR3- KM279065, BR67-KM279066, BR5-KM279067, BR I18- KM279068, BR 23- KM279069, BR10-KM279070, BR4-KM279071, KOS_UL23- KM279051.

UL44

BR5- KM279072, BR I18- KM279074, BR I15- KM279075, BR68-KM279076, BR67- KM279077, BR61- KM279078, BR60- KM279079, BR54-KM279080, BR52-KM279081, BR19-KM279082, BR18-KM279083, BR16-KM279084, BR15- KM279085, BR10- KM279086, BR 9-KM279087, BR6-KM279088, BR4- KM279089, BR3-KM279090, BR23-KM279091, BR12-KM279092

Results

HSV-1 detection and restriction fragment length (RFLP)

HSV-1 DNA was detected in serum samples from HIV-infected patients. In the study population 38.3% (82/214) and 32.71% (70/214) of the samples showed a positive result for PCR specific for gG (269 bp) and gI (410 bp) genes, respectively. Also, 22.8% (49/214) of the patients showed positive result for both the gG and the gI genes.

Positives samples for HSV-1 detection were subjected to genotypic classification based on the RFLP technique, according to published protocols [28, 29]. For the gG gene, the amplicon was not cleaved for isolates belonging to the genotype A, but two fragments were generated (97 and 172 bp) for isolates belonging to the genotype B, and

three fragments were generated (57, 97, and 115 bp) for isolates belonging to the genotype C. For gI gene, the amplicon was not cleaved for isolates belonging to the genotype A, however, two fragments were generated (55 and 355 bp) for genotype B isolates, and three fragments were generated (55, 133, and 222 bp) for genotype C isolates. The RFLP assay demonstrated that 71.95% (59/82) and 61.42% (43/70) of the tested samples confirmed the positive results for gG and gI genes, respectively. All Brazilian strains analyzed in the study were assigned to genotype A for the two genes (gG and gI).

Real Time PCR

Real Time PCR included 214 serum samples of the patients. A linear relationship was obtained between the cycle threshold (Ct) values and the log₁₀ concentration of the HSV-1/2 DNA. The regression analysis yielded a correlation coefficient of 0.99. In this analysis, 29% (62/214) of the serum samples were positive for HSV-1. Viral loads ranged from 2.75×10^2 to 8.78×10^3 copies/mL. None of the analyzed samples tested positive for HSV-2.

Phylogenetic analysis

Twenty serum samples were selected for partial genome amplification of the US8, UL44, and UL23 regions and direct sequencing. Results of samples from HIV-positive patients are shown in Table 2. All HIV-positive patients had been under antiretroviral therapy (ART) for at least one year.

Phylogenetic reconstruction using partial nucleotide sequences of US8 (1601 nt) showed a close relationship of the HSV-1 Brazilian strains from HIV-infected patients with the HSV-1 nucleotide sequences from Europe, North American, African and Asian strains (Figure 1). Thirty-four previously sequenced HSV-1 strains were included in this analysis based on geographic origins [26, 27].

As demonstrated for US8, the Brazilian sequences were aggregated in the same clade. The genetic distances calculated using the nucleotide sequences of US8 (1601 nt) showed a phylogenetic distance between the virus detected in the Brazilian serum samples and the Genbank database listed by NCBI Blast (H129 USA, Strain 17 EUR, NC 001806 EUR) (Figure 1). The nucleotide identity values of Brazilian strains when compared to those strains ranged from 99.5% to 99.9%.

Phylogenetic reconstruction using partial nucleotide sequences of UL44 (1996 nt) is shown in Figure 2. In this analysis, all Brazilian samples aggregated in the same clade. The nucleotide identity values between Brazilian samples for genes US8 and UL44 were higher than 98%. Genetic distances calculated with nucleotide sequences of UL44 (1996 nt) showed a significant phylogenetic distance between the virus detected in Brazilian serum samples and CR38 sample of Asian origin. The nucleotide identity values between Brazilian strains and this strain ranged from 99.4% to 99.9%.

Phylogenetic reconstruction using partial nucleotide sequences of UL23 (1244 nt). The UL23 gene codifies the viral thymidine kinase (TK) and mutations in TK result in resistance to acyclovir (AVC). The mutation in HSV TK result in 95% of the cases of ACV-resistance [32]. These mutations consisted of nucleotide insertions\deletions leading to the shift of the translational reading frame of the UL23 gene, and half of them were in amino acid substitutions [33, 34]. Based on the nucleotide identity analysis, the values found among the Brazilian samples were 98.4-100% and the nucleotide identity values from different samples described in the Genbank were 97.5%-99.9% (Figure 1S – supporting information).

Table 2- Characteristics and molecular information of HIV/HSV-positive samples.

Samples	Gender	Year of collection	of RFLP gG	RFLP gI	Real Time (copies/mL)
BR3	Male	2004	Genotype A	Genotype A	2.05 x 10 ³
BR4	Female	2004	Genotype A	Genotype A	1.98 x 10 ³
BR5	Male	2004	Genotype A	Genotype A	2.72 x 10 ³
BR6	Female	2004	Genotype A	Genotype A	1.01 x 10 ³
BR9	Female	2004	Genotype A	Genotype A	4.26 x 10 ³
BR10	Female	2004	Genotype A	Genotype A	8.78x10 ³
BR12	Male	2003	Genotype A	Genotype A	1.43x10 ³
BR15	Male	2003	-	Genotype A	8.65x10 ³
BR16	Male	2003	Genotype A	Genotype A	1.57x10 ³
BR18	Male	2003	Genotype A	Genotype A	1.06x10 ³

BR19	Male	1988	Genotype A	-	2.52x10 ³
BR23	Female	2000	Genotype A	Genotype A	2.89x10 ³
BR52	Female	1997	Genotype A	Genotype A	1.12x10 ³
BR54	Male	1997	Genotype A	Genotype A	1.17x10 ³
BR60	Male	2004	-	Genotype A	3.56x10 ³
BR61	Male	1988	-	Genotype A	5.29x10 ³
BR67	Female	2004	Genotype A	Genotype A	4.77x10 ³
BR68	Male	2004	Genotype A	Genotype A	4.04x10 ³
BR I15	Male	2012	-	Genotype A	2.94x10 ²
BR I18	Male	2012	-	-	2.75x10 ²

Discussion

Infections caused by HSV-1 and HSV-2 are among the most prevalent viral infections in the world [35]. The HIV/AIDS epidemic is present worldwide and approximately 33 million people are currently living with HIV/AIDS. In Brazil, according to the report of the Epidemiologic Newsletter in 2013 there were 656,701 reported cases of AIDS [36]. Opportunistic infections due to immune deficiency have been recognized as the most common complications of HIV infection and are responsible for hospitalizations and substantial morbidity in infected patients.

The treatment with anti-HSV drugs in HIV-1-positive patients reduces HIV plasma levels and the occurrence of HSV genital ulcers. However, clinical trials of suppressive therapy for HSV-2 (acyclovir) in HSV-2 seropositive individuals have failed to reduce the risk of transmission of HIV-1 to their partners. [37, 38].

In our study, HSV DNA was detected in serum from asymptomatic HIV-positive patients, with a viral load ranging from 2.75×10^2 to 8.78×10^3 copies/mL, showing the shedding of HSV in serum samples of these patients. Detection of HSV DNA using PCR from genital lesions frequently demonstrates HSV in the genital tract of both asymptomatic and symptomatic individuals [39]. In a study with hospitalized patients, HSV DNA was detected by PCR in the peripheral blood of patients with unexplained sepsis syndrome, evidence of hepatitis, and/or CNS infection with fever. Approximately 1/4 of the patients who had HSV detected in the peripheral blood were immunocompetent, and only a minority of patients had mucocutaneous lesions [40].

Despite data provided by PCR, little is known about the frequency and clinical correlates of HSV viremia. Viral dissemination to the bloodstream and visceral disease can be seen in neonates [41] and immunocompromised patients, including those with hematologic malignancies [42] and transplant recipients [43, 44]. HSV viremia is possible, but seems to be limited to primary infections as it has not been detected in a recurrent infection [11]. Unfortunately, in our study it was not possible to know whether patients presented the primary HSV infection. Therefore, more studies are necessary to determine the true prevalence and clinical significance of qualitative and quantitative detection of HSV DNA in serum and/or peripheral blood of the HIV-positive patients.

HSV DNA detection was confirmed by RFLP analysis of the gG and gI genes and through a complete sequencing of the US8, UL44, and UL23 genes. The study on HSV-1 sequences using RFLP can be used for screening and genotyping. RFLP analysis demonstrated the stable presence of genotype A in the Brazilian samples. Previous studies revealed that HSV-1 strains can vary according to geographic region [27] and demonstrated the stable presence of genotype A in the majority of strains [31].

Recent studies by Kolb in 2013 and Spzara in 2014 [26, 27] demonstrated the presence of geographical clustering and they divided the samples into three continental groups (Asia, Africa, North America and Europe) after whole genome analysis. Although these studies have shown that multiple genomes can be sequenced at the same time using the Illumina platform [26, 27], the sequences of the HSV-positive samples were isolated from cell culture. In our study, HSV-1 DNA was directly isolated from serum samples with low viral load. Concerning the US8 gene, previous phylogenetic analysis revealed three main genetic groups, the A, B, and C genogroups, demonstrating the presence of tree subclades and confirmed their European origin [26, 47]. The Brazilian samples were compared to samples described in Europe, North America, Africa and Asia and were classified into the group A. In the analysis of the US8 region, the Brazilian samples were grouped, with exception of the strain KM279050-BR4 that was more related to samples described in Europe, United States, and Asia. Phylogenetic studies on the short unique region of the genome demonstrated a three clade pattern for HSV-1 in US8 gene, as well as in US1, US4, and US7 [29, 45, 46], in which the classification was supported by high bootstrap values [29].

The US and UL regions have a large number of recombination events attributed to the distance between these two regions. In our study, phylogenetic analysis of UL44 showed that the Brazilian samples were aggregated in the same clade with nucleotide variations at position 1114 T>C, and changes in the position of the amino acids were

also observed. The analysis of the US8 and UL44 genes separated the Brazilian samples into clades with high posterior probabilities (pp).

Information on mutations in the TK and DNA pol genes of HSV-1 are relevant for antiviral treatment outcomes [3], especially in immunocompromised patients. HSV isolates resistant to ACV have no clinical relevance in immunocompetent persons, however, the prevalence of HSV infections with reduced susceptibility to ACV varies between 3.5% and 7.1% in immunocompromised patients [48]. The best method to verify the unique role of mutations that contribute to HSV resistance is genotype analysis of the viral isolates [3] and the sequencing of UL23 gene, that is highly conserved [49]. In our study, the nucleotide identity values between the Brazilian strains were higher than 98% and mutations in the TK gene that might confer resistance to ACV were not found in the sequenced HSV strains.

Both techniques used in the present study, RFLP and nucleotide sequencing, demonstrated the presence of a unique HSV-1 genotype distribution that has been stable within Brazil for 24 years (1988 to 2012); phylogenetic analysis using US8, UL44, and UL23 demonstrated that the Brazilian samples (South American) are aggregated into a single clade with only Brazilian strains. The genotypic characterization of HSV-1 isolates from patients enrolled in our study reflects the HIV-positive patients of the Rio de Janeiro population, thus not reflecting as a whole the diversity of patients living in other regions of the country. The samples from Rio de Janeiro patients were related to each other with high posterior probabilities in all genes analyzed. Data on the prevalence of HSV-1 in Germany demonstrated a stable distribution of the A and B genotypes for a period of 10 years [10]. A study based on the quantitative assessment of genomic polymorphisms in strains of HSV-1 in six countries, three Asian and three non-Asian in origin, concluded that the evolutionary pattern was similar between these ethnic groups, and that the variability found in Asian samples was lower when compared to non-Asian samples [50]. HSV-1 phylogenetic analysis studies have suggested a substitution rate of approximately 1.38×10^{-7} subs/site/year [26]. By comparing Brazilian samples with other samples described in the Genbank, we found nucleotide identity values between 96% and 100% for the US8, UL44, and UL23 genes.

In conclusion, our study showed the circulation of HSV-1 in HIV-positive patients without HSV infection symptoms, which confirmed HSV shedding in immunocompromised patients and demonstrated that Brazilian isolates are grouped in the same clade with a low nucleotide variation in the genes US8, UL44, and UL23.

Acknowledgments

The authors are grateful to Drs. Jonas Schmidt-Chanasit and Daniel Cadar (Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Hamburg, Germany) for support with sample sequencing, primer design, and for their valuable scientific contributions to this study.

Author Contributions

APS and VSP designed the project. APS, AOL, and YRV performed the experiments. APS, YRV, DC, JSC, and VSP analyzed the data. AJA, FSS, BG, SW, and VSP all contributed with reagents/material/material tools. APS, AJA, VSP and YRV wrote the manuscript.

References

1. Roizman B, Knipe D, Whitley R. Herpes Simplex Viruses. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields Virology*. two: Wolters Kluwer Health 2013. p. 2456.
2. Chakraborty N, Bhattacharyya S, De C, Mukherjee A, Bhattacharya D, Santra S, et al. Incidence of multiple Herpesvirus infection in HIV seropositive patients, a big concern for Eastern Indian scenario. *Virology*. 2010;7:147. doi: 10.1186/1743-422X-7-147. PubMed PMID: 20604948; PubMed Central PMCID: PMC2909198.
3. Schubert A, Gentner E, Bohn K, Schwarz M, Mertens T, Sauerbrei A. Single nucleotide polymorphisms of thymidine kinase and DNA polymerase genes in clinical herpes simplex virus type 1 isolates associated with different resistance phenotypes. *Antiviral Res.* 2014;107:16-22. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.03.015. PubMed PMID: 24747042.
4. Mertz GJ, Rosenthal SL, Stanberry LR. Is herpes simplex virus type 1 (HSV-1) now more common than HSV-2 in first episodes of genital herpes? *Sex Transm Dis.* 2003;30(10):801-2. doi: 10.1097/01.OLQ.0000093080.55201.D1. PubMed PMID: 14520182.
5. Stanberry L, Cunningham A, Mertz G, Mindel A, Peters B, Reitano M, et al. New developments in the epidemiology, natural history and management of genital herpes. *Antiviral Res.* 1999;42(1):1-14. PubMed PMID: 10333138.
6. Schomogyi M, Wald A, Corey L. Herpes simplex virus-2 infection. An emerging disease? *Infect Dis Clin North Am.* 1998;12(1):47-61. PubMed PMID: 9494829.

7. Xu F, Sternberg MR, Kottiri BJ, McQuillan GM, Lee FK, Nahmias AJ, et al. Trends in herpes simplex virus type 1 and type 2 seroprevalence in the United States. *JAMA*. 2006;296(8):964-73. doi: 10.1001/jama.296.8.964. PubMed PMID: 16926356.
8. Chayavichitsilp P, Buckwalter JV, Krakowski AC, Friedlander SF. Herpes simplex. *Pediatr Rev*. 2009;30(4):119-29; quiz 30. doi: 10.1542/pir.30-4-119. PubMed PMID: 19339385.
9. Roizman B TB, Editors. The strategy of herpes simplex virus replication and takeover of the host cell. Arvin A C-FG, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K, editors., editor. Chapter 13.2007.
10. Schmidt-Chanasit J, Bialonski A, Heinemann P, Ulrich RG, Günther S, Rabenau HF, et al. A 10-year molecular survey of herpes simplex virus type 1 in Germany demonstrates a stable and high prevalence of genotypes A and B. *J Clin Virol*. 2009;44(3):235-7. doi: 10.1016/j.jcv.2008.12.016. PubMed PMID: 19186100.
11. Juhl D, Mosel C, Nawroth F, Funke AM, Dadgar SM, Hagenström H, et al. Detection of herpes simplex virus DNA in plasma of patients with primary but not with recurrent infection: implications for transfusion medicine? *Transfus Med*. 2010;20(1):38-47. doi: 10.1111/j.1365-3148.2009.00951.x. PubMed PMID: 19708895.
12. Johnston C, Magaret A, Selke S, Remington M, Corey L, Wald A. Herpes simplex virus viremia during primary genital infection. *J Infect Dis*. 2008;198(1):31-4. doi: 10.1086/588676. PubMed PMID: 18471083.
13. van Velzen M, Ouwendijk WJ, Selke S, Pas SD, van Loenen FB, Osterhaus AD, et al. Longitudinal study on oral shedding of herpes simplex virus 1 and varicella-zoster virus in individuals infected with HIV. *J Med Virol*. 2013;85(9):1669-77. doi: 10.1002/jmv.23634. PubMed PMID: 23780621; PubMed Central PMCID: PMC4020591.
14. Sauerbrei A, Pfaff F, Zell R, Wutzler P. Prevalence of herpes simplex virus type 1 glycoprotein G (gG) and gI genotypes in patients with different herpetic diseases during the last four decades. *J Med Virol*. 2012;84(4):651-6. doi: 10.1002/jmv.23223. PubMed PMID: 22337305.
15. Harel L, Smetana Z, Prais D, Book M, Alkin M, Supaev E, et al. Presence of viremia in patients with primary herpetic gingivostomatitis. *Clin Infect Dis*. 2004;39(5):636-40. doi: 10.1086/422643. PubMed PMID: 15356775.
16. Magaret AS, Wald A, Huang ML, Selke S, Corey L. Optimizing PCR positivity criterion for detection of herpes simplex virus DNA on skin and mucosa. *J Clin*

- Microbiol. 2007;45(5):1618-20. doi: 10.1128/JCM.01405-06. PubMed PMID: 17329447; PubMed Central PMCID: PMC1865863.
17. Wald A, Huang ML, Carrell D, Selke S, Corey L. Polymerase chain reaction for detection of herpes simplex virus (HSV) DNA on mucosal surfaces: comparison with HSV isolation in cell culture. *J Infect Dis.* 2003;188(9):1345-51. doi: 10.1086/379043. PubMed PMID: 14593592.
 18. Sheldrick P, Berthelot N. Inverted repetitions in the chromosome of herpes simplex virus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1975;39 Pt 2:667-78. PubMed PMID: 169022.
 19. Wadsworth S, Jacob RJ, Roizman B. Anatomy of herpes simplex virus DNA. II. Size, composition, and arrangement of inverted terminal repetitions. *J Virol.* 1975;15(6):1487-97. PubMed PMID: 167196; PubMed Central PMCID: PMC354616.
 20. Umene K, Sakaoka H. Evolution of herpes simplex virus type 1 under herpesviral evolutionary processes. *Arch Virol.* 1999;144(4):637-56. PubMed PMID: 10365158.
 21. Dutch RE, Bianchi V, Lehman IR. Herpes simplex virus type 1 DNA replication is specifically required for high-frequency homologous recombination between repeated sequences. *J Virol.* 1995;69(5):3084-9. PubMed PMID: 7707536; PubMed Central PMCID: PMC189009.
 22. Taylor TJ, Knipe DM. Proteomics of herpes simplex virus replication compartments: association of cellular DNA replication, repair, recombination, and chromatin remodeling proteins with ICP8. *J Virol.* 2004;78(11):5856-66. doi: 10.1128/JVI.78.11.5856-5866.2004. PubMed PMID: 15140983; PubMed Central PMCID: PMC415816.
 23. Sauerbrei A, Deinhardt S, Zell R, Wutzler P. Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant clinical isolates of herpes simplex virus. *Antiviral Res.* 2010;86(3):246-52. doi: 10.1016/j.antiviral.2010.03.002. PubMed PMID: 20211650.
 24. 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. *J Virol.* 2001;75(7):3105-10. doi: 10.1128/JVI.75.7.3105-3110.2001. PubMed PMID: 11238837; PubMed Central PMCID: PMC114104.
 25. Morfin F, Thouvenot D. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. *J Clin Virol.* 2003;26(1):29-37. PubMed PMID: 12589832.

