

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

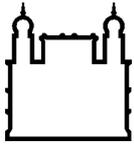
Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Biologia Parasitária

PREVALÊNCIA DAS INFECÇÕES CAUSADAS POR HERPESVÍRUS
HUMANOS EM PORTADORES DO HIV ATRAVÉS DE DIAGNÓSTICO
DIFERENCIAL

AMANDA DE OLIVEIRA LOPES

Orientador (a): Prof. Dra. Vanessa Salete de Paula

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Biologia Parasitária

AMANDA DE OLIVEIRA LOPES

PREVALÊNCIA DAS INFECÇÕES CAUSADAS POR HERPESVÍRUS HUMANOS EM PORTADORES DO HIV ATRAVÉS DE DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Imunologia e Patogenia.

Orientador (a): Prof. Dra. Vanessa Salete de Paula

RIO DE JANEIRO

Fevereiro de 2016

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

L864 Lopes, Amanda de Oliveira

Prevalência das infecções causadas por herpesvírus humanos em portadores do HIV através de diagnóstico diferencial / Amanda de Oliveira Lopes. – Rio de Janeiro, 2016.

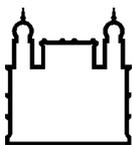
xx, 85 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2016.

Bibliografia: f. 63-83

1. Herpesvírus humanos. 2. Portadores do HIV. 3. Pan-herpesvírus. 4. Diagnóstico diferencial. I. Título.

CDD 616.9112



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Biologia Parasitária

AMANDA DE OLIVEIRA LOPES

PREVALÊNCIA DAS INFECÇÕES CAUSADAS POR HERPESVÍRUS HUMANOS EM PORTADORES DO HIV ATRAVÉS DE DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

ORIENTADOR (A): Prof. Dra. Vanessa Salete de Paula

Aprovada em: 24/02/2016

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Natalia Motta de Araújo - Presidente (IOC/FIOCRUZ)

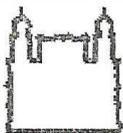
Prof. Dr. Eduardo de Mello Volotão - Membro (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dra. Renata de Mendonça Campos - Membro (UFRJ)

Prof. Dr. Túlio Machado Fumian - Suplente (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dra. Cynthia Chester Cardoso - Suplente (UFRJ)

Rio de Janeiro, 24 de fevereiro de 2016



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Biologia Parasitária de **Amanda de Oliveira Lopes**, sob orientação da Dr^a. Vanessa Salete de Paula. Ao vigésimo quarto dia do mês de fevereiro de dois mil e dezesseis, realizou-se às nove horas, na Sala 14B do Pavilhão Hélio & Peggy Pereira, o exame da dissertação de mestrado intitulada: **"Prevalência das infecções causadas por herpesvirus humanos em portadores do HIV através de diagnóstico diferencial"** no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Imunologia e Patogenia, na linha de pesquisa: Desenvolvimento de Métodos de Diagnóstico e Controle das Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Natália Motta de Araújo - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Eduardo de Mello Volotão - IOC/FIOCRUZ, Dr^a. Renata de Mendonça Campos - UFRJ/RJ e como suplentes: Dr. Tulio Machado Fumian - IOC/FIOCRUZ e Dr^a. Cynthia Chester Cardoso – UFRJ/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 24 de fevereiro de 2016.

Natália Motta de Araújo

Dr^a. Natália Motta de Araújo (Presidente da Banca):

Eduardo de Mello Volotão

Dr. Eduardo de Mello Volotão (Membro da Banca):

Renata de Mendonça Campos

Dr^a. Renata de Mendonça Campos (Membro da Banca):

Rafael Maciel de Freitas

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

Dedico esse trabalho aos grandes amores da minha vida: Deus, minha família e meu amor Daniel, por sempre me apoiarem a seguir em frente, com força e dedicação, para alcançar meus objetivos. Além destes, também dedico este trabalho às pessoas portadoras do HIV que, assim como muitas pessoas, precisam de nossa ajuda na busca de uma qualidade de vida melhor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pelo seu amor incondicional e por todas as bênçãos me fornecidas durante todos esses anos. Sem ele não chegaria onde estou e com ele posso ir cada vez mais longe.

À minha família, minha mãe Telma, meu pai Alberto e meu irmão Thiago por sempre estarem ao meu lado no incentivo de meu estudo, crescimento profissional e pessoal. Obrigada por buscarem junto comigo por um futuro que podemos alcançar quando lutamos, quando nos entregamos e se, além disso, ele for o melhor para nós! Obrigada por toda a força, apoio, amor e torcida, a minha maior torcida! Obrigada por tudo, eu amo vocês incondicionalmente!

Ao meu amor Daniel, obrigada por toda a ajuda que me forneceu para que eu completasse mais essa etapa, a força e a coragem de sempre continuar, mas não somente isso, obrigada pelo seu amor e por compartilhar sua felicidade comigo! Eu te amo muito!

À minha família, principalmente a minha avó Yara e a minha madrinha Tânia, por todo o amor e apoio que me fortalece pela busca de um futuro próspero e feliz. Meu muito obrigada!

Aos meus amigos por estarem na torcida pelo meu sucesso e felicidade. Obrigada por todos esses anos compartilhados, e que mesmo mais distantes, estão sempre presentes, apoiando e desejando para que conquistemos nossos sonhos! Amo vocês!

À minha orientadora Dra. Vanessa de Paula, por esses anos de dedicação a minha formação profissional e pessoal que influenciaram no que sou hoje. Muito obrigada pela confiança e pelo apoio, e principalmente pelo incentivo de sempre seguir em frente, mesmo diante das dificuldades. Meu muito obrigada por estar na torcida de nossas vitórias!

Aos meus amigos do mestrado, principalmente a Andreza e Camilla, meu muito obrigada pela amizade que fizemos durante esses anos e por todos os momentos juntas de disciplinas, trabalho, apoio, conversas, ajudas, risadas, companheirismo e força. Com vocês meus dias na Fiocruz são mais felizes!

Ao meus companheiros do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, como o Dr. Marcelo Pinto, por sempre estarem dispostos a ajudar, sendo muito prestativos e atenciosos. Obrigada pelo companheirismo de cinco anos e por me apoiarem a continuar seguindo em frente.

Ao Dr. Adilson, pela colaboração e ajuda fornecida que contribuíram para que conseguíssemos realizar este trabalho. Além disso, pela paciência e conhecimentos fornecidos que auxiliaram na minha formação. Muito obrigada!

Ao Instituto Oswaldo Cruz/IOC e a Pós-graduação em Biologia Parasitária por me fornecerem mais uma oportunidade de fazer parte deste grande instituto de pesquisa científica, me proporcionando a chance de ter um aprendizado de excelência e experiência, que levarei comigo pelo resto da minha vida profissional. Além disso, obrigada por me fornecer a oportunidade de colaborar na construção da ciência de nosso país!

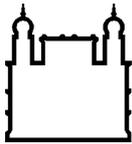
À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES pelo auxílio financeiro. Obrigada!

À minha banca examinadora e à revisora por terem aceitado o convite de participar da conclusão de mais uma etapa importante para mim. Obrigada!

E por fim, à todos, de um modo geral, que me fortaleceram a continuar e a vencer mais essa grande e importante etapa da minha vida, meu muito obrigada!

“O mais importante motivo para se trabalhar na escola e na vida é o prazer no trabalho, prazer no seu resultado e a certeza do valor do resultado para a comunidade.”

(Albert Einstein 1879 - 1955)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

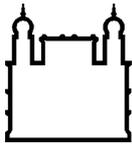
PREVALÊNCIA DAS INFECÇÕES CAUSADAS POR HERPESVÍRUS HUMANOS EM PORTADORES DO HIV ATRAVÉS DE DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Amanda de Oliveira Lopes

Os herpesvírus humanos (HHV) (herpes simples 1 e 2, varicella-zoster, Epstein-Barr, citomegalovírus humano, herpesvírus humanos 6A, 6B, 7 e 8) estão associados à diversas doenças, porém são nos indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) que estes herpesvírus causam infecção grave e duradoura, podendo levá-los ao óbito. Contudo, no Brasil, pouco é conhecido sobre a verdadeira prevalência das infecções causadas por HHV nesses indivíduos devido a poucos estudos realizados no país. Portanto, este trabalho visou determinar a prevalência desta co-infecção HIV/Herpesvírus humanos através de um diagnóstico diferencial que detecta simultaneamente as nove espécies de HHV (*Pan-herpesvírus*). Este método é baseado na amplificação, por reação em cadeia da polimerase (PCR) *Nested*, de uma região altamente conservada (DPOL) do genoma desses vírus e na identificação da espécie viral por sequenciamento do genoma viral. Além disso, este estudo visou avaliar possíveis fatores associados com a prevalência desta co-infecção, como sexo, idade e taxas de linfócitos T CD4+ (LT CD4+), e destinou-se comparar a prevalência das infecções causadas por HHV entre indivíduos HIV reagentes (grupo teste) e indivíduos não reagentes para este vírus (grupo controle). Para isso, 241 amostras de soro de indivíduos portadores do HIV coletadas durante os anos de 2012 (95 amostras), 2013 (89 amostras) e 2014 (57 amostras), e 94 amostras de soro de indivíduos HIV não reagentes coletadas durante o ano de 2013 foram testadas através de PCR *Nested*. As amostras amplificadas foram sequenciadas para a identificação da espécie viral. Com isso, neste estudo foi encontrada prevalência da co-infecção HIV/HHV de 14,1% (34/241), sendo 13% (31/241), 0,8% (2/241) e 0,4% (1/241) relacionado às co-infecções HIV/HSV-1, HIV/HHV-6 e HIV/HHV-8, respectivamente. Também foi observada diminuição estatisticamente significativa (p -valor < 0,0001) da prevalência da co-infecção HIV/HHV durante os anos estudados. Já o grupo controle obteve menor prevalência da infecção causada por HHV (1,1%; 1/94) e foi referente à infecção causada por HHV-6. Ademais, foi verificada associação estatisticamente significativa da detecção da co-infecção HIV/HSV-1 com as taxas de LT CD4+, evidenciando que a taxa LT CD4+ < 500 células/mm³ é um fator de risco para infecções causadas por HSV-1 em indivíduos HIV reagentes (p -valor < 0,0327/ p -valor < 0,0186). A partir disto, foi verificado que o *Pan-herpesvírus* foi eficiente na detecção das co-infecções HIV/HSV-1, HIV/HHV-6 e HIV/HHV-8. Sendo assim, este trabalho contribuiu para a investigação da prevalência das infecções causadas por herpesvírus humanos em indivíduos HIV reagentes no Rio de Janeiro/Brasil.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

PREVALENCE OF INFECTIONS CAUSED BY HUMAN HERPESVIRUS IN PEOPLE LIVING WITH HIV THROUGH DIFFERENTIAL DIAGNOSIS

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITIC BIOLOGY

Amanda de Oliveira Lopes

The human herpesviruses (HHV) (herpes simplex 1 and 2, varicella-zoster, Epstein-Barr virus, human cytomegalovirus, human herpesviruses 6A, 6B, 7 and 8) are associated with several diseases, but these herpesviruses cause serious and lasting infection in individuals infected by the human immunodeficiency virus (HIV) and can lead to death. However, in Brazil few is known about the true prevalence of human herpesviruses infection in these individuals because of few studies in the country. Therefore, this study aimed to determine the prevalence of co-infection HIV/human herpesviruses through a differential diagnosis that simultaneously detects nine HHV species (*Pan*-herpesviruses). This method is based on amplification a highly conserved region (DPOL) genome of these viruses by Nested polymerase chain reaction (PCR) and on viral species identification by sequencing of the viral genome. In addition, this study aimed to evaluate possible factors associated with the prevalence of co-infection, such as sex, age and T CD4+ lymphocytes rates (LT CD4+), and aimed to compare the prevalence of infections caused by HHV among individuals HIV reagents and no reagents for this virus (control group). For this, 241 serum samples from individuals with HIV collected during the years 2012 (95 samples), 2013 (89 samples) and 2014 (57 samples), and 94 serum samples from individuals without HIV collected during the year 2013 were tested by Nested PCR. The amplified samples were sequenced for identification of the viral species. This study found prevalence of co-infection HIV/HHV 14,1% (34/241), in which 13% (31/241), 0,8% (2/241) and 0,4% (1/241) were related with the co-infections HIV/HSV-1, HIV/HHV-6 and HIV/HHV-8, respectively. A decrease statistically significant (p -value $<0,0001$) in the prevalence of co-infection HIV/HHV was observed during the years of study. The control group had lower prevalence of infection caused by HHV (1,1%; 1/94) and was related with the infection caused by HHV-6. In addition, there was a statistically significant association between detection of co-infection HIV/HSV-1 with LT CD4+ rates, showing that LT CD4+ rate <500 cells/mm³ is a risk factor for infections caused by HSV-1 in individuals HIV reagents (p -value $<0,0327$ / p -value $<0,0186$). From this, was verified that the *Pan*-herpesviruses was efficient in the detection of co-infections HIV/HSV-1, HIV/HHV-6 and HIV/HHV-8. Therefore, this study contributed to the investigation of the prevalence of infections caused by human herpesviruses in people living with HIV in Rio de Janeiro/Brazil.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1. Elementos estruturais do VZV.....	2
Figura 1.2. Mapa genético do HHV-8	3
Figura 1.3. Vias de entrada dos herpesvírus	4
Figura 1.4. Ciclo de replicação do VZV.....	5
Figura 1.5. Envelopamento e liberação das partículas virais.....	6
Figura 1.6. Estabelecimento da latência celular do HSV.....	8
Figura 1.7. Reativação do HSV.....	9
Figura 1.8. Herpes labial.....	12
Figura 1.9. Doenças causadas por VZV.....	14
Figura 1.10. Roséola <i>infantum</i>	17
Figura 1.11. Sarcoma de Kaposi.....	19
Figura 1.12. Calendário de vacinação da criança.....	20
Figura 1.13. Soroprevalência de HHV-8.....	25
Figura 1.14. Elementos estruturais do HIV-1.....	29
Figura 4.1. Resultado do teste de detecção de herpesvírus humanos por PCR <i>Nested (Pan-PCR)</i>	46
Figura 4.2. Resultado do limite de detecção da PCR <i>Nested (Pan-PCR)</i>	46