26. Kolb AW, Ané C, Brandt CR. Using HSV-1 genome phylogenetics to track past human migrations. *PLoS One*. 2013;8(10):e76267. doi: 10.1371/journal.pone.0076267. PubMed PMID: 24146849; PubMed Central PMCID: PMC3797750.
27. Szpara ML, Gatherer D, Ochoa A, Greenbaum B, Dolan A, Bowden RJ, et al. Evolution and diversity in human herpes simplex virus genomes. *J Virol*. 2014;88(2):1209-27. doi: 10.1128/JVI.01987-13. PubMed PMID: 24227835; PubMed Central PMCID: PMC3911644.
28. Norberg P, Bergström T, Liljeqvist JA. Genotyping of clinical herpes simplex virus type 1 isolates by use of restriction enzymes. *J Clin Microbiol*. 2006;44(12):4511-4. doi: 10.1128/JCM.00421-06. PubMed PMID: 17035491; PubMed Central PMCID: PMC1698414.
29. Norberg P, Bergström T, Rekadbar E, Lindh M, Liljeqvist JA. Phylogenetic analysis of clinical herpes simplex virus type 1 isolates identified three genetic groups and recombinant viruses. *J Virol*. 2004;78(19):10755-64. doi: 10.1128/JVI.78.19.10755-10764.2004. PubMed PMID: 15367642; PubMed Central PMCID: PMC516408.
30. Trybala E, Roth A, Johansson M, Liljeqvist JA, Rekadbar E, Larm O, et al. Glycosaminoglycan-binding ability is a feature of wild-type strains of herpes simplex virus type 1. *Virology*. 2002;302(2):413-9. PubMed PMID: 12441085.
31. Harishankar A, Jambulingam M, Gowrishankar R, Venkatachalam A, Vetrivel U, Ravichandran S, et al. Phylogenetic comparison of exonic US4, US7 and UL44 regions of clinical herpes simplex virus type 1 isolates showed lack of association between their anatomic sites of infection and genotypic/sub genotypic classification. *Viol J*. 2012;9:65. doi: 10.1186/1743-422X-9-65. PubMed PMID: 22416856; PubMed Central PMCID: PMC3359161.
32. Piret J, Boivin G. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(2):459-72. doi: 10.1128/AAC.00615-10. PubMed PMID: 21078929; PubMed Central PMCID: PMC3028810.
33. Gaudreau A, Hill E, Balfour HH, Erice A, Boivin G. Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant herpes simplex viruses from immunocompromised patients. *J Infect Dis*. 1998;178(2):297-303. PubMed PMID: 9697707.
34. 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. *J Infect Dis.* 2000;182(1):290-3. doi: 10.1086/315696. PubMed PMID: 10882609.
35. Clemens SA, Farhat CK. Seroprevalence of herpes simplex 1-2 antibodies in Brazil. *Rev Saude Publica.* 2010;44(4):726-34. PubMed PMID: 20676563.
36. Aids in Brazil 2013 [cited 2014]. Available from: <http://www.aids.gov.br/pagina/aids-no-brasil>.
37. Celum C, Wald A, Hughes J, Sanchez J, Reid S, Delany-Moretlwe S, et al. Effect of aciclovir on HIV-1 acquisition in herpes simplex virus 2 seropositive women and men who have sex with men: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2008;371(9630):2109-19. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60920-4. PubMed PMID: 18572080; PubMed Central PMCID: PMCPMC2650104.
38. Celum C, Wald A, Lingappa JR, Magaret AS, Wang RS, Mugo N, et al. Acyclovir and transmission of HIV-1 from persons infected with HIV-1 and HSV-2. *N Engl J Med.* 2010;362(5):427-39. doi: 10.1056/NEJMoa0904849. PubMed PMID: 20089951; PubMed Central PMCID: PMCPMC2838503.
39. Schiffer JT, Corey L. New concepts in understanding genital herpes. *Curr Infect Dis Rep.* 2009;11(6):457-64. PubMed PMID: 19857385; PubMed Central PMCID: PMCPMC2804398.
40. Berrington WR, Jerome KR, Cook L, Wald A, Corey L, Casper C. Clinical correlates of herpes simplex virus viremia among hospitalized adults. *Clin Infect Dis.* 2009;49(9):1295-301. doi: 10.1086/606053. PubMed PMID: 19807272; PubMed Central PMCID: PMCPMC2803101.
41. Stanberry LR, Floyd-Reising SA, Connelly BL, Alter SJ, Gilchrist MJ, Rubio C, et al. Herpes simplex viremia: report of eight pediatric cases and review of the literature. *Clin Infect Dis.* 1994;18(3):401-7. PubMed PMID: 8011823.
42. Muller SA, Herrmann EC, Winkelmann RK. Herpes simplex infections in hematologic malignancies. *Am J Med.* 1972;52(1):102-14. PubMed PMID: 4550795.
43. Johnson JR, Egaas S, Gleaves CA, Hackman R, Bowden RA. Hepatitis due to herpes simplex virus in marrow-transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 1992;14(1):38-45. PubMed PMID: 1571460.
44. Kusne S, Schwartz M, Breinig MK, Dummer JS, Lee RE, Selby R, et al. Herpes simplex virus hepatitis after solid organ transplantation in adults. *J Infect Dis.* 1991;163(5):1001-7. PubMed PMID: 1850439; PubMed Central PMCID: PMCPMC2956417.

45. Kolb AW, Schmidt TR, Dyer DW, Brandt CR. Sequence variation in the herpes simplex virus U(S)1 ocular virulence determinant. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(7):4630-8. doi: 10.1167/iovs.10-7032. PubMed PMID: 21519032; PubMed Central PMCID: PMC3175936.
46. Norberg P, Tyler S, Severini A, Whitley R, Liljeqvist J, Bergström T. A genome-wide comparative evolutionary analysis of herpes simplex virus type 1 and varicella zoster virus. *PLoS One.* 2011;6(7):e22527. doi: 10.1371/journal.pone.0022527. PubMed PMID: 21799886; PubMed Central PMCID: PMC3143153.
47. Kolb AW, Adams M, Cabot EL, Craven M, Brandt CR. Multiplex sequencing of seven ocular herpes simplex virus type-1 genomes: phylogeny, sequence variability, and SNP distribution. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(12):9061-73. doi: 10.1167/iovs.11-7812. PubMed PMID: 22016062; PubMed Central PMCID: PMC3231845.
48. Bacon TH, Levin MJ, Leary JJ, Sarisky RT, Sutton D. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(1):114-28. PubMed PMID: 12525428; PubMed Central PMCID: PMC145299.
49. Burrell S, Deback C, Agut H, Boutolleau D. Genotypic characterization of UL23 thymidine kinase and UL30 DNA polymerase of clinical isolates of herpes simplex virus: natural polymorphism and mutations associated with resistance to antivirals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(11):4833-42. doi: 10.1128/AAC.00669-10. PubMed PMID: 20733037; PubMed Central PMCID: PMC2976144.
50. Sakaoka H, Kurita K, Iida Y, Takada S, Umene K, Kim YT, et al. Quantitative analysis of genomic polymorphism of herpes simplex virus type 1 strains from six countries: studies of molecular evolution and molecular epidemiology of the virus. *J Gen Virol.* 1994;75 (Pt 3):513-27. PubMed PMID: 8126449.

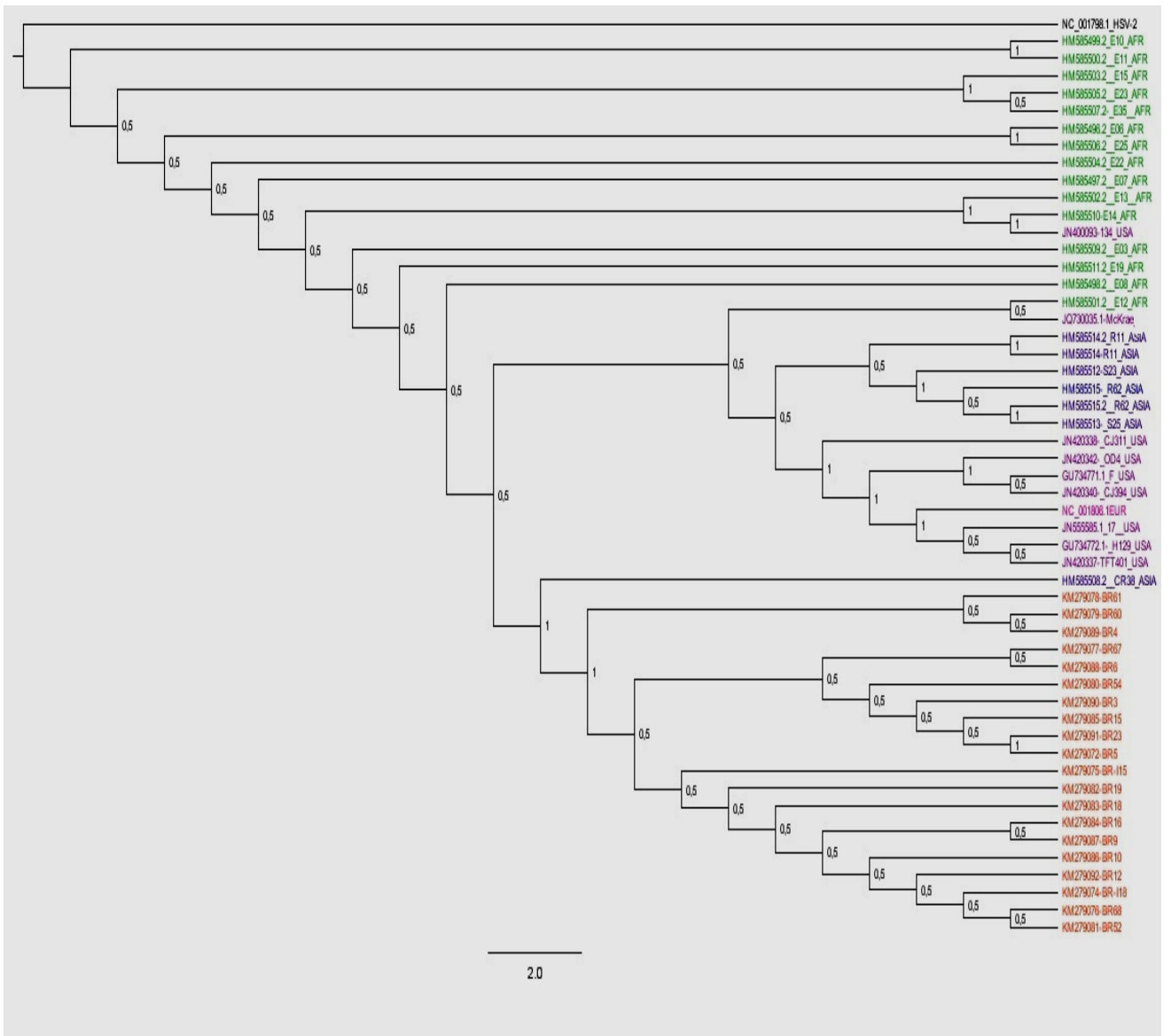


Figure 1. The Bayesian phylogenetic tree constructed by using nucleotide sequence of US8 coding region (1601 bp). The GenBank accession number is shown for each sequence used. Posterior probabilities are shown at the branch label. Brazilian sequences are noted in red. Color code: Africa - Green, Asia - Blue, Europe - Pink, United States - purple, Brazil - red.

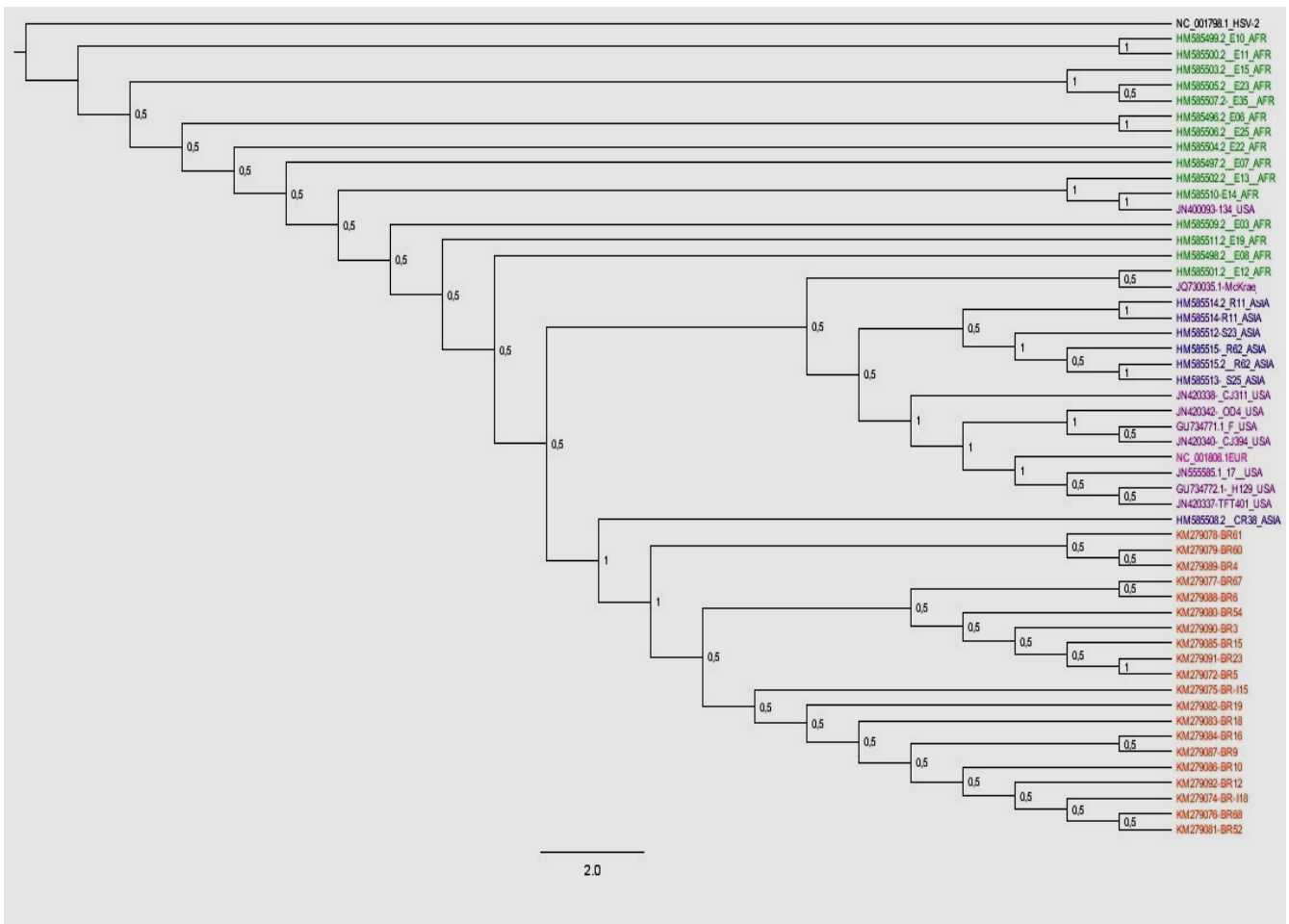
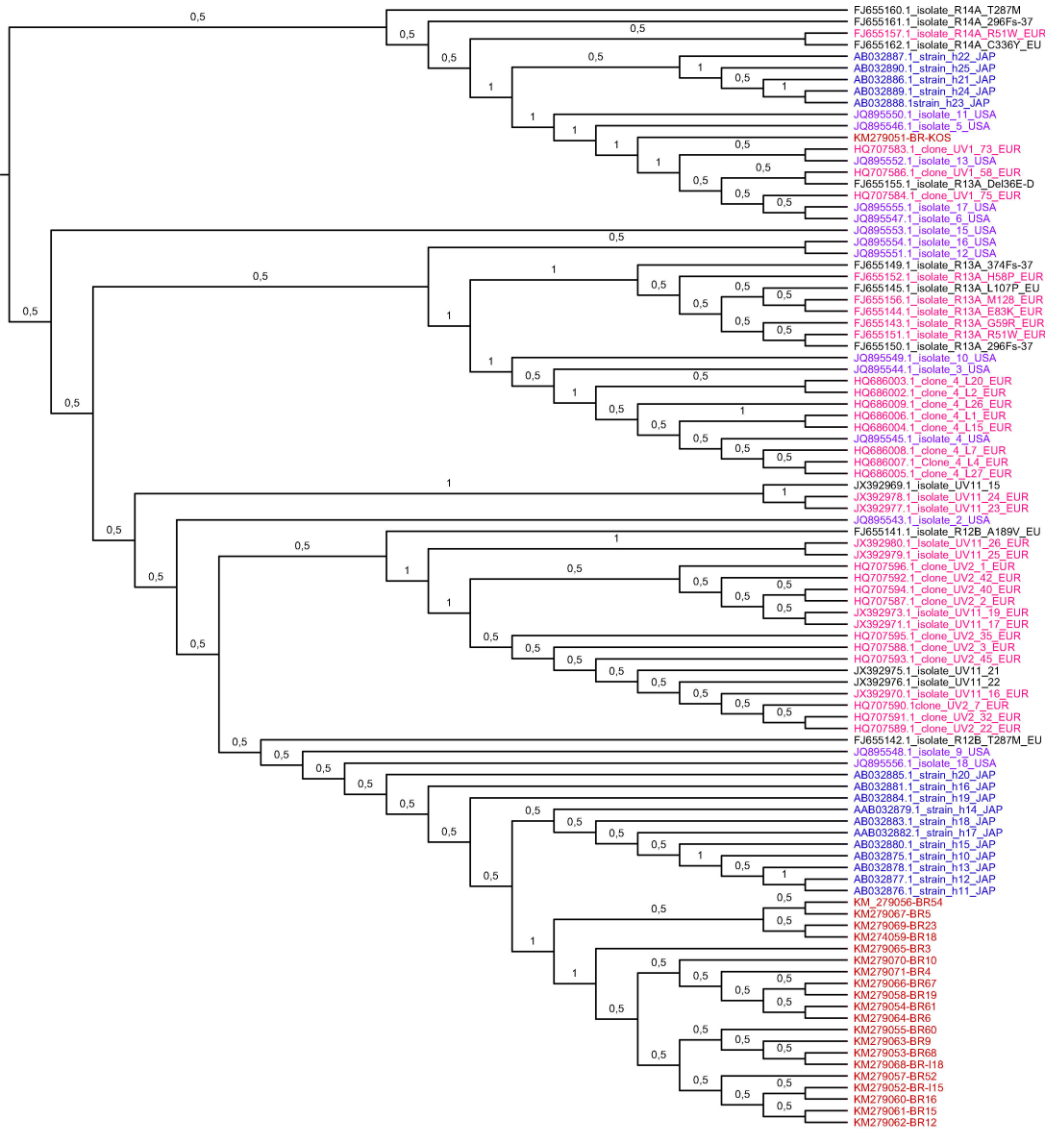


Figure 2. The Bayesian phylogenetic tree constructed by using nucleotide sequence of UL44 (1996 bp). The GenBank accession number is shown for each sequence used. Posterior probabilities are shown at the branch label. Brazilian sequences are noted in red. Color code: Africa - Green, Asia - Blue, Europe - Pink, United States - purple, Brazil - red.

Supporting Information



Supporting Information

Figure S1- The Bayesian phylogenetic tree constructed by using nucleotide sequence of UL23 region. The GenBank accession number is shown for each sequence used. Posterior probabilities are shown at the branch label. Brazilian sequences are noted in red.