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1.1. Herpesvírus que infectam seres humanos.....	2
Tabela 1.2. Sítios de infecção dos herpesvírus humanos.....	7
Tabela 1.3. Principais doenças associadas aos herpesvírus humanos.....	11
Tabela 1.4. Soroprevalência dos herpesvírus humanos no mundo e no Brasil.....	26
Tabela 4.1. Distribuição de indivíduos HIV reagentes por idade, sexo e taxas de linfócitos T CD4+ ao longo dos anos 2012-2014.....	44
Tabela 4.2. Distribuição de indivíduos HIV reagentes por faixa etária ao longo dos anos 2012-2014	45
Tabela 4.3. Resultados da detecção de herpesvírus humanos por <i>Pan</i> -herpesvírus na população de indivíduos HIV reagentes (2012-2014)	47
Tabela 4.4. Comparação da detecção de herpesvírus humanos por <i>Pan</i> -herpesvírus entre os grupos controle (HIV-) e teste (HIV+), e a distribuição desses indivíduos por idade e sexo...49	
Tabela 4.5. Associação da detecção da co-infecção HIV/HSV-1 com as variáveis idade, sexo e taxas de linfócito T CD4+.....	50
Tabela 4.6. Determinação da carga viral por PCR em tempo real dos indivíduos dos grupos controle (HIV-) e teste (HIV+) reagentes para herpesvírus humanos no <i>Pan</i> -herpesvírus.....	51

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 3.1. Sequências dos iniciadores referentes à primeira etapa da PCR	37
Quadro 3.2. Termociclagem referente à primeira etapa da PCR <i>Nested</i>	37
Quadro 3.3. Sequências dos iniciadores referentes à segunda etapa da PCR <i>Nested</i>	38
Quadro 3.4. Termociclagem referente à segunda etapa da PCR <i>Nested</i>	38
Quadro 3.5. Sequências dos iniciadores, sonda e curva padrão sintética utilizados na PCR em tempo real para detecção e quantificação do HSV-1.....	41
Quadro 3.6. Termociclagem referente à PCR em tempo real para detecção e quantificação do HSV-1.....	41
Quadro 3.7. Sequências dos iniciadores, sonda e curva padrão sintética utilizados na PCR em tempo real para detecção e quantificação do HHV-6 (HHV-6A e HHV-6B).....	42
Quadro 3.8. Termociclagem referente à PCR em tempo real para detecção e quantificação do HHV-6 (HHV-6A e HHV-6B).....	43

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 4.1. Gráfico indicando a distribuição de indivíduos HIV reagentes entre as faixas etárias de 10 a 69 anos de idade nos anos 2012-2014.....	45
Gráfico 4.2. Gráfico indicando os resultados da detecção de herpesvírus humanos por Pan-herpesvírus na população de indivíduos portadores do HIV (2012-2014).....	48

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Por cento
χ^2	Qui-quadrado
<	Menor
=	Igual
\geq	Maior ou igual
°C	Grau Celsius
μg	Micrograma
μM	Micromolar
A	Adenina
ACV	Aciclovir
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C	Citosina
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CD4	Grupamento de diferenciação 4 ou <i>cluster of differentiation 4</i>
CD8	Grupamento de diferenciação 8 ou <i>cluster of differentiation 8</i>
CN1	Controle negativo da reação em cadeia da polimerase
CN2	Controle negativo da extração de DNA viral
CTA	Centros de Testagem e Aconselhamento
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Dinucleotídeos trifosfatados
DP	Desvio-padrão
DPOL	Gene que codifica a DNA polimerase dos herpesvírus humanos
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
EBNA-1	<i>Epstein-Barr nuclear antigen 1</i>
EBV	Vírus Epstein-Barr
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
<i>g</i>	Força gravitacional

g	Gramas
G	Guanina
gB	Glicoproteína B
gD	Glicoproteína D
gH	Glicoproteína H
gL	Glicoproteína L
gp120	Glicoproteína 120
gp41	Glicoproteína 41
HCMV	Citomegalovírus humano
HHV	Herpesvírus Humano
HHV+	Indivíduos reagentes para os herpesvírus humanos
HHV-1	Herpesvírus Humano 1
HHV-2	Herpesvírus humano 2
HHV-3	Herpesvírus humano 3
HHV-4	Herpesvírus humano 4
HHV-5	Herpesvírus humano 5
HHV-6	Herpesvírus humano 6
HHV-6A	Herpesvírus humano 6A
HHV-6B	Herpesvírus humano 6B
HHV-7	Herpesvírus humano 7
HHV-8	Herpesvírus humano 8
HIV-	Indivíduos não reagentes para o vírus da imunodeficiência humana
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HIV+	Indivíduos reagentes para o vírus da imunodeficiência humana
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana 1
HIV-2	Vírus da imunodeficiência humana 2
HSH	Homens que fazem sexo com homens
HSV	Vírus herpes simples
HSV-1 -	Indivíduos não reagentes para o vírus herpes simples 1
HSV-1	Vírus herpes simples 1
HSV-1 +	Indivíduos reagentes para o vírus herpes simples 1
HSV-2	Vírus herpes simples 2
HUGG	Hospital Universitário Gaffrée e Guinle
HZ	Herpes zoster

I	Inosina
ICTV	<i>International Comitee for Viruses Taxonomy</i>
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
kb	Quilobase
KSHV	<i>Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus</i>
LT CD4+	Linfócitos T CD4+
MGB	<i>Minor groove binder</i>
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mm³	Milímetros cúbicos
MNE	Membrana nuclear externa
MNI	Membrana nuclear interna
<i>n</i>	Número
nm	Nanômetro
NTC	<i>No template control</i>
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i> ou reação em cadeia da polimerase
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
qPCR	<i>Real time polimerase chain reaction</i> ou Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RJ	Estado do Rio de Janeiro
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	<i>Reverse transcription polimerase chain reaction</i>
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SK	Sarcoma de Kaposi
T	Timina
TAE	Tris Acetato EDTA
TARV	Terapia antirretroviral
TK	Timidina quinase

U	Unidade
UNG	Uracil-N-glicosilase
USA	<i>United States of America</i>
VP23	Proteína do capsídeo do vírion dos HHV-6A e HHV-6B
VZV	Vírus da varicela zoster
WHO	<i>World Health Organization</i>
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μL	Microlitros

ÍNDICE

	Página
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Família <i>Herpesviridae</i>	1
1.2. Morfologia dos herpesvírus	2
1.3. Replicação dos herpesvírus	4
1.4. Latência celular dos herpesvírus	6
1.5. Patologias causadas pelos herpesvírus humanos	10
1.5.1. Vírus herpes simples 1 e 2	11
1.5.2. Vírus varicella-zoster	13
1.5.3. Vírus Epstein-Barr	14
1.5.4. Citomegalovírus humano	15
1.5.5. Herpesvírus humano 6A, 6B e 7	16
1.5.6. Herpesvírus humano 8	18
1.6. Vacinação contra infecções causadas por herpesvírus humanos	19
1.7. Tratamento das infecções causadas por herpesvírus humanos	21
1.8. Epidemiologia das infecções causadas por herpesvírus humanos	22
1.9. Diagnóstico laboratorial dos herpesvírus humanos	27
1.10. Co-infecção HIV/Herpesvírus humanos	29
1.11. Justificativa	31
2. OBJETIVOS	32
2.1. Objetivo Geral	32
2.2. Objetivos Específicos	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. Aspectos éticos da pesquisa	33
3.2. População de estudo	33
3.3. Seleção de amostras	33
3.3.1. Critérios de inclusão de amostras	33
3.3.2. Critérios de exclusão de amostras	33
3.4. Coleta das amostras de soro	34
3.5. Extração do DNA dos herpesvírus humanos	34
3.6. Detecção simultânea dos herpesvírus humanos por <i>Pan</i>-herpesvírus	35