4.3 Artigo III

Breve Contextualização e metas alcançadas

O HHV-6 é um vírus da família *Herpesviridae* pertencentes a subfamília *Betaherpesvirinae*. A infecção por HHV-6 é uma das mais prevalentes em todo o mundo e infecta crianças até dois anos de idade. Pouco se conhece sobre as propriedades de latência do HHV-6, porém acredita-se que sua ocorrência seja comum em indivíduos imunocomprometidos e imunossuprimidos, principalmente nos casos relacionados a transplante de órgãos. Neste estudo, foi realizado o diagnóstico e identificação do HHV-6B em um paciente com hepatite fulminante sem etiologia definida. Foi possível co-relacionar e identificar os fatores que contribuíram para o desenvolvimento de uma hepatite fulminante neste paciente, tais como: elevação das alanina transaminase e aspartato transaminase, e na biópsia do fígado foi possível encontrar uma moderada infiltração linfoplasmocitária entre o parênquima e o trato portal, além de uma colestase intra-hepática severa e fibrosa. Os dados encontrados neste trabalho mostram a importância do diagnóstico para os herpesvírus em pacientes com hepatite fulminante sem diagnóstico definido.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcv



Virology Question and Answer Scheme (VIROQAS)

Acute liver failure in an immunocompetent patient



Vanessa Salete de Paula^{a,*}, Amanda Perse da Silva^a, Detlef Michel^b, Juliana Gil Melgaço^a, Yasmine Rangel Vieira^a, Damião Carlos dos Santos^a, Cristina Carvalho Viana de Araújo^c, Lucio Filgueiras Pacheco-Moreira^c, Marcelo Pelajo-Machado^d, Cristina Moreira do Nascimento^c, Jonas Schmidt-Chanasit^{e,1}, Marcelo Alves Pinto^{a,1}

^a Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Rio de Janeiro, Brazil

^b Institut für Virologie, Universitätsklinikum Ulm, Ulm, Germany

^c Hospital Geral de Bonsucesso, Rio de Janeiro, Brazil

^d Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Patologia, Rio de Janeiro, Brazil

^e Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, WHO Collaborating Centre for Arbovirus and Haemorrhagic Fever Reference and Research, Hamburg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 February 2014

Received in revised form 10 March 2014

Accepted 14 March 2014

Case presentation

A 14-year-old immunocompetent female showed clinical signs of severe hepatitis. The diagnosis of hepatic encephalopathy was by clinical signs and symptoms: reduction of consciousness, mental confusion, and hepatomegaly, edema in upper and lower limbs during physical examination. Clinical chemistry revealed total and direct bilirubin of 49.9 mg/dl (normal 0.1–1.2 mg/dl) and 31 (<0.4 mg/dl) respectively, alanine transaminase (ALT) levels of 1393 U/L (<50 U/L) and aspartate transaminase (AST) levels of 1773 U/L (<36 U/L), and severe diminished prothrombin activity.

There was no evidence for an acute or chronic infection due to HIV, CMV, hepatitis A, B, C and E. The case was classified as fulminate hepatic failure (FHF) grade III according to King's College Criteria. Three days after hospitalization the patient received a transplanted liver. This was due to the rapidly progressive nature of the liver damage (Fig. 1). Analysis of inflammatory cytokines levels demonstrated elevation of interleukin 8 (IL-8): 3631 pg/ml (normal value: <16 pg/ml); IL-10: 8976 pg/ml (normal value: 3.96 pg/ml) and IL-6: 733.08 pg/ml (normal value: 30.2 pg/ml); interferon gamma (IFN- γ): 41 pg/ml (normal value: 3.53 pg/ml); and tumoral necrosis factor alfa (TNF- α): 5263 pg/ml (normal value: 1056 pg/ml). The

* Corresponding author at: Oswaldo Cruz Foundation, IOC – Av. Brasil, 4365-Manguinhos, Pav. Helió e Peggy Pereira B219, Rio de Janeiro, Brazil.

Tel.: +55 2125621876.

E-mail addresses: vdepaula@ioc.fiocruz.br, vdepaula.fiocruz@gmail.com

(V.S. de Paula).

¹ These authors contributed equally to this study.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.03.008>

1386-6532/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

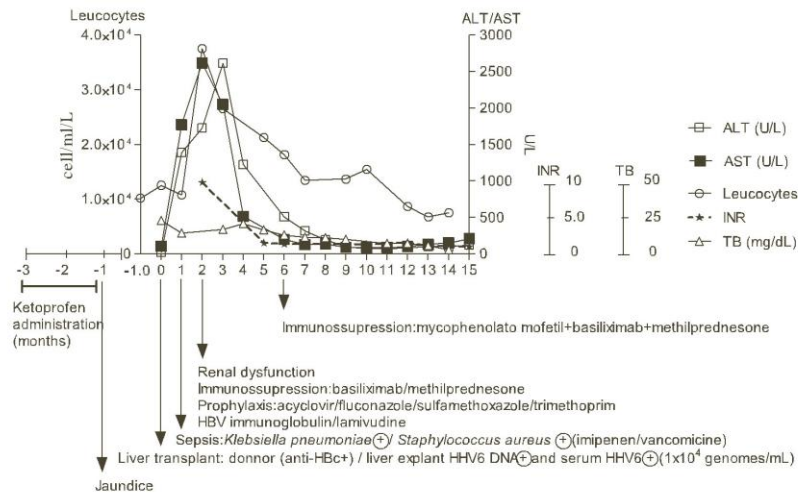


Fig. 1. Summary of laboratorial and clinical finds detected in a patient with autoimmune hepatitis that evolves to fulminant liver failure with the presence of HHV-6B.

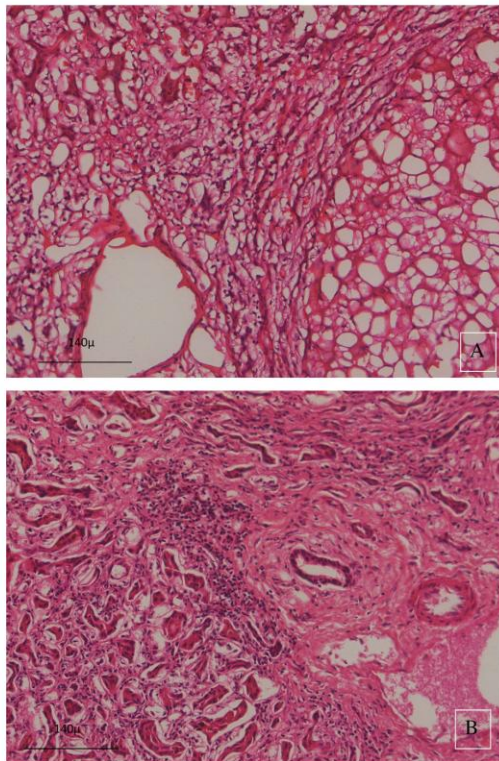


Fig. 2. Acute liver failure associated with HHV6 subtype B infection. (A) Enlarged intra-hepatic septum and hepatocytes proliferation. (B) Mononuclear cells infiltrated in portal tract (Zeiss Axio Observer Z1, camera Axiocam MRc5).

histopathological analysis of liver samples demonstrated subcapsular hemorrhage, changes in acinar structure associated with ductal proliferation in zone 1, 2 and 3 associated with changes in the reticular network of the liver. Clusters of residual hepatocytes presented tumefaction with poor macro- and microvesicular fatty changes, moderate lymphoplasmocytic infiltration in parenchyma and portal tract, and severe intrahepatic cholestasis and fibrosis (Fig. 2).

Which are the diagnostic possibilities in this case?

See evidence-based opinion overleaf

Virology Question and Answer Scheme (VIROQAS)

Evidence-based opinion

Which are the diagnostic possibilities in this case?

These findings were compatible with submassive liver necrosis, suggesting an autoimmune hepatitis (AIH). However, the serology was negative for AIH. Autoimmune hepatitis has a variable clinical phenotype, and the absence of conventional autoantibodies does not preclude its diagnosis. The frequency is autoimmune hepatitis in patients with acute and acute severe presentations is <7% [1]. In order to further elucidate the etiology of the fulminate hepatitis, the nucleic acid from serum and liver transplantation was extracted using the RTP DNA/RNA Virus Mini kit II. Genus- and family-specific RT-PCRs and PCRs for flavi-, rhabdo-, orthobunya-, nairo-, arena-, filo-, alpha, picorna-, paramyxo- and herpesviruses were performed. All reactions were negative except the pan-herpesvirus consensus PCR [2]. Direct sequencing of DNA polymerase gene confirmed the presence of HHV-6 and a type specific PCR for HHV-6 [3] followed by sequencing confirmed the presence of HHV-6B in serum and liver samples. Additionally, the HHV-6B DNA was quantitated [4] and showed 1×10^4 genomes/ml.

Active HHV-6B infections are associated with primary infections, reactivations or exogenous reinfections. The HHV-6 integrates into the human genome and can reactivate as an active infection. The expression of clinical symptoms is variable among immunocompromised patients but can be extremely severe [5]. AIH affects both adults and children and may induce acute or chronic hepatitis, cirrhosis and finally liver failure, unless immunosuppressive treatment is started promptly. For those with advanced-stage disease and complications, consideration of liver transplantation is appropriate [6]. Hepatitis associated with HHV-6 infection was already described previously [7,8]. In the current case, a portal lymphoplasmocytic infiltration and fibrosis was demonstrated in the liver explant despite the absence of reactivity to auto antibodies. These are common histopathological findings in autoimmune hepatitis [9]. Thus, the observed active HHV-6B infection may be considered as a co-factor of the AIH that led to FHF. The patient died 20 days after liver transplantation due to severe sepsis and septic shock. HHV-6B infection can contribute to severe liver inflammation and decompensation of chronic liver disease [10]. The inflammatory status was marked by excessive production of inflammatory cytokines with TNF- α (14X); IL-8 (2X); IL-6 (10X), IFN- γ (3.8X) IL-10 (22X). The increase of cytokines has been described in other FHF patients [11]. Autoimmune hepatitis is rare in children but it represents a serious cause of chronic hepatic disease that can lead to cirrhosis and hepatic failure. The pathogenic mechanisms that lead to AIH remain obscure [12]. Onset of the disease may be acute with features of liver failure at the time of presentation. Several viruses have been considered to be triggers of autoimmunity and overt autoimmune disease. The virus specific evasion mechanism called "molecular mimicry" has been noted in AIH and the interactions of viruses with the immune system serve as an accelerating factor of disease pathogenesis [6,12].

HHV-6B can contribute to acute liver dysfunction and induce FHF in patients with an autoimmune hepatitis. HHV-6 screening should be included in the diagnosis of patients with liver failure.

Funding

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior 9070-11-7.

Competing interests

None.

Ethical approval

Fundação Oswaldo Cruz: CAE 222/03.

Acknowledgments

The authors wish to thank Liver Transplant Group of Bonsucesso Federal Hospital – Brazilian Health Ministry, CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, by financial support (Grant number: 9070-11-7)

References

- [1] Czaja AJ. Autoantibody-negative autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 2012;57:610–24.
- [2] Ehlers B, Borchers K, Grund C, Frölich K, Ludwig H, Buhk HJ. Detection of new DNA polymerase genes of known and potentially novel herpesviruses by PCR with degenerate and deoxyinosine-substituted primers. *Virus Genes* 1999;18:211–20.
- [3] Achour A, Malet I, Le Gal F, Dehée A, Gautheret-Dejean A, Bonnafous P, et al. Variability of gB and gH genes of human herpesvirus-6 among clinical specimens. *J Med Virol* 2008;80:1211–21.
- [4] Sassenscheidt J, Rohayem J, Illmer T, Bandt D. Detection of beta-herpesviruses in allogeneic stem cell recipients by quantitative real-time PCR. *J Virol Methods* 2006;138:40–8.
- [5] Agut H. Deciphering the clinical impact of acute human herpesvirus 6 (HHV-6) infections. *J Clin Virol* 2011;52:164–71.
- [6] Gossard AA, Lindor KD. Autoimmune hepatitis: a review. *J Gastroenterol* 2012;47:498–503.
- [7] Grima P, Chiavaroli R, Calabrese P, Tundo P. Severe hepatitis with autoimmune features following a HHV-6: a case report. *Cases J* 2008;1:10.
- [8] Tronconi GM, Mariani B, Pajno R, Fomasi M, Cococcioni L, Biffi V, et al. Acute liver failure due to human herpesvirus 6 in an infant. *Pediatr Med Chir* 2012;34:229–33.
- [9] Duclos-Vallée JC, Sebah M, Rifai K, Johanet C, Ballot E, Guettier C, et al. A 10 year follow up study of patients transplanted for autoimmune hepatitis: histological recurrence precedes clinical and biochemical recurrence. *Gut* 2003;52:893–7.
- [10] Chevret L, Boutolleau D, Halimi-Idri N, Branchereau S, Baujard C, Fabre M, et al. Human herpesvirus-6 infection: a prospective study evaluating HHV-6 DNA levels in liver from children with acute liver failure. *J Med Virol* 2008;80:1051–7.
- [11] dos Santos DC, da Silva Gomes Martinho JM, Pacheco-Moreira LF, Carvalho Viana de Araújo C, Caroli-Bottino A, Pannain VL, et al. Eosinophils involved in fulminant hepatic failure are associated with high interleukin-6 expression and absence of interleukin-5 in liver and peripheral blood. *Liver Int* 2009;29:544–51.
- [12] Liberal R, Grant CR, Mieli-Vergani G, Vergani D. Autoimmune hepatitis: a comprehensive review. *J Autoimmun* 2013;41:126–39.

5. DISCUSSÃO

A infecção pelos herpesvírus é uma das mais prevalentes em todo o mundo. No Brasil, a cada ano 640.000 novos casos de herpes genital são diagnosticados (AIDS, 2013). A prevalência da infecção pelo HSV-1 na população brasileira é de 67,2%, e de HSV-2 é de 11,3%, sendo esta última mais predominante em jovens (Clemens e Farhat, 2014; Ministério da Saúde, 2014). Dados da Organização Mundial de Saúde estimam que no Brasil, na população sexualmente ativa, 640.900 pessoas desenvolvem herpes genital a cada ano (OMS, 2014). Estudos com saliva de indivíduos saudáveis do Rio de Janeiro demonstrou a presença de HHV-6 em 9,8% das amostras analisadas (Magalhães *et al.*, 2010).

A presente tese foi composta de manuscritos, previamente apresentados. Este estudo demonstrou a presença dos herpesvírus em pacientes imunocomprometidos em diferentes aspectos metodológicos utilizados para a detecção e caracterização molecular do HSV-1 e HHV-6 e a utilização da técnica de RNAi para o silenciamento gênico do HSV-1 “*in vitro*”.

No primeiro artigo, intitulado “RNA interference inhibits herpes simplex virus type 1 isolated from saliva samples and mucocutaneous lesions”, foi possível realizar a comparação entre as técnicas de isolamento viral e a reação de PCR em tempo real, realizando o diagnóstico, detecção e quantificação do HSV-1 em diferentes tipos de amostras (amostras clínicas e amostras provenientes de cultura celular). O objetivo inicial deste trabalho foi a otimização de técnicas para a melhora da detecção do HSV-1 em diferentes amostras clínicas, comparando esta detecção em pacientes que apresentaram lesões clínicas características desta virose, através da técnica de isolamento viral, considerada como padrão-ouro para o diagnóstico do HSV e reação de PCR em tempo real através do sistema Syber Green. Durante este estudo foram coletadas 6 amostras de pacientes sintomáticos para HSV-1.

Dos pacientes analisados, 3 apresentaram lesões típicas do HSV-1 na mucosa oral e 1 apresentou lesão típica do HSV na mucosa genital. Cinco destes pacientes pertenciam ao sexo feminino e 1 paciente era do sexo masculino. Em 2 destes pacientes não foi possível a coleta da lesão ativa. Os pacientes analisados apresentaram idades variando de 25 a 60 anos de idade. Este estudo possibilitou a otimização da reação de PCR em tempo real em diferentes tipos de amostras, tais como: lesões mucocutâneas,

saliva e amostras de cultura celular. A detecção do HSV-1 na saliva se mostrou particularmente importante, pois a maioria dos indivíduos infectados com este vírus, apesar de serem indivíduos assintomáticos, permanece produzindo partículas virais (Liljeqvist, Tunback e Norberg, 2009), o que caracteriza uma das formas de transmissão desta virose (Scott, Coulter e Lamey, 1997). Estudos anteriores com saliva de pacientes detectaram a presença do HSV-1 na saliva, mesmo em períodos de ausência da lesão mostrando que a saliva poderá contribuir substancialmente para a transmissão do HSV-1 (Scott, Coulter e Lamey, 1997; Liljeqvist, Tunbäck e Norberg, 2009)

Um diagnóstico acurado e preciso da infecção pelos HSVs é importante porque permite o uso correto das ferramentas clínicas e de prevenção na transmissão dos HSVs (Rose, Herra e Crowley, 2008). Técnicas tradicionais de diagnóstico como cultura celular são importantes porque permitem a detecção da partícula e amplificação viral, contudo, possuem baixa sensibilidade dependendo do espécime analisado. Além disso, são muito dependentes da manutenção da cultura celular e viabilidade viral (Koutsky *et al.*, 1992), o que requer pessoal especializado com prática e experiência.

Várias técnicas baseadas na PCR vêm sendo introduzidas na prática laboratorial rotineira, tais como: nested PCR, RFLP (Hong *et al.*, 2014). Contudo, o monitoramento e a quantificação realizados por PCR em tempo real são importantes porque, além de auxiliar na quantificação do DNA do HSV, podem ser utilizado para avaliar os efeitos de um determinado antiviral (Schloss *et al.*, 2009). Em nosso estudo, 100% das amostras de lesão mucocutânea analisadas foram positivas por ambas as técnicas (isolamento viral e PCR em tempo real). Contudo, 50% das amostras de saliva foram positivas para o isolamento viral e 100% foram positivas para a reação de PCR em tempo real. Em relação aos títulos virais, as amostras de lesões mucocutâneas variaram de $3,85 \times 10^3$ a $9,78 \times 10^4$ cópias/mL e nas amostras de saliva variaram entre $2,44 \times 10^3$ a $1,54 \times 10^4$ cópias/mL.

Neste estudo, a técnica de PCR em tempo real baseou-se na metodologia do sistema Syber Green e a curva de melting. Esta técnica possibilita a quantificação viral nas amostras analisadas sem a utilização de sondas, pois o sistema Syber Green se liga á dupla fita de DNA e, com a excitação da luz emitida pelo sistema emite uma fluorescência (Hong *et al.*, 2014). Contudo a maior limitação desta técnica seria a presença de resultados falso-negativos, pois este sistema não possui especificidade com

a molécula de DNA analisada (Arya *et al.*, 2005), entretanto, se nesta análise houver a implementação da curva de melting, ocorre o aumento da fidelidade dos resultados e soluciona o problema da não especificidade a molécula de DNA (Sibley, Peirano e Church, 2012). No presente estudo, a análise com a curva de melting mostrou a média de temperatura do HSV-1 ocorrendo a 87,02°C. A partir dessas análises no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LDTV) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), foi desenvolvida a reação de PCR em tempo real com sondas marcadas para a detecção do HSV-1 e HSV-2 simultaneamente (PCR em tempo real multiplex). Atualmente, este multiplex está sendo utilizado no laboratório para a detecção do HSV em diferentes tipos de amostras clínicas.

A identificação do espécime viral baseada nos dados clínicos e epidemiológicos pode ser realizada de forma errática, prejudicando assim o início da terapia antiviral. Por isso, pesquisas que busquem o desenvolvimento e padronização de metodologias rápidas, específicas e precisas são de fundamental importância. Este estudo padronizou e analisou metodologias moleculares que podem ser usadas para o diagnóstico do HSV-1 em amostras de lesão mucocutânea, saliva e soro.

O termo RNA de interferência (RNAi), é um processo que leva ao silenciamento gênico específico, através da introdução de pequenos RNAs (siRNA) em células de mamíferos, podendo ser entendido como um processo que leva a mecanismos de controle da função de determinados genes (Wheeler, 2014). Essa técnica poderá levar ao desenvolvimento de uma nova terapia para múltiplas doenças, incluindo aquelas causadas por patógenos virais (Novina *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005).

Neste estudo, através da análise das amostras pela reação de PCR em tempo real, utilizou-se uma amostra de lesão mucocutânea com alto título viral (9.78×10^4 cópias/mL) para a realização do silenciamento gênico do gene UL39 do HSV-1. Este gene codifica uma subunidade da ribonucleotideo redutase. O HSV-1 não pode utilizar a ribonucleotideo redutase celular e, portanto, está dependente da sua própria redutase para replicação. Tem sido demonstrado que a enzima viral pode ser necessária para o crescimento do vírus dentro das células e para a patogênese e reativação viral a partir de latência em hospedeiros infectados em estudos com modelos animais (Zhe *et al.*, 2008).

A ação de siRNAs para diminuição da replicação do HSV, demonstrou ser dose-dependente, como já observado em estudos de inibição para este vírus e para o vírus da hepatite E (HEV) (Bhuyan *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2010). No presente trabalho, a concentração ideal de siRNA foi de 6 nM. Em estudos de silenciamento gênico em células de mamíferos, observa-se o uso de uma grande variedade de concentrações de siRNAs, que tipicamente variam de 20 nM (Semizaro *et al.* 2003) a 200 nM (Wu *et al.* 2003). No nosso estudo, foi possível observar na concentração de 21 nM a perda do silenciamento gênico *in vitro*, o que poderia gerar um efeito inespecífico. O estabelecimento da curva-dose resposta é de extrema importância nesses casos, pois altas concentrações de siRNA podem gerar efeitos inespecíficos. Tais efeitos incluem principalmente a ação sobre genes inespecíficos (Persengiev, Zhu e Green, 2004). Neste estudo, o controle endógeno utilizado foi o RNA 18s, para normalização dos dados, que se mostrou ideal no estudo da quantificação relativa por PCR em tempo real, pois não houve grandes variações entre a média dos CTs das amostras analisadas.

No presente estudo a sequência 1 do siRNA (si-UL39-1) foi aquela que apresentou a maior taxa de silenciamento gênico. Estudos anteriores de Zhe e colaboradores (2008) com as mesmas sequências de siRNA, demonstrou que a sequência 2 (si-UL39-2) foi a mais eficiente no silenciamento gênico, e trabalhos de Zhe e colaboradores (2011) mostraram que, quando estas mesmas sequências UL39 foram utilizadas concomitantes com sequências siRNA específicas para o gene UL40 a sequência 3 do UL39 (si-UL39-3) apresentou maior eficiência no silenciamento gênico. Esta variação no resultado do silenciamento é reportada em diferentes estudos (Holen *et al.*, 2002; Kawasaki *et al.*, 2003; Vickers *et al.*, 2003) e as razões para a diferença na eficácia do silenciamento ainda não é bem compreendida, contudo, postula-se que estas diferenças estejam associadas com as propriedades termodinâmicas do siRNA, assim como estruturas secundárias e terciárias da molécula de RNA que desativa o reconhecimento do siRNA (Kawasaki *et al.*, 2003; Luo e Chang, 2004).

O desenvolvimento de siRNAs específicos possuem um problema de obstáculo primário que é o modo de entrada destes na membrana plasmática (De Fougères *et al.*, 2007). A internalização das sequências em células e/ou tecidos deve ser de forma rápida, eficiente e em concentrações ideais (Tokatlian *et al.*, 2010) o que muitas vezes representa um fator limitante a utilização de siRNAs. Contudo, novas metodologias de entregas do siRNA (delivery) às células-alvos vêm sendo estudadas para o

desenvolvimento de metodologias cada vez mais efetivas no silenciamento gênico e seu uso na clínica terapêutica. Atualmente, as sequências testadas neste trabalho estão sendo utilizadas no LDTV-FIOCRUZ para a inibição do HSV-1 *in vivo* (camunongos), testando e otimizando novas formas de entrada do siRNA para a melhora da inibição neste sistema.

A partir deste trabalho e da otimização das técnicas moleculares em diferentes tipos de amostras, percebeu-se a necessidade de entender características moleculares dos HSV relacionadas a estas amostras, compreendendo os genótipos e as mutações de resistência presentes em isolados no território brasileiro. Dados sobre a caracterização genotípica do HSVs no Brasil são escassos e percebendo esta necessidade realizou-se segundo artigo intitulado “Genotypic characterization of herpes simplex type 1 isolates in immunocompromised patients from Rio de Janeiro”. Este projeto realiza a caracterização genotípica do HSV no Rio de Janeiro, utilizando como foco pacientes imunocomprometidos, onde infecções oportunistas têm sido reconhecidas como complicações mais comuns da infecção pelo HIV devido à deficiência imunológica, sendo a razão das internações e substancial morbidade nestes pacientes infectados (Strick, Wald e Celum, 2006).

Este estudo foi realizado em colaboração com o grupo do Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine (BNI), na Alemanha, um dos institutos mais renomados em doenças tropicais que atua no controle de doenças e infecções emergentes e desenvolve projetos relacionados ao diagnóstico e detecção em virologia, que geram dados para Organização Mundial de Saúde (WHO). No ano de 2013, tive a possibilidade de realizar o doutorado sanduiche neste instituto, sob a orientação da Dra. Vanessa de Paula e co-orientação do Dr^o Jonas Schmidit-Chanasit, onde foi possível o aperfeiçoamento de técnicas moleculares para rápida e eficiente detecção dos herpesvírus e a caracterização genotípica do HSV-1.

No segundo artigo, foi possível a detecção do HSV em amostras de soro de pacientes HIV positivos. Das 214 amostras analisadas neste estudo, foi possível a detecção de 62 amostras (29%) positivas para HSV-1 pela reação de PCR em tempo real. Foi observado em estudos anteriores, alta prevalência de HHVs, principalmente HSV-1 e HSV-2, em pacientes co-infectados com HIV na África (Schafteenaar *et al.*, 2014). Alguns estudos relatam a prevalência de 65% a 90% de HSVs em pacientes soropositivos do Sul da África, Quênia, Lesotho e Tanzânia (Aubert, Rice e Blaho,

2001; Compston *et al.*, 2009; Rabenau *et al.*, 2010; Mmbaga *et al.*, 2011; Nyiro *et al.*, 2011).

A epidemiologia da infecção por HSV-2 está intimamente relacionada a infecção por HIV-1, pois os dois podem provocar doenças crônicas que infectam o indivíduo através do contato sexual (Schiffer e Corey, 2009). No estudo em questão, não foi encontrado amostras positivas para HSV-2, contudo, alguns estudos têm demonstrado o HSV-1 como sendo o agente etiológico da herpes genital em países em desenvolvimento (Stanberry *et al.*, 1999; Mertz, Rosenthal e Stanberry, 2003).

A infecção primária pelo HSV-1 inicia-se tendo como porta de entrada a mucosa (seja oral ou genital), e depois caminha para o gânglio sacral onde estabelece a infecção primária e mecanismos de latência, e torna-se sistêmica se disseminando (Pellett e Roizman, 2013). Potenciais alvos dessa disseminação é o aparecimento de infecções extragenitais e disseminação do vírus no sangue (viremia) (Tedder *et al.*, 1994). Processos de viremia do HSV-1 já foram demonstrados em pacientes hospitalizados (Berrington *et al.*, 2009) e em pacientes após a infecção primária (Johnston *et al.*, 2008). No presente estudo, foi possível a detecção do HSV-1 em amostras de soro de pacientes imunocomprometidos. Além disso, a introdução do tratamento antiretroviral nos indivíduos HIV positivos têm o risco de desenvolver severas infecções causadas pelo HSVs devido a diminuição da imunidade adaptativa, resultando em uma vigorosa resposta HSV (Schaftenaar *et al.*, 2014). No estudo em questão, todos os indivíduos analisados já haviam iniciado o tratamento antiretroviral contra o HIV.

Apesar da maioria dos estudos utilizam amostras de lesão e amostras provenientes da cultura celular para detecção do HSV-1, no estudo em questão, foi possível a detecção do HSV em pacientes HIV positivos sem sintomas clínicos para HSV, no qual a carga viral do HSV-1 variou entre 10^2 a 10^3 cópias/ μ L. Discute-se a importância desses achados em pacientes imunocomprometidos, principalmente relacionada a reativação viral assintomática que pode ocorrer.

Para realizar a caracterização genotípica das amostras analisadas, duas técnicas foram utilizadas no nosso estudo. A técnica de RFLP e o sequenciamento nucleotídico. A técnica de RFLP é bastante utilizada no estudo dos genótipos do HSV, pois através dela é possível realizar a caracterização genotípica dos diferentes genótipos do HSV-1 (Sakaoka *et al.*, 1994; Umene *et al.*, 2003). Estudos com PCR baseados no RFLP

utilizando enzimas de restrição, com a análise do gene gG (269 bp) e gI (410bp), demonstraram ter alta aplicabilidade em amostras europeias com larga distribuição geográfica (Norberg, Bergström e Liljeqvist, 2006, Umene, Koga e Kameyama, 2007; Duan *et al.*, 2008; Schmidt-Chanasit *et al.*, 2009).

No presente estudo, foi possível realizar a PCR através da análise dos genes gG e gI do HSV-1, onde 38,3% das amostras (82/214) e 32,71% (70/214) foram positivas por PCR para os genes gG e gI, respectivamente. Pela técnica de RFLP, realizada de acordo com protocolos publicados anteriormente (Norberg *et al.*, 2004; Norberg, Bergström e Liljeqvist, 2006), 71,95% (59/82) e 61,42% (43/70) das amostras foram positivas para os genes gG e gI, sendo classificadas no genótipo A do HSV-1. Estudos anteriores de Harishankar e colaboradores, 2012 através da análise dos mesmos genes em amostras da Índia, mostraram que 100% das amostras analisadas na região do gene gG e 69% das amostras analisadas na região do gene gI foram classificadas no genótipo A do HSV-1.

Neste estudo foi realizado o sequenciamento gênico completo dos genes US8, UL44 e UL23 de 20 amostras selecionadas. As amostras escolhidas foram aquelas que apresentaram carga viral mais elevada pela reação de PCR em tempo real. Todas as sequências do estudo foram alinhadas e analisadas pelo método bayesiano.

O gene US8 codifica a glicoproteína gE e localiza-se na região curta do genoma do HSV-1, fazendo parte do envelope viral e participando dos processos de adsorção e entrada do vírus na célula. Análises filogenéticas do HSV-1 de estudos anteriores identificaram a existência de três clados (A-C), sendo a distância genética entre os isolados de aproximadamente 2%, assim como as recombinações presentes nos mesmos (Bowden *et al.*, 2004; Norberg *et al.*, 2004). Estudos de Norberg e colaboradores (2004) e Schmidt-chanasit (2009) demonstraram a presença de três genótipos distintos denominados A, B e C, quando analisado o genoma completo do gene (1,650 bp; cepa 17). Nestes estudos todas as sequências classificadas no grupo B apresentaram uma inserção de 6 nt (CGAGGG) após a posição 551, resultando em regiões repetidas com dois blocos de 6 nt. Estes estudos foram realizados com amostras provenientes da Europa e da América do Norte. Em contraste, em nosso estudo nenhuma amostra Brasileira analisada apresentou essas regiões que as classificariam como amostras do genótipo B.

Estudos recentes de Kolb e colaboradores (2013) e Szpara e colaboradores (2014), através do sequenciamento completo de múltiplas sequências de HSV-1, utilizando a plataforma Illumina, classificaram as sequências de HSV-1 em clusters de acordo com sua origem geográfica : Europa - América do Norte, Ásia e África, com exceção da cepa KOS proveniente da América do Norte que em todas as análises encontrou-se associada ao cluster das amostras asiáticas (Kolb, Ané e Brandt, 2013; Szpara *et al.*, 2014). As amostras brasileiras, apesar da análise parcial do genoma, permaneceram agrupadas em um único cluster.

As amostras positivas para o gene UL44 foram sequenciadas e o produto do sequenciamento resultou na codificação de 1996 bp. Este gene localiza-se na região longa do genoma do HSV-1 e codifica a glicoproteína gC. Esta glicoproteína tem um importante papel na adsorção do vírus a célula. Por ser uma região essencial de ligação com as proteínoglicanas da célula, qualquer variação nesta região poderia levar a uma classificação genotípica diferente. Em estudos anteriores de Tryballa e colaboradores, (2002) demonstrou-se que este gene se manteve inalterado mesmo durante várias passagens de cepas selvagens em cultura celular. Neste trabalho as cepas do estudo foram separadas filogeneticamente em três grupos. Mais recentemente, o trabalho de Harishankar e colaboradores (2012), utilizando para a análise filogenética o gene UL44 classificou isolados clínicos da Índia em dois genótipos α e β .

No presente estudo, foi possível analisar que todas as amostras brasileiras analisadas com o gene UL44 mostraram uma variação nucleotídica na posição 1114 (T>C), gerando mudança no quadro de leitura do aminoácido, sendo que as amostras brasileiras para este gene permaneceram agrupadas no mesmo clado, estando intimamente relacionadas entre si. Análise filogenética do gene US8 e UL44 separou as amostras brasileiras dentro de um mesmo clado com expressiva probabilidade posterior (PP) (figura 1 e figura 2 do artigo 2).

As amostras positivas para o gene UL-23 foram sequenciadas e o produto do sequenciamento resultou na codificação de 1244 bp. O gene UL-23 se localiza na região longa do genoma do HSV-1 e codifica a timidina kinase viral (TK), sendo esta uma importante proteína ligada a replicação viral. Cepas com mutação nesta região ou deficientes em TK resultam em mecanismos de resistência ao aciclovir, principal antiviral utilizado no tratamento contra HSV-1 (Van Velzen *et al.*, 2013).

Mecanismos de resistência ao aciclovir (ACV) ocorrem principalmente em pacientes imunocomprometidos, especialmente em pacientes HIV positivos e transplantados. Muitos mecanismos de resistência ao aciclovir são relatados em cepas do HSV (Hill, 1991). A prevalência de cepas virais ACV resistentes, em geral, é baixa em indivíduos imunocompetentes (<1%), porém em indivíduos imunocomprometidos é relativamente alta esta resistência (4-14%) (Bacon *et al.*, 2003; Danve-Szatanek *et al.*, 2004; Stránská *et al.*, 2005).

Fenótipos de resistência podem ser observados como consequência de oito simples inserções\deleções de guanosina (G) e citosina (C) resultando em uma deficiência de TK ou em mutações pontuais em TK (Sasadeusz *et al.*, 1997; Gaudreau *et al.*, 1998; Morfin *et al.*, 2000). Alguns estudos relatam fenótipos de resistência consistindo em inserções de G/C que acabam gerando códons de parada nas sequências (Burrell *et al.*, 2013). Neste estudo, não foram encontrados mutações de resistência nas amostras analisadas do Rio de Janeiro. As amostras brasileiras apresentaram similaridade nucleotídica superior a 98%. Estes dados são corroborados pelo estudo de Burrell e colaboradores (2013), que ao analisarem mutações e o polimorfismo natural dos genes UL23, que codifica a Timidina Kinase e UL30, que codifica a DNA polimerase, mostraram que estes são altamente conservados, com identidade nucleotídica e aminoácida superior a 97,5% entre todas as cepas da Europa analisadas neste estudo.

O presente estudo realizou a primeira análise genotípica do HSV-1 no Brasil através da técnica de RFLP pela análise dos genes gG e gI e através da técnica de sequenciamento completo dos genes US8, UL44, UL23. Todas as técnicas demonstraram a estabilidade da distribuição do genótipo A no Rio de Janeiro durante 24 anos (período de 1988 a 2012). Trabalhos de Schmidt-Chanasit e colaboradores (2009) haviam demonstrado a estável distribuição dos genótipos A e B na Alemanha por um período de 10 anos. Estudos anteriores sobre a avaliação quantitativa dos polimorfismos genômicos das cepas de HSV-1 em seis países - três asiáticos e três de origem não asiática concluíram que o padrão evolutivo foi semelhante entre mesmos grupos étnicos, e a variabilidade encontrada nas amostras asiáticas foi menor em comparação á não-asiáticas (Sakaoka, 1994). Estudos de Szpara e colaboradores (2014), ao analisarem todo o genoma de cepas da China, Japão, Quênia, Coreia do Sul, Estados Unidos e Europa concluíram que cada cepa individual exibe características genotípicas e

fenotípicas com potencial de variação, embora a identidade proteica entre as linhagens fosse superior a 90%, sendo estas agrupadas por origem geográfica, o que explicaria as prováveis rotas do HSV-1 e a adaptação a diferentes ambientes. Neste estudo, verificamos que as amostras brasileiras estão intimamente relacionadas entre si, estando agrupadas em um mesmo clado, demonstrando a estabilidade do mesmo genótipo em pacientes imunocomprometidos do Rio de Janeiro.

Nesta linha de pesquisa de diagnóstico e caracterização genotípica dos Herpesvírus e em colaboração com o grupo do Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine (BNI) foi possível o desenvolvimento do terceiro artigo, intitulado “Acute liver failure in an immunocompetent patient”, no qual foi reportado um caso de um paciente com hepatite fulminante, sem etiologia conhecida, com sinais de uma hepatite autoimune, iniciando assim a busca de diversos agentes etiológicos que poderiam levar a tais sintomas no paciente, e o único positivo foi para o HHV-6B.

São reportados na literatura, casos de reativação do HHV-6 após o transplante, mostrando que embora a maioria dos pacientes reative o HHV-6 de forma assintomática, diferentes estudos têm correlacionado e sugerido o significativo potencial deste patógeno em pacientes que receberam transplante de fígado (Lautenschlager *et al.*, 1998; Griffiths *et al.*, 1999; Humar *et al.*, 2002). Neste trabalho, o HHV-6 foi detectado antes do transplante hepático. Casos de hepatites autoimunes relacionados ao HHV-6 já haviam sido descritos na literatura anteriormente (Grima *et al.*, 2008). A infecção por HHV-6 ocorre em mais de 95% da população mundial, geralmente ocorrendo na infância e sendo assintomática (Abdel Massih e Razonable, 2009), contudo, reativação da latência em pacientes transplantados ocorre, podendo gerar doenças associadas a infecção por HHV-6 (Lautenschlager e Razonable, 2012).

A hepatite autoimune (HAI) é uma doença hepática progressiva, de etiologia desconhecida, caracterizada por hipergamaglobulinemia, detecção de autoanticorpos e características de hepatite (Gatselis *et al.*, 2015). No terceiro artigo, foi realizada a apresentação de um caso, de uma menina de 14 anos com sinais clínicos de hepatite autoimune grave, contudo, a mesma não apresentava autoanticorpos que geralmente aparecem na hepatite autoimune, tais como: antinúcleo (ANA), antimúsculo liso (SMA), antimicrosoma de fígado e rim tipo 1 (ALKM-1) e antimitocôndria (AMA), porém apresentava alguns sintomas clínicos tais como: redução da consciência, hepatomegalia e edema nos membros inferiores e superiores.

A causa da hepatite fulminante ainda é desconhecida, sendo sugerido que o desenvolvimento da mesma pode ocorrer de acordo com uma predisposição genética do indivíduo ou após a exposição a determinados micro-organismos, viroses e xenobióticos, pois este ataque autoimune ao fígado pode estar relacionado a potencial mecanismo de mimetismo molecular, promovendo a diminuição do controle regulatório das células T (Muratori e Longhi, 2013).

Diversos estudos têm demonstrado alta prevalência de HHV-6 em órgãos transplantados, resultados da reativação viral (Okuno *et al.*, 1989; De Bolle, Naesens e De Clercq, 2005). Esta infecção na população adulta, geralmente é assintomática. Estudos já mostraram além da alta incidência de HHV-6 ocorrendo em transplantes de fígado, a presença de infecções sintomáticas relacionadas ao HHV-6 (Cervera *et al.*, 2006). A proporção da infecção do HHV-6 no fígado é de aproximadamente 22-54% (Griffiths *et al.*, 1999; Lautenschlager, Linnavuori e Höckerstedt, 2000). Neste estudo a detecção do HHV-6 no soro e na biopsia do fígado da paciente foi demonstrado antes do transplante hepático, tendo a presença de altos níveis de DNA do HHV-6 (1×10^4 cópias/mL) o que mostra uma possível reativação da latência do HHV-6 no paciente. Em alguns raros casos, o HHV-6 pode se integrar ao genoma humano sendo conhecido como CIHHV-6, apesar da incidência desses casos não ser estimada, estudos têm mostrado a circulação destes na população, e tanto o HHV-6A como o HHV-6B possuem esta habilidade (Leong *et al.*, 2007; Abdel Massih e Razonable, 2009).

A encefalite causada pela infecção por HHV-6 é um sintoma raro e difícil de ser associada somente a infecção por HHV-6, todavia alguns estudos relatam doenças neurológicas que podem estar associadas a infecção pelo HHV-6 (Rogers *et al.*, 2000; Singh e Paterson, 2000). Neste estudo, a paciente em questão apresentou considerado nível de confusão mental.