3.6.1. <i>Teste de detecção de herpesvírus humanos por PCR Nested (Pan-PCR)</i>	35
3.6.2. <i>Limite de detecção da PCR Nested (Pan-PCR)</i>	36
3.6.3. <i>PCR Nested (Pan-PCR)</i>	36
3.6.3.1 <i>Primeira etapa de amplificação</i>	36
3.6.3.2 <i>Segunda etapa de amplificação</i>	37
3.6.4. <i>Eletroforese</i>	39
3.6.5. <i>Sequenciamento do genoma dos herpesvírus humanos</i>	39
3.7. <i>Detecção e quantificação absoluta dos herpesvírus humanos por PCR em tempo real</i>	40
3.7.1. <i>PCR em tempo real para detecção e quantificação do HSV-1</i>	40
3.7.2. <i>PCR em tempo real para detecção e quantificação do HHV-6 (HHV-6A e HHV-6B)</i>	42
3.8. <i>Análise estatística dos resultados</i>	43
4. RESULTADOS	44
4.1. <i>Características da população de indivíduos HIV reagentes (Grupo teste)</i>	44
4.2. <i>Teste de detecção de herpesvírus humanos por PCR Nested (Pan-PCR)</i>	45
4.3. <i>Limite de detecção da PCR Nested (Pan-PCR)</i>	46
4.4. <i>Detecção de herpesvírus humanos em indivíduos HIV reagentes por Pan-herpesvírus</i>	47
4.5. <i>Comparação da detecção de herpesvírus humanos por Pan-herpesvírus entre os grupos controle (HIV não reagente) e teste (HIV reagente)</i>	48
4.6. <i>Associação da detecção da co-infecção HIV/HSV-1 com as variáveis idade, sexo e taxas de linfócito T CD4+</i>	49
4.7. <i>Determinação da carga viral por PCR em tempo real dos indivíduos dos grupos controle (HIV-) e teste (HIV+) reagentes para herpesvírus humanos no Pan-herpesvírus</i>	50
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÕES	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
8. ANEXOS	84
8.1. <i>Anexo 1: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos</i> ...84	

1. INTRODUÇÃO

1.1. Família *Herpesviridae*

A antiga família *Herpesviridae* foi revisada pelo *International Comitee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) e dividida em três novas famílias, que foram incorporadas na ordem Herpesvirales (Davison *et al.*, 2009; Zolini, 2012). São elas: *Herpesviridae* (que contém vírus de mamíferos, aves e répteis), *Alloherpesviridae* (que contém vírus de peixes e anfíbios) e *Malacoherpesviridae* (que contém vírus de bivalves) (Zolini, 2012).

Dentre os vírus da família *Herpesviridae*, nove herpesviroses foram descritas em associação à infecção em humanos. São eles: vírus herpes simples 1 (HSV-1) e 2 (HSV-2), vírus varicella-zoster (VZV), vírus Epstein-Barr (EBV), citomegalovírus humano (HCMV), herpesvírus humanos 6A, 6B, 7 e 8 (HHV-6A, HHV-6B, HHV-7, HHV-8) (Pellet e Roizman, 2013) (Tabela 1.1).

A família *Herpesviridae* foi dividida em três subfamílias, de acordo com as propriedades biológicas e a análise filogenética dos vírus. São elas: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae* (Roizman *et al.*, 1981; Pellet 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. Dentre os membros desta subfamília estão o HSV-1, o HSV-2 e o VZV (Roizman e Whitley, 2001). A subfamília *Betaherpesvirinae* tem como principais características um restrito número de hospedeiros, serem citomegálicos (aumento das células infectadas), crescimento lento e infecções latentes nas glândulas secretórias, nos rins e outros tecidos. Nesta subfamília tem-se o HCMV, o HHV-6A, o HHV-6B e o HHV-7. Já a subfamília *Gammaherpesvirinae* tem como principais características causarem infecções latentes nas células linfóides. Nesta subfamília encontra-se o EBV e o HHV-8 (Gilbert, Bestman-Smith e Boivin, 2002; Roizman, Knipe e Whitley, 2007).

Tabela 1.1. Herpesvírus que infectam seres humanos. Fonte: (Pellet e Roizman, 2013) (modificado)

Designação	Sinônimo	Subfamília	Abreviatura
Herpesvírus humano 1	Vírus herpes simples 1	α	HSV-1/HHV-1
Herpesvírus humano 2	Vírus herpes simples 2	α	HSV-2/HHV-2
Herpesvírus humano 3	Vírus varicella-zoster	α	VZV/HHV-3
Herpesvírus humano 4	Vírus Epstein-Barr	γ	EBV/HHV-4
Herpesvírus humano 5	Citomegalovírus humano	β	HCMV/HHV-5
Herpesvírus humano 6A		β	HHV-6A
Herpesvírus humano 6B		β	HHV-6B
Herpesvírus humano 7		β	HHV-7
Herpesvírus humano 8	Herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi	γ	KSHV/HHV-8

1.2. Morfologia dos herpesvírus

Os herpesvírus variam de tamanho, cerca de 120 a 260 nm de diâmetro (Pellet e Roizman, 2013). Estes vírus possuem três elementos estruturais básicos: a) o nucleocapsídeo, contendo o capsídeo icosaédrico e o DNA viral em seu interior; b) o envelope lipídico, contendo as glicoproteínas virais; c) o tegumento viral, constituído por um conjunto de proteínas que ocupam o espaço entre o nucleocapsídeo e o envelope lipídico (De Bolle, Naesens e De Clercq, 2005; Olival *et al.*, 2013). Na figura 1.1, verificam-se essas estruturas dos herpesvírus com o vírus varicella-zoster como modelo.