A infecção por HHV-6 associada a hepatite está relacionada a um aumento das enzimas do fígado, disfunção do enxerto e infiltração linfocitária (Humar *et al.*, 2002). No presente estudo, a paciente apresentou elevação das transaminases, e a histopatologia do fígado demonstrou que havia moderada infiltração linfoplasmocitária. A hepatite autoimune é doença que não apresenta sintomas específicos e únicos, porém mesmo na falta de autoanticorpos convencionais pode ser estabelecido seu diagnóstico. Para o diagnóstico foi realizado a pesquisa para diferentes famílias virais através da PCR no soro da paciente e no fígado transplantado. O único PCR positivo foi para

PAN-herpesvírus, criado por Ehlers e Colaboradores em (1999), e para confirmar a infecção por HHV-6, foi realizado a PCR para detecção específica do HHV-6 que confirmou a infecção por este vírus, e definiu a variante, como sendo HHV-6B. O HHV-6B é a variante mais comum em indivíduos transplantados, pois esta comumente associada a doenças causadas por HHV-6 (Dewhurst *et al.*, 1993). Neste estudo, o HHV6-B contribuiu para a disfunção do fígado e para a ocorrência de uma hepatite fulminante em um paciente que apresentava quadro de hepatite autoimune. Estudo anterior de Härmä e Colaboradores (2006), já havia demonstrado um caso de paciente com hepatite fulminante relacionado ao HHV-6 (Härmä *et al.*, 2006). No estudo em questão, 20 dias após o transplante a paciente veio a falecer em decorrência de sepse e choque séptico.

Do ponto de vista clínico, esses achados sugerem que a infecção viral pelo HHV-6 pode contribuir para a disfunção aguda do fígado, e a pesquisa para este vírus deve ser incluída no diagnóstico de um paciente com que apresenta uma insuficiência hepática grave. Em tais condições, a biópsia do fígado parece obrigatória, numa tentativa de alcançar um diagnóstico correto evitando assim uma doença hepática, potencialmente catastrófica como a hepatite fulminante (Alvarez *et al.*, 1999; Hennes *et al.*, 2008; Zachou *et al.*, 2013; Gatselis *et al.*, 2015). Neste estudo foi demonstrada a importância do diagnóstico diferencial para os herpesvírus, identificando de forma rápida e eficiente o agente etiológico que pode estar correlacionado ao caso de hepatite fulminante.

Atualmente, o LDTV-FIOCRUZ tem uma linha de pesquisa com os herpesvírus que visa o diagnóstico e epidemiologia da infecção causada por estes agentes. Apesar das infecções pelos herpesvírus se apresentarem de forma benigna e muitas vezes inaparentes na população, casos de forma sintomática e que muitas vezes desenvolvem complicações aparentes, vêm crescendo nos últimos anos, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Por isso, estudos de vigilância, epidemiologia e caracterização molecular são importantes para que se possa entender melhor a biologia dessas viroses em cada indivíduo. Além disso, o desenvolvimento do siRNA que podem eficientemente silenciar genes específicos e inibir a expressão de proteínas virais podem mediar futuros estudos de terapia antiviral principalmente para populações infectadas com cepas resistentes aos tratamento convencionais.

Desta forma, os resultados desta tese foram fundamentais para implementar o diagnóstico e a pesquisa com herpesvírus no LDTV-FIOCRUZ, definindo assim metodologias moleculares eficientes para a detecção do HSV em diferentes amostras clínicas como lesão, saliva e soro. Também foi possível o estabelecimento da caracterização molecular do HSV, que mostrou que sendo um vírus de DNA, as mutações sofridas ao longo de diferentes anos não interferiram no genótipo circulante no Rio de Janeiro. A partir dessa tese, deu-se início ao estudo de outros membros pertencentes a família *Herpesviridae*, circulantes em diferentes populações, para que se possa entender as principais características dessas viroses no território brasileiro.

6. CONCLUSÃO

Artigo 1

- ✓ A otimização da reação de PCR em tempo real para detecção e quantificação do HSV-1 em cultura celular, lesão e saliva foi satisfatória, principalmente em amostras de saliva, que geralmente apresentam baixa carga viral.
- ✓ A utilização da reação de PCR em tempo real possibilitou a detecção eficiente do HSV-1 em diferentes tipos de amostras sendo mais sensível quando comparado com o isolamento viral, técnica considerada padrão-ouro para o HSV-1. Além disso, através da técnica de PCR em tempo real foi possível quantificar o silenciamento gênico do HSV-1 através da utilização de siRNAs.
- ✓ Através da curva dosagem foi estabelecida a concentração ideal de siRNAs para inibição da replicação do HSV-1 *in vitro* de 6 nM .
- ✓ O siRNA mostrou resultados bastante satisfatórios, gerando inibição da replicação do HSV-1 em um isolado de amostra clínica de paciente infectado.

Artigo 2

- ✓ Neste estudo foram analisados 214 amostras de soro de pacientes HIV positivos entre os anos de 1988 a 2012, dos quais 29% das amostras foram positivas para HSV-1 pela técnica de PCR em tempo real com a carga viral variando de 2.75×10^2 a 8.78×10^3 cópias/ μL .
- ✓ A análise da reação de PCR confirmou a detecção do HSV-1 em 38,3% e 32,71% das amostras analisadas para o gene gG e gI, respectivamente.
- ✓ Todas as amostras clínicas positivas para a reação de PCR, foram analisadas pela técnica de RFLP para os mesmo genes. E as amostras clínicas positivas na técnica de RFLP foram classificadas no genotipo A do HSV-1.

- ✓ Na análise filogenética, 20 amostras foram sequenciadas e analisadas para o gene US8, UL44 e UL23. As amostras brasileiras demonstram a existência de um cluster geográfico formado por estas amostras, mostrando a predominância de um único genotípico no Rio de Janeiro.
- ✓ Não foram encontrados mutações de resistência ao aciclovir no gene UL-23 associadas a essas amostras.

Artigo 3

- ✓ Foi possível a detecção do HHV-6B em amostra de soro e de fígado de um paciente com hepatite fulminante.
- ✓ Os aspectos clínicos do paciente com a reativação do HHV-6B contribuíram para uma hepatite aguda fulminante.

7. PERSPECTIVAS

Nas perspectivas futuras deste estudo, pretende-se analisar amostras clínicas de pacientes não imunocomprometidos positivos para HSV-1, realizando o sequenciamento nucleotídico dessas amostras com os mesmo genes utilizados neste estudo (US8, UL44 e UL23), para que se possam comparar os resultados verificando similaridades e diferenças entre as sequências e a identificação do genótipo circulante de HSV-1 na população. Além disso, pretende-se aprimorar os estudos de amostras clínicas positivas para HSV-2, identificando os principais genótipos circulantes de HSV-2, tendo como foco populações de risco tais como: profissionais do sexo e mulheres grávidas.

Uma outra perspectiva deste estudo, visa descrever a percepção das adolescentes grávidas sobre os cuidados e prevenção da infecção pelo herpes, principalmente com os cuidados com o neonato, realizando a prevalência e epidemiologia molecular do vírus do herpes simples tipo 1 e herpes simples tipo 2 na população de adolescentes grávidas, realizando ações educativas e produção de material didático sobre o tema em questão, além de levantar dados importantes para o SUS sobre as características das adolescentes grávidas no Rio de Janeiro.

Com relação ao diagnóstico dos herpesvírus, já foi otimizada a técnica de PCR multiplex para a detecção dos Alphaherpesvírus e pretende-se padronizar a técnica para a detecção dos Betaherpesvírus e Gamaherpesvirus, possibilitando o diagnóstico de diferentes tipos de herpesvírus na mesma amostra clínica analisada.

8. PRODUÇÃO COMPLEMENTAR

- DA SILVA, A. D. S. ; LIMA, L. R. P. ; **PERSE, A. D. S.** ; CASTRO, L. S. ; REZENDE, G. R. D. ; PIRES, F. R. ; PUGA, M. A. M. ; BANDEIRA, L. M. ; TANAKA, T. S. O. ; MOTTA-CASTRO, A. R. C. ; DE PAULA, V. S. . Epidemiological evaluation of herpes simplex virus in men who have sex with men in Mato Grosso do Sul, Brazil. Sexually Transmitted Infections (Print) ^{JCR}, v. 90, p. 1, 2014.

- GARIGLIANY, M. ; HAGEN, R. M. ; FRICKMANN, H. ; MAY, J. ; SCHWARZ, N. G. ; **PERSE, A.** ; JOST, H. ; BORSTLER, J. ; SHAHHOSSEINI, N. ; DESMECHT, D. ; MBUNKAH, H. A. ; DANIEL, A. M. ; KINGSLEY, M. T. ; CAMPOS, R. M. ; PAULA, V. S. ; RANDRIAMAMPIONONA, N. ; TANNICH, E. ; RAKOTOZANDRINDRAINY, R. ; CADAR, D. ; SCHMIDT-CHANASIT, J. . Cyclovirus CyCV-VN strain distribution is not limited to Vietnam and extends to Africa. Scientific Reports ^{JCR}, 2015.

9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Abdel Massih RC, Razonable RR. Human herpesvirus 6 infections after liver transplantation. *World J Gastroenterol*. 2009;15(21):2561-9.
2. Achour A, Malet I, Deback C, Bonnafous P, Boutolleau D, Gautheret-Dejean A, et al. Length variability of telomeric repeat sequences of human herpesvirus 6 DNA. *J Virol Methods*. 2009;159(1):127-30.
3. Adelman ZN, Sanchez-Vargas I, Travanty EA, Carlson JO, Beaty BJ, Blair CD, et al. RNA silencing of dengue virus type 2 replication in transformed C6/36 mosquito cells transcribing an inverted-repeat RNA derived from the virus genome. *J Virol*. 2002;76(24):12925-33.
4. Aids in Brazil 2013 . [Acesso em 02 de dezembro de 2014]. Disponível em <http://www.aids.gov.br/pagina/aids-no-brasil>.
5. Akkapaiboon P, Mori Y, Sadaoka T, Yonemoto S, Yamanishi K. Intracellular processing of human herpesvirus 6 glycoproteins Q1 and Q2 into tetrameric complexes expressed on the viral envelope. *J Virol*. 2004;78(15):7969-83.
6. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol*. 1999;31(5):929-38.
7. Anderson NE, Powell KF, Croxson MC. A polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid in patients with suspected herpes simplex encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1993;56(5):520-5.
8. Antinori A, Cingolani A, Lorenzini P, Giancola ML, Uccella I, Bossolasco S, et al. Clinical epidemiology and survival of progressive multifocal leukoencephalopathy in the era of highly active antiretroviral therapy: data from the Italian Registry Investigative Neuro AIDS (IRINA). *J Neurovirol*. 2003;9 Suppl 1:47-53.
9. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*. 2005;5(2):209-19.
10. Ashley R, Cent A, Maggs V, Nahmias A, Corey L. Inability of enzyme immunoassays to discriminate between infections with herpes simplex virus types 1 and 2. *Ann Intern Med*. 1991;115(7):520-6.
11. Aubert M, Rice SA, Blaho JA. Accumulation of herpes simplex virus type 1 early and leaky-late proteins correlates with apoptosis prevention in infected human HEP-2 cells. *J Virol*. 2001;75(2):1013-30.

12. Bacon TH, Levin MJ, Leary JJ, Sarisky RT, Sutton D. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(1):114-28.
13. Baeten JM, Strick LB, Lucchetti A, Whittington WL, Sanchez J, Coombs RW, et al. Herpes simplex virus (HSV)-suppressive therapy decreases plasma and genital HIV-1 levels in HSV-2/HIV-1 coinfecting women: a randomized, placebo-controlled, cross-over trial. *J Infect Dis.* 2008;198(12):1804-8.
14. Balfour HH. Resistance of herpes simplex to acyclovir. *Ann Intern Med.* 1983;98(3):404-6.
15. Baringer JR, Swoveland P. Recovery of herpes-simplex virus from human trigeminal ganglions. *N Engl J Med.* 1973;288(13):648-50.
16. Bastian FO, Rabson AS, Yee CL, Tralka TS. Herpesvirus hominis: isolation from human trigeminal ganglion. *Science.* 1972;178(4058):306-7.
17. Berrington WR, Jerome KR, Cook L, Wald A, Corey L, Casper C. Clinical correlates of herpes simplex virus viremia among hospitalized adults. *Clin Infect Dis.* 2009;49(9):1295-301.
18. 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. *J Virol.* 2001;75(7):3105-10.
19. Bhuyan PK, Kariko K, Capodici J, Lubinski J, Hook LM, Friedman HM, et al. Short interfering RNA-mediated inhibition of herpes simplex virus type 1 gene expression and function during infection of human keratinocytes. *J Virol.* 2004;78(19):10276-81.
20. Biberfeld P, Kramarsky B, Salahuddin SZ, Gallo RC. Ultrastructural characterization of a new human B lymphotropic DNA virus (human herpesvirus 6) isolated from patients with lymphoproliferative disease. *J Natl Cancer Inst.* 1987;79(5):933-41.
21. Bivalkar-Mehla S, Vakharia J, Mehla R, Abreha M, Kanwar JR, Tikoo A, et al. Viral RNA silencing suppressors (RSS): novel strategy of viruses to ablate the host RNA interference (RNAi) defense system. *Virus Res.* 2011;155(1):1-9.
22. Black JB, Sanderlin KC, Goldsmith CS, Gary HE, Lopez C, Pellett PE. Growth properties of human herpesvirus-6 strain Z29. *J Virol Methods.* 1989;26(2):133-45.
23. Black JB, Pellett PE. Human herpesvirus 7. *Rev Med Virol.* 1999;9(4):245-62.

24. Bloom DC, Giordani NV, Kwiatkowski DL. Epigenetic regulation of latent HSV-1 gene expression. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1799(3-4):246-56.
25. Boehmer PE, Lehman IR. Herpes simplex virus DNA replication. *Annu Rev Biochem*. 1997;66:347-84.
26. Booy FP, Trus BL, Davison AJ, Steven AC. The capsid architecture of channel catfish virus, an evolutionarily distant herpesvirus, is largely conserved in the absence of discernible sequence homology with herpes simplex virus. *Virology*. 1996;215(2):134-41.
27. Borenstein R, Frenkel N. Cloning human herpes virus 6A genome into bacterial artificial chromosomes and study of DNA replication intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(45):19138-43.
28. Bowden R, Sakaoka H, Donnelly P, Ward R. High recombination rate in herpes simplex virus type 1 natural populations suggests significant co-infection. *Infect Genet Evol*. 2004;4(2):115-23.
29. Bower M, Palmieri C, Dhillon T. AIDS-related malignancies: changing epidemiology and the impact of highly active antiretroviral therapy. *Curr Opin Infect Dis*. 2006;19(1):14-9.
30. Brady RC, Bernstein DI. Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Res*. 2004;61(2):73-81.
31. Braun DK, Dominguez G, Pellett PE. Human herpesvirus 6. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10(3):521-67.
32. Buchman TG, Roizman B, Adams G, Stover BH. 1978. Restriction endonuclease fingerprinting of herpes simplex virus DNA: a novel epidemiological tool applied to a nosocomial outbreak. *J Infect Dis* 138(4):488-498.
33. Burrell S, Deback C, Agut H, Boutolleau D. Genotypic characterization of UL23 thymidine kinase and UL30 DNA polymerase of clinical isolates of herpes simplex virus: natural polymorphism and mutations associated with resistance to antivirals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(11):4833-42.
34. Burrell 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 Res*. 2013;100(2):365-72.
35. Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)*. 2005;109(4):365-79.
36. Campadelli-Fiume G, Menotti L, Avitabile E, Gianni T. Viral and cellular contributions to herpes simplex virus entry into the cell. *Curr Opin Virol*. 2012;2(1):28-36.

37. Canavan T, Chrenek A. University of Saskatchewan Saskatoon, Saskatchewan Canada [internet] [atualizado em 2007, citado em 05 de janeiro de 2015]. Disponível em http://homepage.usask.ca/~vim458/virology/studpages2007/Tara_Alycia/Fig1.jpg
38. Carrozza MJ, DeLuca NA. Interaction of the viral activator protein ICP4 with TFIID through TAF250. *Mol Cell Biol.* 1996;16(6):3085-93.
39. Caserta MT, Mock DJ, Dewhurst S. Human herpesvirus 6. *Clin Infect Dis.* 2001;33(6):829-33.
40. Caserta MT, McDermott MP, Dewhurst S, Schnabel K, Carnahan JA, Gilbert L, et al. Human herpesvirus 6 (HHV6) DNA persistence and reactivation in healthy children. *J Pediatr.* 2004;145(4):478-84.
41. Caserta MT, Hall CB, Schnabel K, Lofthus G, Marino A, Shelley L, et al. Diagnostic assays for active infection with human herpesvirus 6 (HHV-6). *J Clin Virol.* 2010;48(1):55-7.
42. Celum C, Wald A, Hughes J, Sanchez J, Reid S, Delany-Moretlwe S, et al. Effect of aciclovir on HIV-1 acquisition in herpes simplex virus 2 seropositive women and men who have sex with men: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2008;371(9630):2109-19.
43. Celum C, Wald A, Lingappa JR, Magaret AS, Wang RS, Mugo N, et al. Acyclovir and transmission of HIV-1 from persons infected with HIV-1 and HSV-2. *N Engl J Med.* 2010;362(5):427-39.
44. Cervera C, Marcos MA, Linares L, Roig E, Benito N, Pumarola T, et al. A prospective survey of human herpesvirus-6 primary infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation.* 2006;82(7):979-82.
45. Cha TA, Tom E, Kemble GW, Duke GM, Mocarski ES, Spaete RR. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol.* 1996;70(1):78-83.
46. Chakraborty N, Bhattacharyya S, De C, Mukherjee A, Bhattacharya D, Santra S, et al. Incidence of multiple Herpesvirus infection in HIV seropositive patients, a big concern for Eastern Indian scenario. *Virol J.* 2010;7:147.
47. Chang J, Taylor JM. Susceptibility of human hepatitis delta virus RNAs to small interfering RNA action. *J Virol.* 2003;77(17):9728-31.
48. Chayavichitsilp P, Buckwalter JV, Krakowski AC, Friedlander SF. Herpes simplex. *Pediatr Rev.* 2009;30(4):119-29; quiz 30.
49. Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, et al. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1990;154:125-69.

50. Chentoufi AA, Kritzer E, Yu DM, Nesburn AB, Benmohamed L. Towards a rational design of an asymptomatic clinical herpes vaccine: the old, the new, and the unknown. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:187585.
51. Clark DA. Human herpesvirus 6. *Rev Med Virol.* 2000;10(3):155-73.
52. Clemens SA, Farhat CK. Seroprevalence of herpes simplex 1-2 antibodies in Brazil. *Rev Saude Publica.* 2010;44(4):726-34.
53. Clifford DB, Yiannoutsos C, Glicksman M, Simpson DM, Singer EJ, Piliero PJ, et al. HAART improves prognosis in HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology.* 1999;52(3):623-5.
54. Cola da web, portal R7 [Internet] [Citado em 08 de agosto de 2014]. Disponível em <http://www.coladaweb.com/mapas/mapa-dos-continentes>.
55. Coen DM. Antiviral drug resistance in herpes simplex virus. *Adv Exp Med Biol.* 1996;394:49-57.
56. Colbere-Garapin F, Blondel B, Saulnier A, Pelletier I, Labadie K. Silencing viruses by RNA interference. *Microbes Infect.* 2005;7(4):767-75.
57. Compston LI, Li C, Sarkodie F, Owusu-Ofori S, Opare-Sem O, Allain JP. Prevalence of persistent and latent viruses in untreated patients infected with HIV-1 from Ghana, West Africa. *J Med Virol.* 2009;81(11):1860-8.
58. Convertine AJ, Diab C, Prieve M, Paschal A, Hoffman AS, Johnson PH, et al. pH-responsive polymeric micelle carriers for siRNA drugs. *Biomacromolecules.* 2010.
59. Corey L, Spear PG. Infections with herpes simplex viruses (1). *N Engl J Med.* 1986;314(11):686-91.
60. Corey L, Wald A, Patel R, Sacks SL, Tyring SK, Warren T, et al. Once-daily valacyclovir to reduce the risk of transmission of genital herpes. *N Engl J Med.* 2004;350(1):11-20.
61. da Silva AD, Lima LR, Perse AD, Castro LS, Rezende GR, Pires FR, et al. Epidemiological evaluation of herpes simplex virus in men who have sex with men in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Sex Transm Infect.* 2014.
62. Danve-Szatanek C, Aymard M, Thouvenot D, Morfin F, Agius G, Bertin I, et al. Surveillance network for herpes simplex virus resistance to antiviral drugs: 3-year follow-up. *J Clin Microbiol.* 2004;42(1):242-9.
63. Davison AJ, Taylor P. Genetic relations between varicella-zoster virus and Epstein-Barr virus. *J Gen Virol.* 1987;68 (Pt 4):1067-79.

64. Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, et al. The order Herpesvirales. *Arch Virol.* 2009;154(1):171-7.
65. Davison AJ. Herpesvirus systematics. *Vet Microbiol.* 2010;143(1):52-69.
66. De Bolle L, Naesens L, De Clercq E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(1):217-45.
67. De Clercq E. Antiviral drugs in current clinical use. *J Clin Virol.* 2004;30(2):115-33.
68. de Fougerolles A, Vornlocher HP, Maraganore J, Lieberman J. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(6):443-53.
69. Dewhurst S, McIntyre K, Schnabel K, Hall CB. Human herpesvirus 6 (HHV-6) variant B accounts for the majority of symptomatic primary HHV-6 infections in a population of U.S. infants. *J Clin Microbiol.* 1993;31(2):416-
70. Dervillez X, Gottimukkala C, Kabbara KW, Nguyen C, Badakhshan T, Kim SM, et al. Future of an "Asymptomatic" T-cell Epitope-Based Therapeutic Herpes Simplex Vaccine. *Future Virol.* 2012;7(4):371-8.
71. Dixon RA, Schaffer PA. Fine-structure mapping and functional analysis of temperature-sensitive mutants in the gene encoding the herpes simplex virus type 1 immediate early protein VP175. *J Virol.* 1980;36(1):189-203.
72. Dockrell DH, Paya CV. Human herpesvirus-6 and -7 in transplantation. *Rev Med Virol.* 2001;11(1):23-36.
73. Dockrell DH. Human herpesvirus 6: molecular biology and clinical features. *J Med Microbiol.* 2003;52(Pt 1):5-18.
74. Dolan A, Jamieson FE, Cunningham C, Barnett BC, McGeoch DJ. The genome sequence of herpes simplex virus type 2. *J Virol.* 1998;72(3):2010-21.
75. Dolan SE, Hadigan C, Killilea KM, Sullivan MP, Hemphill L, Lees RS, et al. Increased cardiovascular disease risk indices in HIV-infected women. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005;39(1):44-54.
76. Dominguez G, Dambaugh TR, Stamey FR, Dewhurst S, Inoue N, Pellett PE. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J Virol.* 1999;73(10):8040-52.
77. Du T, Zhou G, Roizman B. HSV-1 gene expression from reactivated ganglia is disordered and concurrent with suppression of latency-associated transcript and miRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(46):18820-4.
78. Duan R, van Dun JM, Remeijer L, Siemerink M, Mulder PG, Norberg P, et al. Prevalence of herpes simplex virus type 1 glycoprotein G (gG) and gI

genotypes in patients with herpetic keratitis. *Br J Ophthalmol.* 2008;92(9):1195-200.

79. Dutch RE, Bianchi V, Lehman IR. Herpes simplex virus type 1 DNA replication is specifically required for high-frequency homologous recombination between repeated sequences. *J Virol.* 1995;69(5):3084-9.

80. Ehlers B, Borchers K, Grund C, Frölich K, Ludwig H, Buhk HJ. Detection of new DNA polymerase genes of known and potentially novel herpesviruses by PCR with degenerate and deoxyinosine-substituted primers. *Virus Genes* 1999;18:211–20.

81. Emery VC. Human herpesviruses 6 and 7 in solid organ transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2001;32(9):1357-60.

82. Epstein MA. Observations on the mode of release of herpes virus from infected HeLa cells. *J Cell Biol.* 1962;12:589-97.

83. Falke D, Siegert R, Vogell W. [Electron microscopic findings on the problem of double membrane formation in herpes simplex virus]. *Arch Gesamte Virusforsch.* 1959;9:484-96.

84. Fatahzadeh M, Schwartz RA. Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J Am Acad Dermatol.* 2007;57(5):737-63; quiz 64-6.

85. Garber DA, Schaffer PA, Knipe DM. A LAT-associated function reduces productive-cycle gene expression during acute infection of murine sensory neurons with herpes simplex virus type 1. *J Virol.* 1997;71(8):5885-93.

86. Garner JA. Herpes simplex virion entry into and intracellular transport within mammalian cells. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55(11):1497-513.

87. Gatselis NK, Zachou K, Koukoulis GK, Dalekos GN. Autoimmune hepatitis, one disease with many faces: Etiopathogenetic, clinico-laboratory and histological characteristics. *World J Gastroenterol.* 2015;21(1):60-83.

88. Gaudreau A, Hill E, Balfour HH, Erice A, Boivin G. Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant herpes simplex viruses from immunocompromised patients. *J Infect Dis.* 1998;178(2):297-303.

89. Gilbert C, Bestman-Smith J, Boivin G. Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. *Drug Resist Updat.* 2002;5(2):88-114.

90. Gitlin L, Karelsky S, Andino R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature.* 2002;418(6896):430-4.

91. Gong Y, Matthews B, Cheung D, Tam T, Gadawski I, Leung D, et al. Evidence of dual sites of action of dendrimers: SPL-2999 inhibits both virus entry and late stages of herpes simplex virus replication. *Antiviral Res.* 2002;55(2):319-29.
92. Griffiths PD, Ait-Khaled M, Bearcroft CP, Clark DA, Quaglia A, Davies SE, et al. Human herpesviruses 6 and 7 as potential pathogens after liver transplant: prospective comparison with the effect of cytomegalovirus. *J Med Virol.* 1999;59(4):496-501.
93. Grima P, Chiavaroli R, Calabrese P, Tundo P. Severe hepatitis with autoimmune features following a HHV-6: a case report. *Cases J.* 2008;1(1):110.
94. Gu B, DeLuca N. Requirements for activation of the herpes simplex virus glycoprotein C promoter in vitro by the viral regulatory protein ICP4. *J Virol.* 1994;68(12):7953-65.
95. Hall CB, Caserta MT, Schnabel KC, Long C, Epstein LG, Insel RA, et al. Persistence of human herpesvirus 6 according to site and variant: possible greater neurotropism of variant A. *Clin Infect Dis.* 1998;26(1):132-7.
96. Hancock MH, Corcoran JA, Smiley JR Herpes simplex virus regulatory proteins VP16 and ICP0 counteract an innate intranuclear barrier to viral gene expression. *Virology.* 2006; 352: 237-52.
97. Harishankar A, Jambulingam M, Gowrishankar R, Venkatachalam A, Vetrivel U, Ravichandran S, et al. Phylogenetic comparison of exonic US4, US7 and UL44 regions of clinical herpes simplex virus type 1 isolates showed lack of association between their anatomic sites of infection and genotypic/sub genotypic classification. *Virol J.* 2012;9:65.
98. Haugen TH, Alden B, Matthey S, Nicholson D. 1993. Restriction enzyme fragment length polymorphisms of amplified herpes simplex virus type-1 DNA provide epidemiologic information. *Diagn Microbiol Infect Dis* 17(2):129-133.
99. Heldwein EE, Lou H, Bender FC, Cohen GH, Eisenberg RJ, Harrison SC. Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. *Science.* 2006;313(5784):217-20.
100. Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, Parés A, Dalekos GN, Krawitt EL, et al. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology.* 2008;48(1):169-76.
101. Hill EL, Hunter GA, Ellis MN. In vitro and in vivo characterization of herpes simplex virus clinical isolates recovered from patients infected with

human immunodeficiency virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991; 35:2322–2328, 1991.

102. Hill A, Jugovic P, York I, Russ G, Bennink J, Yewdell J, et al. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature.* 1995;375(6530):411-5.

103. Holen T, Amarzguioui M, Wiiger MT, Babaie E, Prydz H. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(8):1757-66.

104. Hong YJ, Lim MS, Hwang SM, Kim TS, Park KU, Song J, et al. Detection of herpes simplex and varicella-zoster virus in clinical specimens by multiplex real-time PCR and melting curve analysis. *Biomed Res Int.* 2014;2014:261947.

105. Huang H, Li Y, Sadaoka T, Tang H, Yamamoto T, Yamanishi K, et al. Human herpesvirus 6 envelope cholesterol is required for virus entry. *J Gen Virol.* 2006;87(Pt 2):277-85.

106. Huang F, Zhou J, Yang Z, Cui L, Zhang W, Yuan C, et al. RNA interference inhibits hepatitis E virus mRNA accumulation and protein synthesis in vitro. *Vet Microbiol.* 2010;142(3-4):261-7.

107. Humar A, Kumar D, Caliendo AM, Moussa G, Ashi-Sulaiman A, Levy G, et al. Clinical impact of human herpesvirus 6 infection after liver transplantation. *Transplantation.* 2002;73(4):599-604.

108. Härmä M, Höckerstedt K, Krogerus L, Lautenschlager I. Pretransplant human herpesvirus 6 infection of patients with acute liver failure is a risk factor for posttransplant human herpesvirus 6 infection of the liver. *Transplantation.* 2006;81(3):367-72.

109. International Committee on Taxonomy of Viruses. *Virus Taxonomy Update.* Arch Virol 1993

110. Isegawa Y, Mukai T, Nakano K, Kagawa M, Chen J, Mori Y, et al. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J Virol.* 1999;73(10):8053-63.

111. Jia Q, Sun R. Inhibition of gammaherpesvirus replication by RNA interference. *J Virol.* 2003;77(5):3301-6.

112. Jiang M, Milner J. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference. *Oncogene.* 2002;21(39):6041-8.

113. Jin F, Li S, Zheng K, Zhuo C, Ma K, Chen M, et al. Silencing herpes simplex virus type 1 capsid protein encoding genes by siRNA: a promising antiviral therapeutic approach. *PLoS One.* 2014;9(5):e96623.

114. Johnston C, Magaret A, Selke S, Remington M, Corey L, Wald A. Herpes simplex virus viremia during primary genital infection. *J Infect Dis.* 2008;198(1):31-4.
115. Jovasevic V, Liang L, Roizman B. Proteolytic cleavage of VP1-2 is required for release of herpes simplex virus 1 DNA into the nucleus. *J Virol.* 2008;82(7):3311-9.
116. Kawasaki H, Suyama E, Iyo M, Taira K. siRNAs generated by recombinant human Dicer induce specific and significant but target site-independent gene silencing in human cells. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(3):981-7.
117. Kimberlin DW. Herpes simplex virus infections of the central nervous system. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2003;14(2):83-9.
118. Kimberlin DW, Whitley RJ. Neonatal herpes: what have we learned. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2005;16(1):7-16.
119. Kimberlin D. Herpes simplex virus, meningitis and encephalitis in neonates. *Herpes.* 2004;11 Suppl 2:65A-76A.
120. Kimberlin DW, Whitley RJ. Antiviral resistance: mechanisms, clinical significance, and future implications. *J Antimicrob Chemother.* 1996;37(3):403-21.
121. Kimura H, Futamura M, Kito H, Ando T, Goto M, Kuzushima K, et al. Detection of viral DNA in neonatal herpes simplex virus infections: frequent and prolonged presence in serum and cerebrospinal fluid. *J Infect Dis.* 1991;164(2):289-93.
122. Knowles WA, Gardner SD. High prevalence of antibody to human herpesvirus-6 and seroconversion associated with rash in two infants. *Lancet.* 1988;2(8616):912-3.
123. Knox KK, Harrington DP, Carrigan DR. Fulminant human herpesvirus six encephalitis in a human immunodeficiency virus-infected infant. *J Med Virol.* 1995;45(3):288-92.
124. Kolb AW, Ané C, Brandt CR. Using HSV-1 genome phylogenetics to track past human migrations. *PLoS One.* 2013;8(10):e76267.
125. Kolb AW, Schmidt TR, Dyer DW, Brandt CR. Sequence variation in the herpes simplex virus U(S)1 ocular virulence determinant. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(7):4630-8.
126. Kolb AW, Adams M, Cabot EL, Craven M, Brandt CR. Multiplex sequencing of seven ocular herpes simplex virus type-1 genomes: phylogeny,

sequence variability, and SNP distribution. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(12):9061-73.

127. Kosz-Vnenchak M, Jacobson J, Coen DM, Knipe DM. Evidence for a novel regulatory pathway for herpes simplex virus gene expression in trigeminal ganglion neurons. *J Virol.* 1993;67(9):5383-93.

128. Koutsky LA, Stevens CE, Holmes KK, Ashley RL, Kiviat NB, Critchlow CW, et al. Underdiagnosis of genital herpes by current clinical and viral-isolation procedures. *N Engl J Med.* 1992;326(23):1533-9.

129. Lacoste V, Verschoor EJ, Nerrienet E, Gessain A. A novel homologue of Human herpesvirus 6 in chimpanzees. *J Gen Virol.* 2005;86(Pt 8):2135-40.

130. Lautenschlager I, Höckerstedt K, Linnavuori K, Taskinen E. Human herpesvirus-6 infection after liver transplantation. *Clin Infect Dis.* 1998;26(3):702-7.

131. Lautenschlager I, Razonable RR. Human herpesvirus-6 infections in kidney, liver, lung, and heart transplantation: review. *Transpl Int.* 2012;25(5):493-502.

132. Lautenschlager I, Linnavuori K, Höckerstedt K. Human herpesvirus-6 antigenemia after liver transplantation. *Transplantation.* 2000;69(12):2561-6.

133. Lee SK, Dykxhoorn DM, Kumar P, Ranjbar S, Song E, Maliszewski LE, et al. Lentiviral delivery of short hairpin RNAs protects CD4 T cells from multiple clades and primary isolates of HIV. *Blood.* 2005;106(3):818-26.

134. Leidner RS, Aboulafia DM. Recrudescence Kaposi's sarcoma after initiation of HAART: a manifestation of immune reconstitution syndrome. *AIDS Patient Care STDS.* 2005;19(10):635-44.

135. Leong HN, Tuke PW, Tedder RS, Khanom AB, Eglin RP, Atkinson CE, et al. The prevalence of chromosomally integrated human herpesvirus 6 genomes in the blood of UK blood donors. *J Med Virol.* 2007;79(1):45-51.

136. Leuzinger H, Ziegler U, Schraner EM, Fraefel C, Glauser DL, Heid I, et al. Herpes simplex virus 1 envelopment follows two diverse pathways. *J Virol.* 2005;79(20):13047-59.

137. Levy JA, Landay A, Lennette ET. Human herpesvirus 6 inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication in cell culture. *J Clin Microbiol.* 1990;28(10):2362-4.

138. Levy JA, Ferro F, Greenspan D, Lennette ET. Frequent isolation of HHV-6 from saliva and high seroprevalence of the virus in the population. *Lancet.* 1990;335(8697):1047-50.

139. Leyland B, Kennedy MR, Wimberly YH, Levine BJ, Cherpes TL. Serologic detection of herpes simplex virus type 2 antibodies among pregnant women using a point-of-care test from Focus Diagnostics. *J Clin Virol.* 2009;44(2):125-8.
140. Li H, Meng S, Levine SM, Stratton CW, Tang YW. Sensitive, qualitative detection of human herpesvirus-6 and simultaneous differentiation of variants A and B. *J Clin Virol.* 2009;46(1):20-3.
141. Li Z, Duan F, Lin L, Huang Q, Wu K. A New Approach of Delivering siRNA to the Cornea and its Application for Inhibiting Herpes Simplex Keratitis. *Curr Mol Med.* 2014;14(9):1215-25.
142. Liljeqvist JA, Tunbäck P, Norberg P. Asymptomatically shed recombinant herpes simplex virus type 1 strains detected in saliva. *J Gen Virol.* 2009;90(Pt 3):559-66.
143. Lindberg A, Kreivi JP. Splicing inhibition at the level of spliceosome assembly in the presence of herpes simplex virus protein ICP27. *Virology.* 2002;294(1):189-98.
144. Lindquister GJ, Inoue N, Allen RD, Castelli JW, Stamey FR, Dambaugh TR, et al. Restriction endonuclease mapping and molecular cloning of the human herpesvirus 6 variant B strain Z29 genome. *Arch Virol.* 1996;141(2):367-79.
145. Looker KJ, Garnett GP, Schmid GP. An estimate of the global prevalence and incidence of herpes simplex virus type 2 infection. *Bull World Health Organ.* 2008;86(10):805-12, A.
146. Luo KQ, Chang DC. The gene-silencing efficiency of siRNA is strongly dependent on the local structure of mRNA at the targeted region. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;318(1):303-10.
147. Lupi O, Silva AG, Pereira Jr. AC. Herpes simples genital, uma doença sexualmente transmissível. *F Med* 1995;110:77-98
148. Lupi O, Pereira Jr. AC. Herpes simples. In: Lupi O, Silva AG, Pereira Jr. AC Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento. Rio de Janeiro: Medsi, 2000:43-70
149. Luppi M, Barozzi P, Morris C, Maiorana A, Garber R, Bonacorsi G, et al. Human herpesvirus 6 latently infects early bone marrow progenitors in vivo. *J Virol.* 1999;73(1):754-9.
150. Löwhagen GB, Tunbäck P, Bergström T. Proportion of herpes simplex virus (HSV) type 1 and type 2 among genital and extragenital HSV isolates. *Acta Derm Venereol.* 2002;82(2):118-20.
151. Ma JZ, Russell TA, Spelman T, Carbone FR, Tschärke DC. Lytic gene expression is frequent in HSV-1 latent infection and correlates with the

engagement of a cell-intrinsic transcriptional response. *PLoS Pathog.* 2014;10(7):e1004237.

152. Magalhães IM, Martins RV, Cossatis JJ, Cavaliere RM, Afonso LA, Moysés N, et al. Detection of human herpesvirus 6 and 7 DNA in saliva from healthy adults from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105(7):925-7.

153. Mark HD, Nanda JP, Roberts J, Rompalo A, Melendez JH, Zenilman J. Performance of focus ELISA tests for HSV-1 and HSV-2 antibodies among university students with no history of genital herpes. *Sex Transm Dis.* 2007;34(9):681-5.

154. Markine-Goriaynoff N, Georgin JP, Goltz M, Zimmermann W, Broll H, Wamwayi HM, et al. The core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase-mucin encoded by bovine herpesvirus 4 was acquired from an ancestor of the African buffalo. *J Virol.* 2003;77(3):1784-92

155. Martin ME, Nicholas J, Thomson BJ, Newman C, Honess RW. Identification of a transactivating function mapping to the putative immediate-early locus of human herpesvirus 6. *J Virol.* 1991;65(10):5381-90.

156. Martins, RV, Cossatis JJ, Bonecini, Cavalcanti, SMB. Detection of Human herpesviruses 6 and 7 DNA in saliva from renal transplanted patients and healthy individuals from Rio de Janeiro, Brazil. *Virus Reviews and Research*, 2012; 17: 21-24.

157. Mayaud P, Nagot N, Konaté I, Ouedraogo A, Weiss HA, Foulongne V, et al. Effect of HIV-1 and antiretroviral therapy on herpes simplex virus type 2: a prospective study in African women. *Sex Transm Infect.* 2008;84(5):332-7.

158. McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature.* 2002;418(6893):38-9.

159. McCarthy AM, McMahan L, Schaffer PA. Herpes simplex virus type 1 ICP27 deletion mutants exhibit altered patterns of transcription and are DNA deficient. *J Virol.* 1989;63(1):18-27.

160. McGeoch DJ, Cook S, Dolan A, Jamieson FE, Telford EA. Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *J Mol Biol.* 1995;247(3):443-58.

161. McGeoch DJ, Dolan A, Ralph AC. Toward a comprehensive phylogeny for mammalian and avian herpesviruses. *J Virol.* 2000;74(22):10401-6.

162. McGeoch DJ, Gatherer D. Integrating reptilian herpesviruses into the family herpesviridae. *J Virol.* 2005;79(2):725-31.

163. McGeoch DJ, Rixon FJ, Davison AJ. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res.* 2006;117(1):90-104.
164. Melancon JM, Foster TP, Kousoulas KG. Genetic analysis of the herpes simplex virus type 1 UL20 protein domains involved in cytoplasmic virion envelopment and virus-induced cell fusion. *J Virol.* 2004;78(14):7329-43.
165. Mendez JC, Dockrell DH, Espy MJ, Smith TF, Wilson JA, Harmsen WS, et al. Human beta-herpesvirus interactions in solid organ transplant recipients. *J Infect Dis.* 2001;183(2):179-84.
166. Mertz GJ, Rosenthal SL, Stanberry LR. Is herpes simplex virus type 1 (HSV-1) now more common than HSV-2 in first episodes of genital herpes? *Sex Transm Dis.* 2003;30(10):801-2.
167. Mertz GJ. Asymptomatic shedding of herpes simplex virus 1 and 2: implications for prevention of transmission. *J Infect Dis.* 2008;198(8):1098-100.
168. Mettenleiter TC. Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res.* 2004;106(2):167-80.
169. MicrobeWiki, the student-edited microbiology resource [Internet]. Kerri-Lynn Conrad, 2011 [Citado em 25 de dezembro de 2014]. Disponível em [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Human_Chromosomal_Integration_of_Latent_State_Human_Herpes_Virus_6_\(HHV-6\)](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Human_Chromosomal_Integration_of_Latent_State_Human_Herpes_Virus_6_(HHV-6)).
170. Michel B, Fournier G, Lieffrig F, Costes B, Vanderplasschen A. Cyprinid herpesvirus 3. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(12):1835-43.
171. Minjolle S, Michelet C, Jusselin I, Joannes M, Cartier F, Colimon R. Amplification of the six major human herpesviruses from cerebrospinal fluid by a single PCR. *J Clin Microbiol.* 1999;37(4):950-3.
172. Miralles P, Berenguer J, Garcia de Viedma D, Padilla B, Cosin J, Lopez-Bernaldo de Quiros JC, et al. Treatment of AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy with highly active antiretroviral therapy. *AIDS.* 1998;12(18):2467-72.
173. Miranda MMFS. Viroses dermatópicas In: Introdução a virologia humana Santos, N.S.O., Romanos, M.T.V., Wigg, M.D .2002.1ª edição. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro (RJ): 75 - 85.
174. Ministério da Saúde. [Acesso em 20 de Janeiro de 2015]. Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/>.
175. Mmbaga EJ, Leyna GH, Stray-Pedersen B, Klepp KI. Herpes simplex virus type-2 and human immunodeficiency virus infections in a rural population in Kilimanjaro Tanzania. *East Afr J Public Health.* 2011;8(1):28-32.

176. Montejo M, Ramon Fernandez J, Testillano M, Valdivieso A, Aguirrebengoa K, Varas C, et al. Encephalitis caused by human herpesvirus-6 in a liver transplant recipient. *Eur Neurol.* 2002;48(4):234-5.
177. 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. *J Infect Dis.* 2000;182(1):290-3.
178. Morfin F, Thouvenot D. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. *J Clin Virol.* 2003;26(1):29-37.
179. Mori Y, Seya T, Huang HL, Akkapaiboon P, Dhepakson P, Yamanishi K. Human herpesvirus 6 variant A but not variant B induces fusion from without in a variety of human cells through a human herpesvirus 6 entry receptor, CD46. *J Virol.* 2002;76(13):6750-61.
180. Mori Y, Akkapaiboon P, Yang X, Yamanishi K. The human herpesvirus 6 U100 gene product is the third component of the gH-gL glycoprotein complex on the viral envelope. *J Virol.* 2003;77(4):2452-8.
181. Muratori L, Longhi MS. The interplay between regulatory and effector T cells in autoimmune hepatitis: Implications for innovative treatment strategies. *J Autoimmun.* 2013;46:74-80.
182. Nagot N, Ouédraogo A, Foulongne V, Konaté I, Weiss HA, Vergne L, et al. Reduction of HIV-1 RNA levels with therapy to suppress herpes simplex virus. *N Engl J Med.* 2007;356(8):790-9.
183. Nahmias AJ, Dowdle WR. Antigenic and biologic differences in herpesvirus hominis. *Prog. Med Virol,* 1968, 10:110-159.
184. Nevels M, Nitzsche A, Paulus C. How to control an infectious bead string: nucleosome-based regulation and targeting of herpesvirus chromatin. *Rev Med Virol.* 2011;21(3):154-80.
185. Norberg P, Bergström T, Rekabdar E, Lindh M, Liljeqvist JA. Phylogenetic analysis of clinical herpes simplex virus type 1 isolates identified three genetic groups and recombinant viruses. *J Virol.* 2004;78(19):10755-64.
186. Norberg P, Bergström T, Liljeqvist JA. Genotyping of clinical herpes simplex virus type 1 isolates by use of restriction enzymes. *J Clin Microbiol.* 2006;44(12):4511-4.
187. Norberg P. Divergence and genotyping of human alpha-herpesviruses: an overview. *Infect Genet Evol.* 2010;10(1):14-25.
188. Norberg P, Tyler S, Severini A, Whitley R, Liljeqvist J, Bergström T. A genome-wide comparative evolutionary analysis of herpes simplex virus type 1 and varicella zoster virus. *PLoS One.* 2011;6(7):e22527.

189. Novina CD, Murray MF, Dykxhoorn DM, Beresford PJ, Riess J, Lee SK, et al. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med*. 2002;8(7):681-6.
190. Nyiro JU, Sanders EJ, Ngetsa C, Wale S, Awuondo K, Bukusi E, et al. Seroprevalence, predictors and estimated incidence of maternal and neonatal Herpes Simplex Virus type 2 infection in semi-urban women in Kilifi, Kenya. *BMC Infect Dis*. 2011;11:155.
191. Organização Mundial de Saúde (OMS). [Acesso em 02 de Janeiro de 2015]. Disponível em <http://www.who.int/countries/bra/es/>.
192. Okuno T, Takahashi K, Balachandra K, Shiraki K, Yamanishi K, Takahashi M, et al. Seroepidemiology of human herpesvirus 6 infection in normal children and adults. *J Clin Microbiol*. 1989;27(4):651-3.
193. O' Toole JM, Aubert M, Kotsakis A, Blaho JA. Mutation of the Protein Tyrosine Kinase Consensus Site in the Herpes Simplex Virus 122 Gene Alters ICP22 Posttranslational Modification. *Virology*. 2003; 305:153- 16.
194. Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med*. 1998;338(13):853-60.
195. Paula VS, Silva AP, Michel D, Melgaço JG, Vieira YR, Santos DC, et al. Acute liver failure in an immunocompetent patient. *J Clin Virol*. 2014;60(1):1-3.
196. Paz-Bailey G, Ramaswamy M, Hawkes SJ, Geretti AM. Herpes simplex virus type 2: epidemiology and management options in developing countries. *Sex Transm Infect*. 2007;83(1):16-22.
197. Pedersen SM, Oster B, Bundgaard B, Höllsberg P. Induction of cell-cell fusion from without by human herpesvirus 6B. *J Virol*. 2006;80(19):9916-20.
198. Pellett PE, Black JB, Yamamoto M. Human herpesvirus 6: the virus and the search for its role as a human pathogen. *Adv Virus Res*. 1992;41:1-52.
199. Pellett P, Dominguez, G. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields Virology*. 4th ed: Wolters Kluwer Health, Lippincott Williams & Wilkins 2001 CD-ROM
200. Pellett P, Roizman B. Herpesviridae. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields Virology*. 6th ed: Wolters Kluwer Health, Lippincott Williams & Wilkins 2013. p. 2456.
201. Perng GC, Jones C. Towards an understanding of the herpes simplex virus type 1 latency-reactivation cycle. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2010;2010:262415.

202. Pessa, LFC. Infecções pelos vírus da família *Herpesviridae* no sistema nervoso central. Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais em pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes. Curitiba. Dissertação [Mestrado em Ciências] Universidade Federal do Paraná, 2011.
203. Persengiev SP, Zhu X, Green MR. Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA*. 2004;10(1):12-8.
204. Pinheiro P. MD saúde, informações para os pacientes. [Internet] [Atualizado em 17 de maio de 2015, citado em 28 de julho de 2015]. Disponível em <http://www.mdsaude.com/2009/01/dst-herpes-labial-e-genital.html>.
205. Piret J, Boivin G. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(2):459-72.
206. Portolani M, Fabio G, Pecorari M, Pietrosevoli P, Meacci M, Sabbatini AM, et al. Search for human herpesvirus 6 and human cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage from patients with human immunodeficiency virus-1 and respiratory disorders. *J Med Virol*. 1996;48(2):179-83.
207. Preston CM. Repression of viral transcription during herpes simplex virus latency. *J Gen Virol*. 2000;81(Pt 1):1-19.
208. Proença JT, Coleman HM, Nicoll MP, Connor V, Preston CM, Arthur J, et al. An investigation of herpes simplex virus promoter activity compatible with latency establishment reveals VP16-independent activation of immediate-early promoters in sensory neurones. *J Gen Virol*. 2011;92(Pt 11):2575-85.
209. Pruksananonda P, Hall CB, Insel RA, McIntyre K, Pellett PE, Long CE, et al. Primary human herpesvirus 6 infection in young children. *N Engl J Med*. 1992;326(22):1445-50.
210. Quinn JP, Dalziel RG, Nash AA. Herpes virus latency in sensory ganglia--a comparison with endogenous neuronal gene expression. *Prog Neurobiol*. 2000;60(2):167-79.
211. Rabenau HF, Lennemann T, Kircher C, Gürtler L, Staszewski S, Preiser W, et al. Prevalence- and gender-specific immune response to opportunistic infections in HIV-infected patients in Lesotho. *Sex Transm Dis*. 2010;37(7):454-9.
212. Rebbapragada A, Wachihi C, Pettengell C, Sunderji S, Huibner S, Jaoko W, et al. Negative mucosal synergy between Herpes simplex type 2 and HIV in the female genital tract. *AIDS*. 2007;21(5):589-98.
213. Reil H, Bartlime A, Drerup J, Grewing T, Korn K. Clinical validation of a new triplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection and

discrimination of Herpes simplex virus types 1 and 2. *J Mol Diagn.* 2008;10(4):361-7.

214. Rekadbar E, Tunbäck P, Liljeqvist JA, Bergström T. Variability of the glycoprotein G gene in clinical isolates of herpes simplex virus type 1. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999;6(6):826-31.

215. Roberts MS, Boundy A, O'Hare P, Pizzorno MC, Ciuffo DM, Hayward GS. Direct correlation between a negative autoregulatory response element at the cap site of the herpes simplex virus type 1 IE175 (alpha 4) promoter and a specific binding site for the IE175 (ICP4) protein. *J Virol.* 1988;62(11):4307-20.

216. Roffman E, Albert JP, Goff JP, Frenkel N. Putative site for the acquisition of human herpesvirus 6 virion tegument. *J Virol.* 1990;64(12):6308-13.

217. Rogers J, Rohal S, Carrigan DR, Kusne S, Knox KK, Gayowski T, et al. Human herpesvirus-6 in liver transplant recipients: role in pathogenesis of fungal infections, neurologic complications, and outcome. *Transplantation.* 2000;69(12):2566-73.

218. Roizman B. The function of herpes simplex virus genes: a primer for genetic engineering of novel vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(21):11307-12.

219. Roizman, B, Sears, AE. Herpes Simplex Viruses and Their Replication. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields Virology.* Wolters Kluwer Health 1996. 3th. Editora Lippincott-Raven, Philadelphia (PA): 2231-2295.

220. Roizman B, Whitley RJ. The nine ages of herpes simplex virus. *Herpes.* 2001;8(1):23-7.

221. Roizman B TB, Editors. The strategy of herpes simplex virus replication and takeover of the host cell. Arvin A C-FG, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K, editors., editor. Chapter 13.2007.

222. Roizman B. The checkpoints of viral gene expression in productive and latent infection: the role of the HDAC/CoREST/LSD1/REST repressor complex. *J Virol.* 2011;85(15):7474-82.

223. Roizman B, Knipe D, Whitley R. Herpes Simplex Viruses. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields Virology.* two: Wolters Kluwer Health 2013. p. 2456.

224. Romanowski B, Myziuk LN, Walmsley SL, Trottier S, Singh AE, Houston S, et al. Seroprevalence and risk factors for herpes simplex virus infection in a population of HIV-infected patients in Canada. *Sex Transm Dis.* 2009;36(3):165-9.

225. Rose L, Herra CM, Crowley B. Evaluation of real-time polymerase chain reaction assays for the detection of herpes simplex virus in swab specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008;27(9):857-61.
226. Sacks WR, Greene CC, Aschman DP, Schaffer PA. Herpes simplex virus type 1 ICP27 is an essential regulatory protein. *J Virol*. 1985;55(3):796-805.
227. Safronetz D, Humar A, Tipples GA. Differentiation and quantitation of human herpesviruses 6A, 6B and 7 by real-time PCR. *J Virol Methods*. 2003;112(1-2):99-105.
228. Sakaoka H, Kawana T, Grillner L, Aomori T, Yamaguchi T, Saito H, Fujinaga K. 1987. Genome variations in herpes simplex virus type 2 strains isolated in Japan and Sweden. *J Gen Virol* 68 (Pt 8):2105-2116.
229. Sakaoka H, Kurita K, Iida Y, Takada S, Umene K, Kim YT, et al. Quantitative analysis of genomic polymorphism of herpes simplex virus type 1 strains from six countries: studies of molecular evolution and molecular epidemiology of the virus. *J Gen Virol*. 1994;75 (Pt 3):513-27.
230. Sakaoka H, Aomori T, Honda O, Saheki Y, Ishida S, Yamanishi S, Fujinaga K. 1985. Subtypes of herpes simplex virus type 1 in Japan: classification by restriction endonucleases and analysis of distribution. *J Infect Dis* 152(1):190-197.
231. Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markham PD, Josephs SF, Sturzenegger S, Kaplan M, et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*. 1986;234(4776):596-601.
232. Sandri-Goldin RM, Mendoza GE. A herpesvirus regulatory protein appears to act post-transcriptionally by affecting mRNA processing. *Genes Dev*. 1992;6(5):848-63.
233. Santoro F, Kennedy PE, Locatelli G, Malnati MS, Berger EA, Lusso P. CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell*. 1999;99(7):817-27.
234. Santoro F, Greenstone HL, Insinga A, Liszewski MK, Atkinson JP, Lusso P, et al. Interaction of glycoprotein H of human herpesvirus 6 with the cellular receptor CD46. *J Biol Chem*. 2003;278(28):25964-9.
235. Santos NSDO, Wigg MD, Oliveira DP. *Viroses multissistêmicas*. In: Santos NSdO, Romanos MTV, Wiggs MD, editors. *Introdução a Virologia Humana*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
236. Sasadeusz JJ, Tufaro F, Safrin S, Schubert K, Hubinette MM, Cheung PK, et al. Homopolymer mutational hot spots mediate herpes simplex virus resistance to acyclovir. *J Virol*. 1997;71(5):3872-8.

237. Sauerbrei A, Deinhardt S, Zell R, Wutzler P. Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant clinical isolates of herpes simplex virus. *Antiviral Res.* 2010;86(3):246-52.
238. Sauerbrei A, Pfaff F, Zell R, Wutzler P. Prevalence of herpes simplex virus type 1 glycoprotein G (gG) and gI genotypes in patients with different herpetic diseases during the last four decades. *J Med Virol.* 2012;84(4):651-6.
239. Schaftenaar E, Verjans GM, Getu S, McIntyre JA, Struthers HE, Osterhaus AD, et al. High seroprevalence of human herpesviruses in HIV-infected individuals attending primary healthcare facilities in rural South Africa. *PLoS One.* 2014;9(6):e99243.
240. Schirren H, Schirren CG, Schlupen EM, Volkenandt M, Kind P. [Exacerbation of Hailey-Hailey disease by infection with herpes simplex virus. Detection with polymerase chain reaction]. *Hautarzt.* 1995;46(7):494-7.
241. Schiffer JT, Abu-Raddad L, Mark KE, Zhu J, Selke S, Magaret A, et al. Frequent release of low amounts of herpes simplex virus from neurons: results of a mathematical model. *Sci Transl Med.* 2009;1(7):7ra16.
242. Schiffer JT, Corey L. New concepts in understanding genital herpes. *Curr Infect Dis Rep.* 2009;11(6):457-64.
243. Semizarov D, Frost L, Sarthy A, Kroeger P, Halbert DN, Fesik SW. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 2003; 100(11):6347-52.
244. Schloss L, Falk KI, Skoog E, Brytting M, Linde A, Aurelius E. Monitoring of herpes simplex virus DNA types 1 and 2 viral load in cerebrospinal fluid by real-time PCR in patients with herpes simplex encephalitis. *J Med Virol.* 2009;81(8):1432-7.
245. Zhu J, Hladik F, Woodward A, Klock A, Peng T, Johnston C, et al. Persistence of HIV-1 receptor-positive cells after HSV-2 reactivation is a potential mechanism for increased HIV-1 acquisition. *Nat Med.* 2009;15(8):886-92.
246. Zou P, Isegawa Y, Nakano K, Haque M, Horiguchi Y, Yamanishi K. Human herpesvirus 6 open reading frame U83 encodes a functional chemokine. *J Virol.* 1999;73(7):5926-33.
247. Schmidt-Chanasit J, Bialonski A, Heinemann P, Ulrich RG, Günther S, Rabenau HF, et al. A 10-year molecular survey of herpes simplex virus type 1 in Germany demonstrates a stable and high prevalence of genotypes A and B. *J Clin Virol.* 2009;44(3):235-7.

248. Schmidt-Chanasit J, Bialonski A, Heinemann P, Ulrich RG, Günther S, Rabenau HF, et al. A 12-year molecular survey of clinical herpes simplex virus type 2 isolates demonstrates the circulation of clade A and B strains in Germany. *J Clin Virol.* 2010;48(3):208-11.
249. Schmutzhard J, Merete Riedel H, Zwegberg Wirgart B, Grillner L. Detection of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2 and varicella-zoster virus in skin lesions. Comparison of real-time PCR, nested PCR and virus isolation. *J Clin Virol.* 2004;29(2):120-6.
250. Schomogyi M, Wald A, Corey L. Herpes simplex virus-2 infection. An emerging disease? *Infect Dis Clin North Am.* 1998;12(1):47-61.
251. Scott DA, Coulter WA, Lamey PJ. Oral shedding of herpes simplex virus type 1: a review. *J Oral Pathol Med.* 1997;26(10):441-7.
252. Schubert A, Gentner E, Bohn K, Schwarz M, Mertens T, Sauerbrei A. Single nucleotide polymorphisms of thymidine kinase and DNA polymerase genes in clinical herpes simplex virus type 1 isolates associated with different resistance phenotypes. *Antiviral Res.* 2014;107:16-22.
253. Schwartz RA. Kaposi's sarcoma: an update. *J Surg Oncol.* 2004;87(3):146-51.
254. Sheldrick P, Berthelot N. Inverted repetitions in the chromosome of herpes simplex virus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1975;39 Pt 2:667-78.
255. Sibley CD, Peirano G, Church DL. Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: current and potential application in diagnostic microbiology. *Infect Genet Evol.* 2012;12(3):505-21.
256. Silva AP, Lopes JF, Paula VS. RNA interference inhibits herpes simplex virus type 1 isolated from saliva samples and mucocutaneous lesions. *Braz J Infect Dis.* 2014;18(4):441-4.
257. Simmons A, Demmrich Y, La Vista A, Smith K. Replication of human herpesvirus 6 in epithelial cells in vitro. *J Infect Dis.* 1992;166(1):202-5.
258. Singh N, Paterson DL. Encephalitis caused by human herpesvirus-6 in transplant recipients: relevance of a novel neurotropic virus. *Transplantation.* 2000;69(12):2474-9.
259. Smith CA, Bates P, Rivera-Gonzalez R, Gu B, DeLuca NA. ICP4, the major transcriptional regulatory protein of herpes simplex virus type 1, forms a tripartite complex with TATA-binding protein and TFIIB. *J Virol.* 1993;67(8):4676-87.
260. Smith JS, Robinson NJ. Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review. *J Infect Dis.* 2002;186 Suppl 1:S3-28.