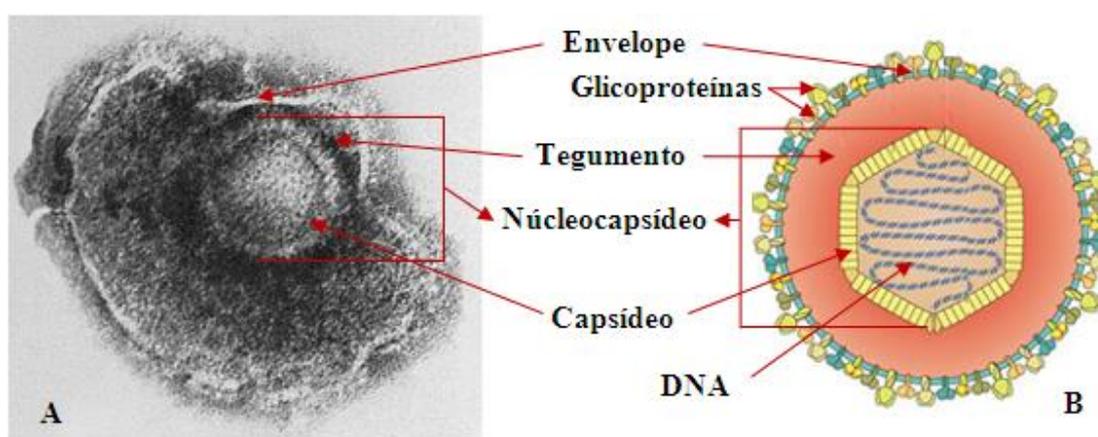
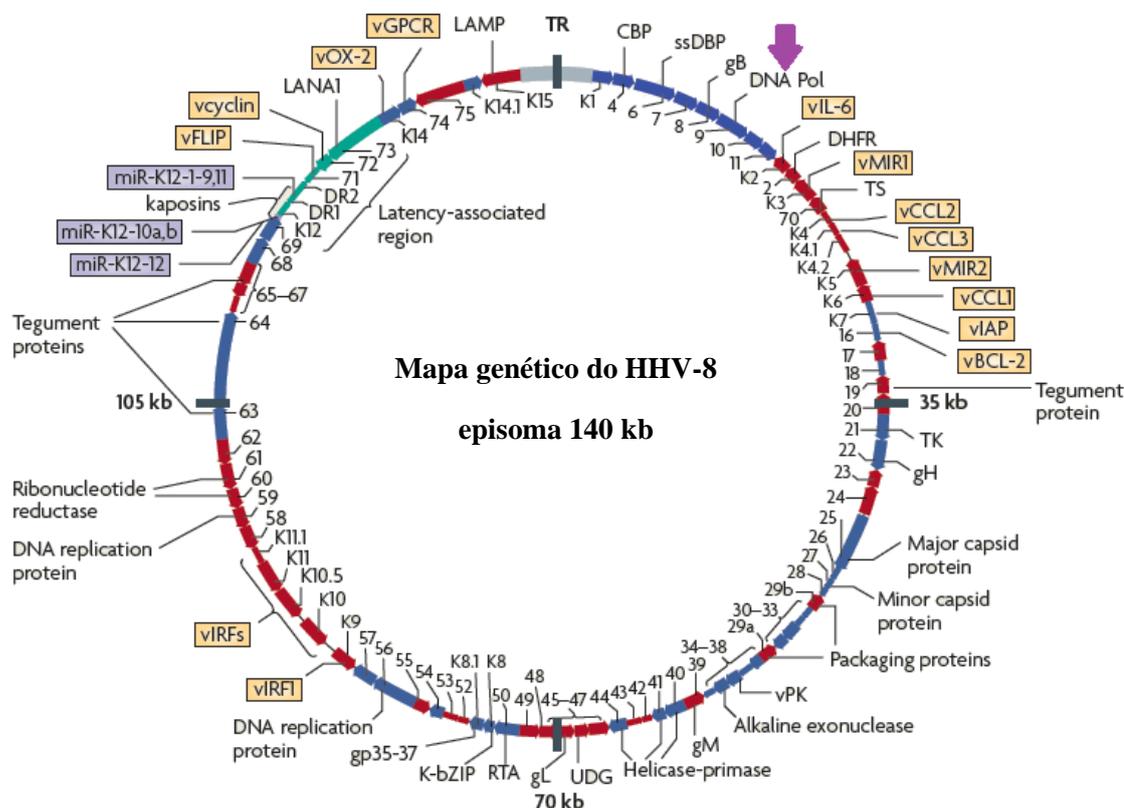


Figura 1.1. Elementos estruturais do VZV. Micrografia eletrônica (A) e desenho esquemático (B) evidenciando o vírus varicella-zoster e suas estruturas. As setas indicam o envelope, as glicoproteínas virais, o tegumento, o nucleocapsídeo, o capsídeo e o DNA viral. Fonte: (Zerboni *et al.*, 2014) e cdc.gov (modificados)

Como material genético, os herpesvírus apresentam uma dupla fita de DNA a qual se encontra linearmente dentro da partícula, com cerca de 124 a 295 kb, contendo uma proporção dos nucleotídeos guanina e citosina de 31% a 77% (Pellet e Roizman, 2013).

Além disso, é estimado que o genoma dos membros da família *Herpesviridae* codifique 70 (o menor genoma) a 200 (o maior genoma) genes (Pellet e Roizman, 2013), sendo que muitos desses genes são alvos de estudos, como o gene que codifica a DNA polimerase destes vírus (DPOL). Por conter regiões altamente conservadas, este gene é visado para detecção dos herpesvírus dessa família (Ehlers *et al.*, 1999; Ehlers *et al.*, 2007). A figura 1.2 evidencia o mapa genético do HHV-8, utilizado como modelo, e o local de codificação da DNA polimerase deste vírus em seu episoma (DNA circular de cadeia dupla formada após infecção).



hospedeira e na evasão do sistema imune. A composição de proteínas do tegumento e envelope variam entre os vírus da família *Herpesviridae* (Itzhaki e Wozniak, 2006; Liu e Zhou, 2007).

1.3. Replicação dos herpesvírus

A infecção por herpesvírus se inicia com a entrada do vírus na célula hospedeira através da fusão do envelope viral com a membrana plasmática desta célula (pH independente) ou da fusão do envelope viral com a membrana endocítica após a endocitose da partícula viral (pH dependente) (Figura 1.3) (Nicola, Mcevoy e Straus, 2003; Milne *et al.*, 2005; Connolly *et al.*, 2011).

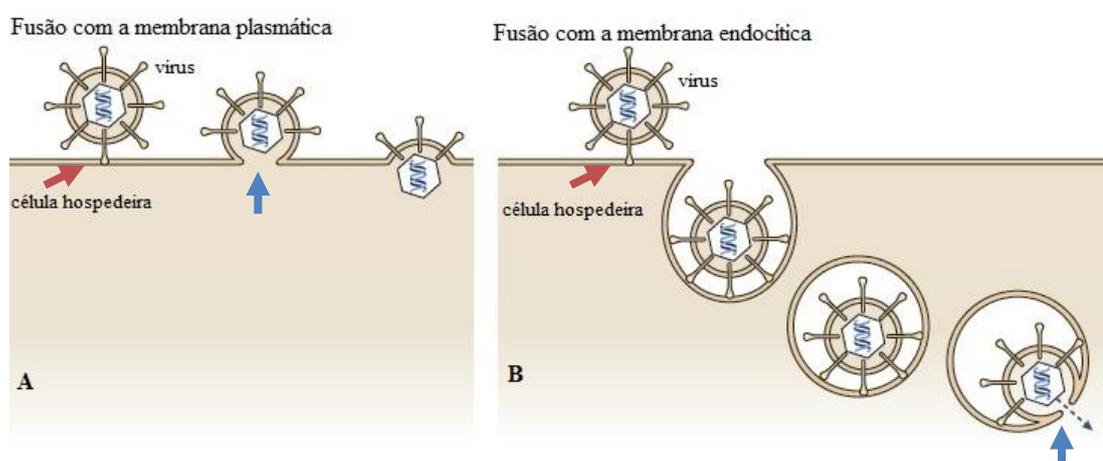


Figura 1.3. Vias de entrada dos herpesvírus. Desenho esquemático evidenciando os mecanismos de entrada dos herpesvírus na célula hospedeira: por fusão com a membrana plasmática (A) e por fusão com a membrana endocítica (B). Setas vermelhas indicam a adsorção do vírus na célula hospedeira. Setas azuis indicam os poros de fusão formados. Fonte: (Connolly *et al.*, 2011) (modificado)

Entretanto, para que isso ocorra é necessário que haja a adsorção do vírus nesta célula através da interação das glicoproteínas virais com receptores celulares específicos (Figura 1.3) (Connolly *et al.*, 2011).

Após isso, o poro de fusão é formado resultando na liberação do núcleocapsídeo viral e proteínas do tegumento no citoplasma da célula hospedeira (Figura 1.3) (Connolly *et al.*, 2011). Estas proteínas do tegumento realizam as primeiras fases de replicação dos herpesvírus, incluindo cessar a síntese de proteínas da célula hospedeira e ativar os genes virais imediatamente iniciais (Johnson e Baines, 2011).

Por meio do sistema de microtúbulos, o núcleocapsídeo, então, é levado em direção à membrana nuclear e é desmontado, liberando o DNA viral no interior do núcleo através de seus poros (Johnson e Baines, 2011), onde, uma vez neste, rapidamente se torna circular (episoma) (Zerboni *et al.*, 2014).