261. Spear PG, Eisenberg RJ, Cohen GH. Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology*. 2000;275(1):1-8.
262. Spear PG, Longnecker R. Herpesvirus entry: an update. *J Virol*. 2003;77(19):10179-85.
263. Spear PG. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol*. 2004;6(5):401-10.
264. Spear PG, Manoj S, Yoon M, Jogger CR, Zago A, Myscofski D. Different receptors binding to distinct interfaces on herpes simplex virus gD can trigger events leading to cell fusion and viral entry. *Virology*. 2006;344(1):17-24.
265. Springer KL, Weinberg A. Cytomegalovirus infection in the era of HAART: fewer reactivations and more immunity. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54(3):582-6.
266. Stanberry L, Cunningham A, Mertz G, Mindel A, Peters B, Reitano M, et al. New developments in the epidemiology, natural history and management of genital herpes. *Antiviral Res*. 1999;42(1):1-14.
267. Storch GA. Diagnostic virology. *Clin. Infect. Dis*. 2001; 31: 739-51.
268. Strick LB, Wald A, Celum C. Management of herpes simplex virus type 2 infection in HIV type 1-infected persons. *Clin Infect Dis*. 2006;43(3):347-56.
269. Stránská R, Schuurman R, Nienhuis E, Goedegebuure IW, Polman M, Weel JF, et al. Survey of acyclovir-resistant herpes simplex virus in the Netherlands: prevalence and characterization. *J Clin Virol*. 2005;32(1):7-18.
270. Studahl M, Hagberg L, Rekabdar E, Bergström T. Herpesvirus DNA detection in cerebral spinal fluid: differences in clinical presentation between alpha-, beta-, and gamma-herpesviruses. *Scand J Infect Dis*. 2000;32(3):237-48.
271. Szpara ML, Gatherer D, Ochoa A, Greenbaum B, Dolan A, Bowden RJ, et al. Evolution and diversity in human herpes simplex virus genomes. *J Virol*. 2014;88(2):1209-27.
272. Tanaka-Taya K, Sashihara J, Kurahashi H, Amo K, Miyagawa H, Kondo K, et al. Human herpesvirus 6 (HHV-6) is transmitted from parent to child in an integrated form and characterization of cases with chromosomally integrated HHV-6 DNA. *J Med Virol*. 2004;73(3):465-73.
273. Tang S, Bertke AS, Patel A, Margolis TP, Krause PR. Herpes simplex virus 2 microRNA miR-H6 is a novel latency-associated transcript-associated microRNA, but reduction of its expression does not influence the establishment of viral latency or the recurrence phenotype. *J Virol*. 2011;85(9):4501-9.

274. Taylor TJ, Knipe DM. Proteomics of herpes simplex virus replication compartments: association of cellular DNA replication, repair, recombination, and chromatin remodeling proteins with ICP8. *J Virol.* 2004;78(11):5856-66.
275. Tedder DG, Ashley R, Tyler KL, Levin MJ. Herpes simplex virus infection as a cause of benign recurrent lymphocytic meningitis. *Ann Intern Med.* 1994;121(5):334-8.
276. Terhune SS, Schröer J, Shenk T. RNAs are packaged into human cytomegalovirus virions in proportion to their intracellular concentration. *J Virol.* 2004;78(19):10390-8.
277. Thäder-Voigt A, Jacobs E, Lehmann W, Bandt D. Development of a microwell adapted immunoblot system with recombinant antigens for distinguishing human herpesvirus (HHV)6A and HHV6B and detection of human cytomegalovirus. *Clin Chem Lab Med.* 2011;49(11):1891-8.
278. Tokatlian T, Segura T. siRNA applications in nanomedicine. Wiley. *Interdiscip. Rev. Nanomed Nanobiotechnol.*, 2010; 2(3):305-15.
279. Torrisi MR, Gentile M, Cardinali G, Cirone M, Zompetta C, Lotti LV, et al. Intracellular transport and maturation pathway of human herpesvirus 6. *Virology.* 1999;257(2):460-71.
280. Trybala E, Roth A, Johansson M, Liljeqvist JA, Rekabdar E, Larm O, et al. Glycosaminoglycan-binding ability is a feature of wild-type strains of herpes simplex virus type 1. *Virology.* 2002;302(2):413-9.
281. Tsao EH, Kellam P, Sin CS, Rasaiyaah J, Griffiths PD, Clark DA. Microarray-based determination of the lytic cascade of human herpesvirus 6B. *J Gen Virol.* 2009;90(Pt 11):2581-91.
282. Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Coen DM, Cullen BR. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature.* 2008;454(7205):780-3.
283. Umene K, Inoue T, Inoue Y, Shimomura Y. 2003. Genotyping of herpes simplex virus type 1 strains isolated from ocular materials of patients with herpetic keratitis. *J Med Virol* 71(1):75-81.
284. Umene K, Kawana T. 2000. Molecular epidemiology of herpes simplex virus type 1 genital infection in association with clinical manifestations. *Arch Virol* 145(3):505-522.
285. Umene K, Koga C, Kameyama T. 2007. Discriminant analysis of DNA polymorphisms in herpes simplex virus type 1 strains involved in primary compared to recurrent infections. *J Virol Methods* 139(2):159-165.

286. Umene K, Sakaoka H. 1997. Populations of two eastern countries of Japan and Korea and with a related history share a predominant genotype of herpes simplex virus type 1. *Arch Virol* 142(10):1953-1961.
287. Umene K, Yoshida M, Sakaoka H. 1996. Comparison of the association with eczema herpeticum in the two predominant genotypes of herpes simplex virus type 1. *J Med Virol* 49(4):329-332.
288. Umene K, Sakaoka H. Evolution of herpes simplex virus type 1 under herpesviral evolutionary processes. *Arch Virol*. 1999;144(4):637
289. Umene K, Inoue T, Inoue Y, Shimomura Y. Genotyping of herpes simplex virus type 1 strains isolated from ocular materials of patients with herpetic keratitis. *J Med Virol*. 2003;71(1):75-81.
290. Umene K, Koga C, Kameyama T. Discriminant analysis of DNA polymorphisms in herpes simplex virus type 1 strains involved in primary compared to recurrent infections. *J Virol Methods*. 2007;139(2):159-65.
291. Universidade Autônoma de Barcelona, curso de bioinformática [Internet] [Citado em 30 de dezembro de 2014]. Disponível em <http://bioinformatica.uab.es> em 30 de dezembro de 2014.
292. Van de Perre P, Segondy M, Foulongne V, Ouedraogo A, Konate I, Huraux JM, et al. Herpes simplex virus and HIV-1: deciphering viral synergy. *Lancet Infect Dis*. 2008;8(8):490-7.
293. Varnum SM, Streblow DN, Monroe ME, Smith P, Auberry KJ, Pasa-Tolic L, et al. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol*. 2004;78(20):10960-6.
294. van Velzen M, Ouwendijk WJ, Selke S, Pas SD, van Loenen FB, Osterhaus AD, et al. Longitudinal study on oral shedding of herpes simplex virus 1 and varicella-zoster virus in individuals infected with HIV. *J Med Virol*. 2013;85(9):1669-77.
295. Vickers TA, Koo S, Bennett CF, Crooke ST, Dean NM, Baker BF. Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. A comparative analysis. *J Biol Chem*. 2003;278(9):7108-18.
296. Wadsworth S, Jacob RJ, Roizman B. Anatomy of herpes simplex virus DNA. II. Size, composition, and arrangement of inverted terminal repetitions. *J Virol*. 1975;15(6):1487-97. Wagner E K. Wagner web site [Internet] [Citado em 5 de janeiro de 2015]. Disponível em <http://darwin.bio.uci.edu>
297. Wald A, Ashley-Morrow R. Serological testing for herpes simplex virus (HSV)-1 and HSV-2 infection. *Clin Infect Dis*. 2002;35(Suppl 2):S173-82.

298. Ward KN. The natural history and laboratory diagnosis of human herpesviruses-6 and -7 infections in the immunocompetent. *J Clin Virol.* 2005;32(3):183-93.
299. Ward KN, Leong HN, Nacheva EP, Howard J, Atkinson CE, Davies NW, et al. Human herpesvirus 6 chromosomal integration in immunocompetent patients results in high levels of viral DNA in blood, sera, and hair follicles. *J Clin Microbiol.* 2006;44(4):1571-4.
300. Weidmann M, Armbruster K, Hufert FT. Challenges in designing a Taqman-based multiplex assay for the simultaneous detection of Herpes simplex virus types 1 and 2 and Varicella-zoster virus. *J Clin Virol.* 2008;42(4):326-34.
301. Weir JP. Genomic organization and evolution of the human herpesviruses. *Virus Genes.* 1998;16(1):85-93.
302. Weiss H. Epidemiology of herpes simplex virus type 2 infection in the developing world. *Herpes.* 2004;11 Suppl 1:24A-35A.
303. Wheeler LA. Silencing sexually transmitted infections: topical siRNA-based interventions for the prevention of HIV and HSV. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2014;2014:125087.
- 304.
305. Whitley RJ. Herpes Simplex Viruses. In: Fields Virology Knipe, D.; Howley, P. 3th 1996,. Editora Lippincott- Raven, Philadelphia (PA): 2297-2342.
306. Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. *Lancet.* 2001;357(9267):1513-8.
307. Whitley RJ. Herpes simplex virus infection. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2002;13(1):6-11.
308. Wisconsin Viral Research Group [Internet] [Citado em 09 de Janeiro de 2015]. Disponível em http://www.wisconsinlab.com/images/reactivation_diagram.jpg.
309. Wigg MD, Miranda, MMFS. Viroses Dermatológicas. In: Santos NSDO, Romanos MTV, Wiggs MD, editors. *Introdução a Virologia Humana.* 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
310. Wood C, Harrington W, Jr. AIDS and associated malignancies. *Cell Res.* 2005;15(11-12):947-52.
311. Wu H, Hait WN, Yang JM. Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells. *Cancer Res.* 2003; 63(7):1515-9.

312. Xu F, Sternberg MR, Kottiri BJ, McQuillan GM, Lee FK, Nahmias AJ, et al. Trends in herpes simplex virus type 1 and type 2 seroprevalence in the United States. *JAMA*. 2006;296(8):964-73.
313. Yamanishi K, Okuno T, Shiraki K, Takahashi M, Kondo T, Asano Y, et al. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet*. 1988;1(8594):1065-7.
314. Yamanishi K, Mori Y, Pellett P. Human Herpesviruses 6 and 7. In: Knipe D HP, editor. *Fields Virology*. two. 6th ed: Wolters Kluwer Health\Lippincott, Williams and Wilkins; 2013. p. 2456.
315. Yi TJ, Walmsley S, Szadkowski L, Raboud J, Rajwans N, Shannon B, et al. A randomized controlled pilot trial of valacyclovir for attenuating inflammation and immune activation in HIV/herpes simplex virus 2-coinfected adults on suppressive antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2013;57(9):1331-8.
316. Yoshida M, Uno F, Bai ZL, Yamada M, Nii S, Sata T, et al. Electron microscopic study of a herpes-type virus isolated from an infant with exanthem subitum. *Microbiol Immunol*. 1989;33(2):147-54.
317. Zachou K, Muratori P, Koukoulis GK, Granito A, Gatselis N, Fabbri A, et al. Review article: autoimmune hepatitis -- current management and challenges. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013;38(8):887-913.
318. Zhang X, Dervillez X, Chentoufi AA, Badakhshan T, Bettahi I, Benmohamed L. Targeting the genital tract mucosa with a lipopeptide/recombinant adenovirus prime/boost vaccine induces potent and long-lasting CD8+ T cell immunity against herpes: importance of MyD88. *J Immunol*. 2012;189(9):4496-509.
319. Zhe R, Mei-Ying Z, Kitazato K, Kobayash N, Qin-Chang Z, Pei-Zhuo Z, et al. Effect of siRNA on HSV-1 plaque formation and relative expression levels of UL39 mRNA. *Arch Virol*. 2008;153(7):1401-6.
320. Zhe R, Shen L, Qiao-Li W, et al. Effect of siRNAs on HSV-1 plaque formation and relative expression levels of RR mRNA. *Virol Sin*. 2011;26:40–6.15.
321. Zhu J, Hladik F, Woodward A, Klock A, Peng T, Johnston C, et al. Persistence of HIV-1 receptor-positive cells after HSV-2 reactivation is a potential mechanism for increased HIV-1 acquisition. *Nat Med*. 2009;15(8):886-92.
322. Zou P, Isegawa Y, Nakano K, Haque M, Horiguchi Y, Yamanishi K. Human herpesvirus 6 open reading frame U83 encodes a functional chemokine. *J Virol*. 1999;73(7):5926-33.

10. ANEXOS

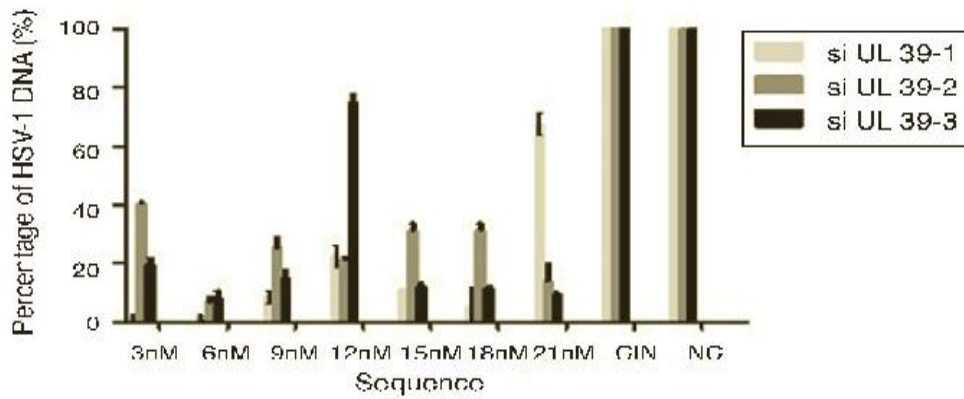
ARTIGO 1

<i>Pacientes</i>	<i>Amostras</i>	<i>Isolamento Viral</i>
Paciente 1	Lesão	Positivo
	Saliva	Negativo
Paciente 2	Lesão	Positivo
	Saliva	Negativo
Paciente 3	Lesão	Positivo
	Saliva	Negativo
Paciente 4	Lesão	Positivo
	Saliva	Positivo
Paciente 5	Saliva *	Positivo
Paciente 6	Saliva *	Positivo

Lesão mucocutâneas variaram de $3,85 \times 10^3$ a $9,78 \times 10^4$ cópias/mL e nas amostras de saliva variaram entre $2,44 \times 10^3$ a $1,54 \times 10^4$ cópias/mL.

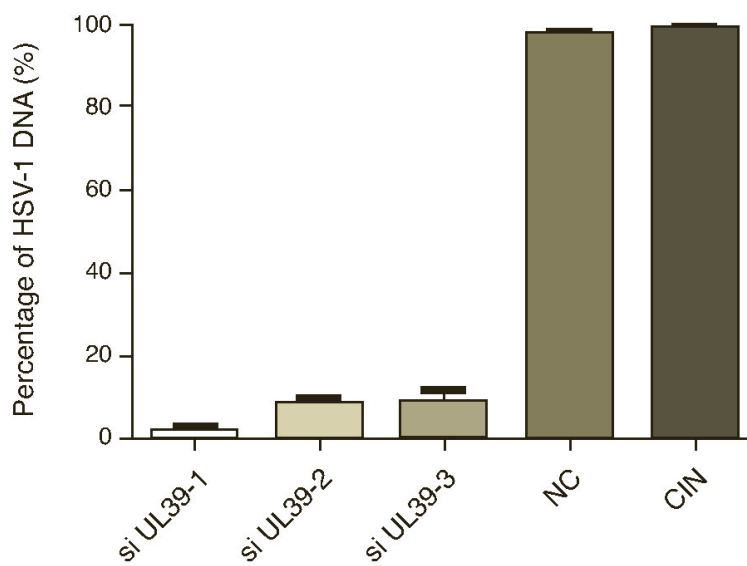
ARTIGO 1

CURVA DOSE



❖ Concentração ideal de siRNA 6 nM

SILENCIAMENTO GÊNICO



Análise do Silenciamento:

- ❖ PCR em tempo real- 99, 90 e 88,5%
- ❖ Plaqueamento: 69, 63 e 68%
- ❖ A sequência 1 apresentou maior eficiência no silenciamento

Rio de Janeiro, 02 de fevereiro de 2012.


Do: Comitê de Ética em Pesquisa do IPEC

Para: Dra. Vanessa Salette de Paula

Prezada Dra. Vanessa,

Com referência ao projeto **“Diagnóstico laboratorial do vírus da herpes simples em pacientes imunocomprometidos”**, aprovado por este Comitê em 28/02/2011, acusamos o recebimento em 31/01/2012 do 1º Relatório Parcial Semestral, entregue por V.Sa. em 21/12/2011 na Coordenação de Pesquisa, onde constam informações sobre a condução do estudo.

Atenciosamente,


D^{ra} Lídia Cordeiro Costa
Coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa
IPEC/FIOCRUZ

CAAE: 0039.0.009.000-10

AR.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus herpes simples em pacientes imunocomprometidos

Pesquisador: ADILSON JOSÉ DE ALMEIDA

Área Temática: Área 4. Equipamentos, insumos e dispositivos para saúde novos, ou não registrados no país.

Versão: 1

CAAE: 11350212.3.0000.5258

Instituição Proponente: Hospital Universitário Gaffree e Guinle/HUGG/UNIRIO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 179.505

Data da Relatoria: 13/12/2012

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo retrospectivo em que se utilizará material armazenado na soroteca da Clínica Médica B do HUGG, coletado entre 2008 e 2012 de pacientes com HIV/Aids.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar infecção pelo vírus do Herpes simplex, através da técnica de PCR em tempo real.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Por tratar-se de análise retrospectiva não se aplicam os princípios da beneficência, da não maleficência nem da autonomia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa a ser desenvolvida em cooperação com o Instituto Oswaldo Cruz da FIOCRUZ, valendo-se de material sorológico armazenado em soroteca própria.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se aplica o princípio da autonomia.

Recomendações:

Necessidade de manutenção da confidencialidade.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Salvo melhor juízo inexistem pendências ou inadequações. Aprovado.

Endereço: Rua Mariz e Barros nº 775

Bairro: Tijuca

CEP: 22.270-004

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)1264-5317

Fax: (21)1264-5177

E-mail: hugg@unirio.br;cephugg@gmail.com

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
GAFFREE E
GUINLE/HUGG/UNIRIO



Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Considerações Finais a critério do CEP:

APROVADO

RIO DE JANEIRO, 20 de Dezembro de 2012

Assinador por:
Pedro Eder Portari Filho
(Coordenador)

Endereço: Rua Mariz e Barros nº 775

Bairro: Tijuca

CEP: 22.270-004

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)1264-5317

Fax: (21)1264-5177

E-mail: hugg@unirio.br;cephugg@gmail.com



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 30 de março de 2010.

Carta: 011/10


De: CEP/FIOCRUZ

Para: - Dra. Vanessa Salete de Paula e
- Dr. Christian M. Niel

Prezados Senhores,

Estamos encaminhando o parecer do protocolo **544/09** intitulado
“**Diagnóstico laboratorial do vírus da herpes simples tipo 1 e avaliação da
infecção utilizando RNA de interferência**” com a deliberação de **APROVADO**.

Atenciosamente


Carla Dias Netto
Secretária Geral
CEP/Fiocruz

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
Fundação Oswaldo Cruz
Avenida Brasil, 4.036 - Sala: 705
Manguinhos - RJ. - CEP.: 21.040-360
Tels.: (21) 3882-9011 Fax: (21) 2561-4815
e-mail: etica@fiocruz.br