A partir de então, inicia-se o processo de replicação viral no núcleo, com a expressão de genes imediatamente iniciais, que codificam proteínas relacionadas à regulação gênica das próximas etapas de transcrição. Após isso, são expressos genes precoces, que, por sua vez, codificam proteínas relacionadas à replicação do genoma viral. Os últimos a serem expressos são os genes tardios, os quais codificam as proteínas estruturais dos herpesvírus, ou seja, as proteínas que formam o capsídeo, o tegumento e o envelope (glicoproteínas) (Paludan *et al.*, 2011). Isto é evidenciado na figura 1.4 com o ciclo de replicação do vírus varicella-zoster usado como modelo de replicação dos herpesvírus.

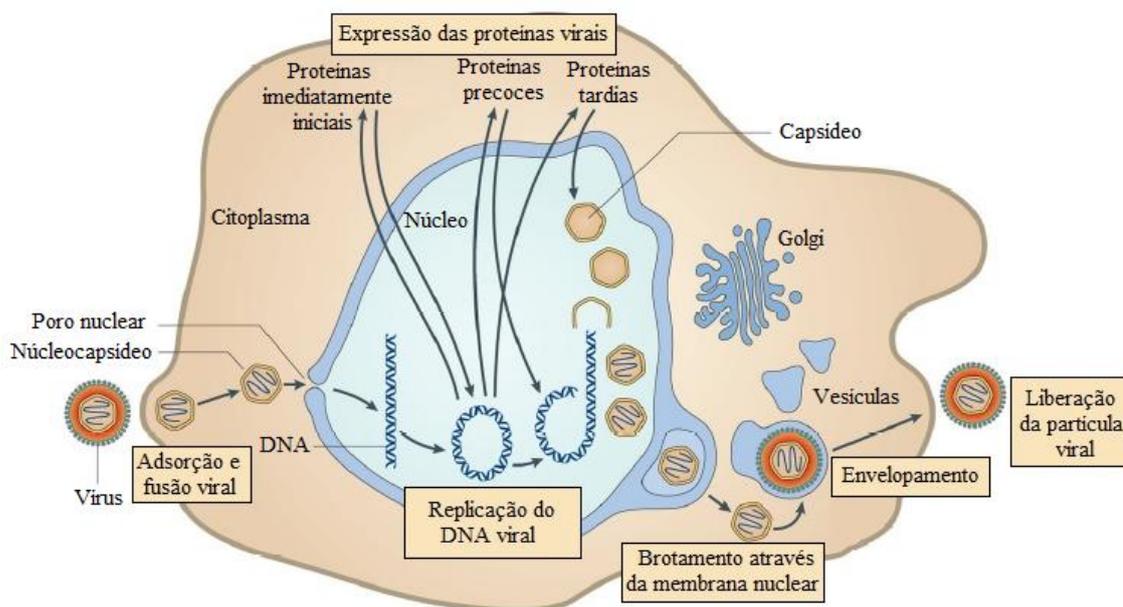


Figura 1.4. Ciclo de replicação do VZV. O vírus realiza a adsorção e fusão do envelope viral com a membrana celular da célula hospedeira, liberando o nucleocapsídeo e proteínas do tegumento no citoplasma da mesma. Posteriormente ocorre a migração do nucleocapsídeo e a entrada do DNA viral pelos poros nucleares, que, uma vez no núcleo, se circulariza. Verifica-se, então, o processo de replicação viral com a transcrição dos genes virais, que codificam as proteínas imediatamente iniciais, precoces e tardias. Após a replicação do genoma viral, ocorre a encapsidação do DNA viral e o brotamento do nucleocapsídeo pelas membranas nucleares. Posteriormente este é envelopado, adquirindo proteínas do tegumento e do envelope, e liberado da célula hospedeira através de vesículas do complexo de Golgi. Fonte: (Zerboni *et al.*, 2014) (modificado)

No núcleo, quando uma quantidade suficiente de proteínas tardias está disponível, os capsídeos são formados, o DNA viral é empacotado nos capsídeos vazios e há, então, a formação dos nucleocapsídeos (Johnson e Baines, 2011; Paludan *et al.*, 2011).

Uma vez formados, estes nucleocapsídeos realizam o brotamento através da membrana nuclear e são liberados para o citoplasma da célula hospedeira (Figura 1.4) (Johnson e Baines, 2011).

No citoplasma, os núcleocapsídeos são revestidos por uma camada de proteínas que formam o tegumento, e, em seguida, são submetidos ao envelopamento por membranas do complexo de Golgi ou em endossomas, produzindo partículas virais infecciosas no interior dessas vesículas celulares, com glicoproteínas virais específicas na superfície dos seus envelopes. Estas vesículas citoplasmáticas transportam as partículas virais até a superfície celular, onde se fundem com a membrana plasmática da célula hospedeira liberando os vírus da célula (Figura 1.5) (Johnson e Baines, 2011).

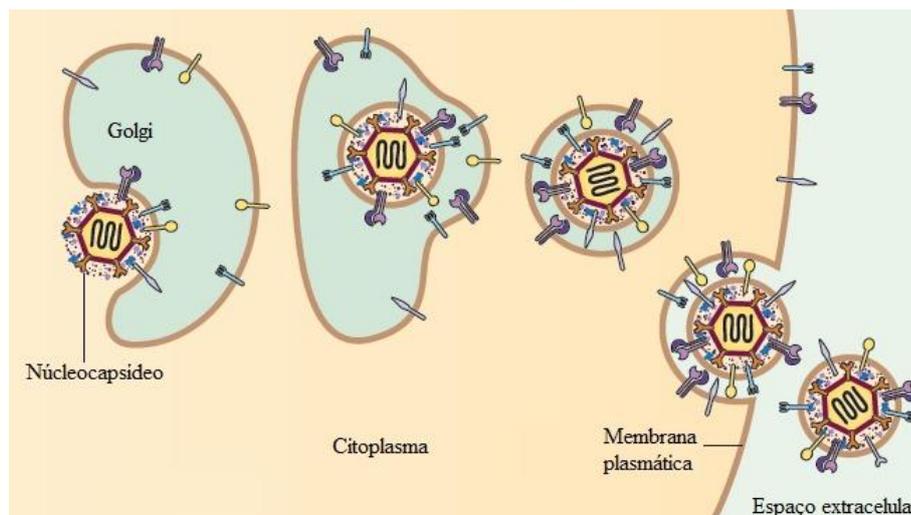


Figura 1.5. Envelopamento e liberação das partículas virais. No citoplasma da célula hospedeira, os núcleocapsídeos são submetidos ao envelopamento por membranas citoplasmáticas e, posteriormente, estas partículas virais infecciosas são secretadas desta célula hospedeira. Fonte: (Johnson e Baines, 2011) (modificado)

1.4. Latência celular dos herpesvírus

A latência celular caracteriza-se por (i) presença do genoma viral no núcleo da célula infectada, geralmente como um episoma, (ii) ausência de replicação viral significativa [medido por métodos clássicos, como ensaio de placa, e métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR)], e (iii) mínima expressão de genes virais (Virgin e Speck, 1999; White, Suzanne Beard e Barton, 2012).

Esta é diferente de latência clínica (ou do organismo), que é o período entre a infecção e a doença, e durante o qual uma intensa replicação lítica pode estar ocorrendo a um nível celular. Os herpesvírus possuem a propriedade biológica de realizar latência celular como um mecanismo para persistirem no organismo de seus hospedeiros ao longo de suas vidas, a fim de garantir a transmissão à novos hospedeiros (Pellet e Roizman, 2013).

Os herpesvírus pertencentes à subfamília *Alphaherpesvirinae* tem como principais sítios de latência celular os neurônios, mas também tem como alvo para infecção primária o epitélio, que é essencial para a transmissão eficiente através da pele ou mucosa e

estabelecimento desta latência. Já os herpesvírus pertencentes às outras subfamílias *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae* preferem vários subconjuntos de leucócitos como sítios de latência celular, mas a maioria deles também podem infectar as células epiteliais como alvo primário (Tabela 1.2). Esse tropismo celular é determinado pela presença de receptores de superfície celular, bem como pelas condições intracelulares favoráveis para a atividade viral (Grinde, 2013).

Tabela 1.2. Sítios de infecção dos herpesvírus humanos. Fonte: (Grinde, 2013; Yamanishi, Mori e Pellett, 2013) (modificado)

Designação/ Abreviatura	Subfamília	Sítios de infecção primária	Principais sítios de latência celular
Vírus herpes simples 1 (HSV-1/HHV-1)	α	Mucoepitelial	Gânglios nervosos e sensoriais
Vírus herpes simples 2 (HSV-2/HHV-2)	α	Mucoepitelial	Gânglios nervosos e sensoriais
Vírus varicella-zoster (VZV/HHV-3)	α	Mucoepitelial	Gânglios nervosos e sensoriais
Vírus Epstein-Barr (EBV/HHV-4)	γ	Linfócito B; Epitélio	Linfócito B de memória
Citomegalovírus humano (HCMV/HHV-5)	β	Monócitos; Linfócitos; Epitélio	Monócitos; Linfócitos
Herpesvírus humano 6A (HHV-6A)	β	Linfócito T; Epitélio	Leucócitos
Herpesvírus humano 6B (HHV-6B)	β	Linfócito T; Epitélio	Leucócitos
Herpesvírus humano 7 (HHV-7)	β	Linfócito T; Epitélio	Linfócito T; Epitélio
Vírus associado ao sarcoma de Kaposi (HHV-8)	γ	Provavelmente linfócitos e epitélios	Linfócito B

Para ocorrer a latência celular, como exemplo no que ocorre nos vírus herpes simples, após infecção primária e replicação ativa, geralmente nas mucosas, ocorre posterior infecção das terminações nervosas deste tecido, e o vírus, então, é transportado para os corpos das células nervosas, através de fluxo axonal retrógrado, resultando muito frequentemente em uma infecção latente nestes neurônios (Figura 1.6) (Knipe e Cliffe, 2008).

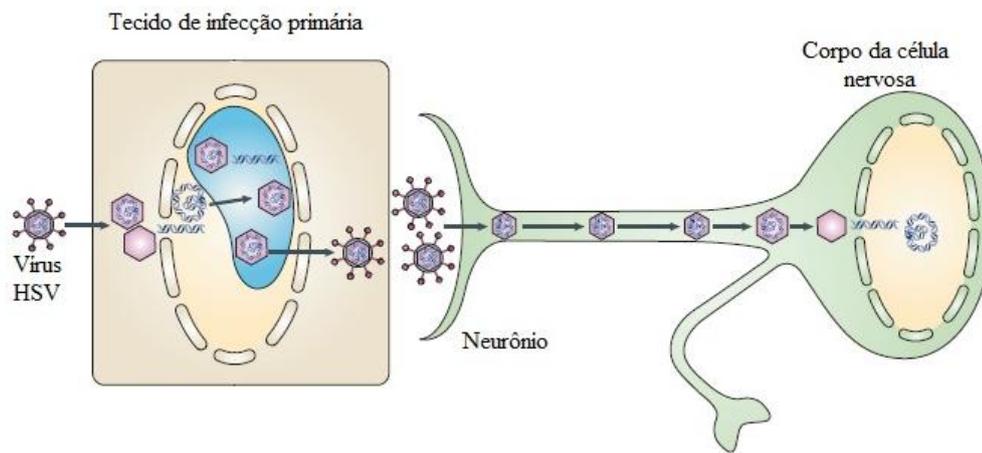


Figura 1.6. Estabelecimento da latência celular do HSV. O sítio primário de infecção ocorre nas células epiteliais, com infecção produtiva, resultando na produção de vírus, os quais podem infectar as células epiteliais vizinhas. Além disso, estes vírus também podem infectar os neurônios sensoriais, onde os núcleocapsídeos são levados, por transporte retrógrado, através de axônios, até o corpo da célula nervosa, sítios secundários da infecção e local de latência celular. Fonte: (Knipe e Cliffe, 2008) (modificado)

Após a infecção no sítio de latência, a fim de estabelecê-la, o genoma viral é circularizado no núcleo da célula hospedeira para formar um elemento de DNA episomal embalado em histonas (Deshmane e Fraser, 1989; Grinde, 2013), e um pequeno conjunto de genes virais são expressos, os genes de latência celular (Pellet e Roizman, 2013).

O EBV, por exemplo, apresenta três diferentes conjuntos de genes de latência celular, cada um codificando um conjunto limitado e distinto de proteínas e RNAs virais (Calderwood *et al.*, 2007; Klein, Kis e Klein, 2007; Grinde, 2013). Sendo assim, após a infecção de uma célula B em repouso, o vírus ativa os genes de latência III. As proteínas resultantes induzem a célula B a proliferar. Posteriormente, o vírus bloqueia esses genes, ativando, então, os genes de latência II e I, sendo que em latência I, apenas uma proteína, a EBNA-1, e alguns RNAs não codificadores são expressos. Esta proteína liga-se a uma origem de replicação do genoma viral que é essencial para garantir a síntese do DNA viral por DNA polimerases celulares juntamente com os cromossomas quando a célula do hospedeiro se divide, o que contrasta com a replicação lítica em que a DNA polimerase viral está envolvida. Mesmo sendo mais seguro manter a produção de proteínas virais a um mínimo durante a latência, a fim de evitar a ação do sistema imune, ao mesmo tempo é importante para o vírus a ativação desses genes de latência, com o objetivo de manter a presença deste no hospedeiro, já que algumas das células infectadas irão morrer ao longo do tempo (Grinde, 2013).

Durante décadas pensava-se que o vírus estivesse em um estado de dormência durante a latência celular. Entretanto, a utilização de métodos sensíveis indica que os membros de todas as três subfamílias de herpesvírus produzem partículas virais infecciosas em superfícies de mucosas e de epitélio quase continuamente em indivíduos aparentemente saudáveis (Ling

et al., 2003; Hadinoto *et al.*, 2009; Tronstein *et al.*, 2011; White, Suzanne Beard e Barton, 2012). Assim, a infecção latente tem um componente de reativação, durante o qual uma fração do conjunto de células latentes infectadas ativa a replicação produtiva com alta frequência. Com isso, apesar da ausência de doença clínica visível, a latência celular dos herpesvírus é um período de interação contínua entre o vírus e o hospedeiro, o que resulta na produção de um grande conjunto de células T altamente funcional CD4 + e CD8 +, que é mantida durante a vida deste (White, Suzanne Beard e Barton, 2012).

Com isso, genomas latentes possuem a capacidade de reativar, onde a transcrição é deslocada para síntese de produtos líticos, resultando na produção de novas partículas infecciosas. Entretanto, essa reativação da latência celular pode resultar em doença, devido a combinação dos danos celulares e teciduais causados diretamente pela elevada replicação lítica do vírus, além das respostas imunológicas à replicação lítica reativada (Grinde, 2013; Pellet e Roizman, 2013).

Essa reativação geralmente ocorre por diversos estímulos como estresse, variações hormonais, exposição à luz ultravioleta e imunossupressão (Perng e Jones, 2010).

Na reativação, como exemplo no que ocorre nos vírus herpes simples, após a expressão dos genes líticos, as novas partículas virais sintetizadas retornam pelos axônios, por fluxo axonal anterógrado, produzindo um novo ciclo de infecção produtiva no sítio da infecção inicial ou próximo deste sítio, podendo resultar no reaparecimento da doença e transmissão do vírus à novos hospedeiros (Figura 1.7) (Knipe e Cliffe, 2008).

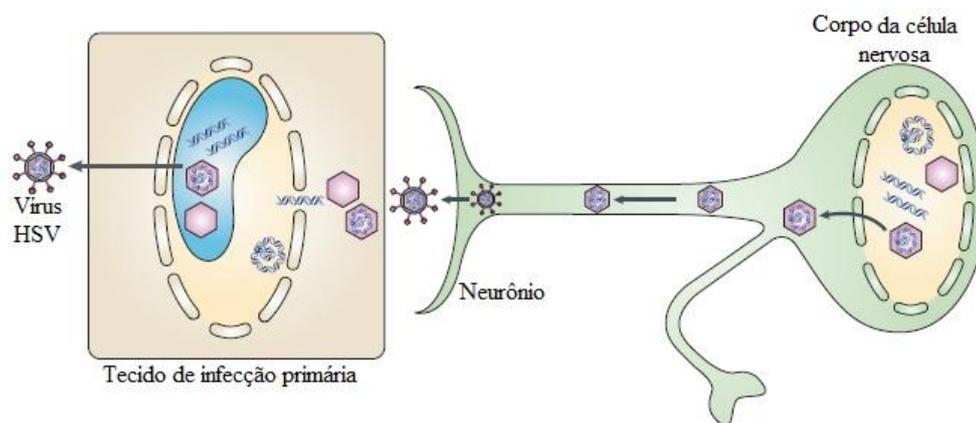


Figura 1.7. Reativação do HSV. Após a reativação, a expressão do gene lítico viral é iniciada, e as partículas virais recém-formadas são conduzidas, por transporte anterógrado, até às células epiteliais, ou próximo deste sítio, onde novamente há infecção produtiva, podendo resultar em infecções recorrentes e disseminação do vírus. Fonte: (Knipe e Cliffe, 2008) (modificado)

A reativação é arriscada para o vírus, pois uma replicação ativa tende a induzir vários mecanismos do hospedeiro, que envolve tanto o sistema imunológico quanto o de sinalização interna da célula, o que leva à morte da célula infectada. Sendo assim, para cada genoma viral que produz com sucesso a progênie infecciosa, vários provavelmente iniciaram este processo, mas não tiveram êxito (Grinde, 2013).

1.5. Patologias causadas pelos herpesvírus humanos

A infecção pelos vírus da família *Herpesviridae* que infectam humanos é conceituada em três fases distintas correspondentes ao curso clínico da maioria dos pacientes: primo-infecção, latência celular e reativação. A primo-infecção, na maioria dos herpesvírus humanos, ocorre nos primeiros anos de vida, e se apresenta assintomática ou associada a alguns sintomas leves. Esta fase é seguida por um período prolongado de latência celular, durante o qual não há manifestação da doença. E, posteriormente, poderão ocorrer recidivas, principalmente em hospedeiros imunocomprometidos, podendo ocasionar alta morbidade e mortalidade nestes indivíduos (Ganem, 2007; Mocarski, Shenk e Pass, 2007; Rickinson e Kieff, 2007; Roizman, Knipe e Whitley, 2007; White, Suzanne Beard e Barton, 2012). Entretanto, embora a maioria dos adultos possuam diferentes herpesvírus humanos, a doença grave atribuível à infecção por estes vírus é rara em indivíduos imunocompetentes (White, Suzanne Beard e Barton, 2012).

Além disso, estes herpesvírus são diferentes em termos de suas propriedades biológicas e patogênese, podendo ocasionar diversas doenças diferentes (Arvin *et al.*, 2007; Sedý, Spear e Ware, 2008), como evidenciado na tabela 1.3 .

Tabela 1.3. Principais doenças associadas aos herpesvírus humanos. Fonte: (Sedý, Spear e Ware, 2008) (modificado)

Designação/Abreviatura	Subfamília	Doenças
Vírus herpes simples 1 (HSV-1/HHV-1)	α	Lesões mucocutâneas (orofacial, genital, outras), ceratites e encefalites
Vírus herpes simples 2 (HSV-2/HHV-2)	α	Lesões mucocutâneas (orofacial, genital, outras), encefalites e meningites
Vírus varicella-zoster (VZV/HHV-3)	α	Catapora (varicela) e herpes zoster
Vírus Epstein-Barr (EBV/HHV-4)	γ	Mononucleose infecciosa; cofator em diversas malignidades (linfoma de Burkitt, linfoma associado a SIDA*, linfoma de Hodgkin, carcinoma da nasofaringe)
Citomegalovírus humano (HCMV/HHV-5)	β	Doenças associadas a pacientes transplantados e com SIDA*, e infecções intrauterina, que causa retardo mental e perda auditiva
Herpesvírus humano 6A (HHV-6A)	β	Roséola
Herpesvírus humano 6B (HHV-6B)	β	Roséola
Herpesvírus humano 7 (HHV-7)	β	Roséola
Vírus associado ao sarcoma de Kaposi (HHV-8)	γ	Sarcoma de Kaposi, linfoma de efusão primária e a doença de Castleman

*SIDA (Síndrome da imunodeficiência adquirida/AIDS)

1.5.1. *Vírus herpes simples 1 e 2*

Embora a comunidade científica tenha reconhecido o vírus herpes simples (HSV) como agente infeccioso no fim do século 19, este somente foi isolado pela primeira vez em 1919 por Lowenstein (Roizman, Knipe e Whitley, 2013).

A transmissão do HSV ocorre, principalmente, quando a mucosa ou pele com algum tipo de abrasão entra em contato direto com secreções que contenham o vírus (Whitley, 2002; Brady e Bernstein, 2004; Penello *et al.*, 2010; Barnabas e Celum, 2012).

Essas secreções contendo partículas virais são: líquido das lesões mucocutâneas (via mais comum), saliva, secreções respiratórias e secreções genitais. Com isso, o HSV é transmitido pela transmissão sexual (inclusive orogenital), transmissão vertical, pelo contato

próximo interpessoal e, além disso, também pode haver ainda a autoinoculação, infectando outras regiões do próprio corpo (Chayavichitsilp *et al.*, 2009; Penello *et al.*, 2010; Grinde, 2013; Kaspersen e Höllsberg, 2013).

Com relação à transmissão vertical, pode ocorrer através de diferentes maneiras. A primeira via de infecção é a infecção no útero, no entanto esta é rara. E a segunda via de infecção é o contato do feto com secreções genitais maternas contaminadas com o HSV durante o parto (Penello *et al.*, 2010).

Além disso, é importante destacar, que mesmo o contato com lesões mucocutâneas sendo a via mais comum de transmissão do HSV, a transmissão deste vírus também pode ocorrer através do indivíduo assintomático (transmissão silenciosa) (Penello *et al.*, 2010), contribuindo para a alta prevalência de HSV em todo o mundo (Schiffer e Corey, 2013).

A primo-infecção herpética é, normalmente, assintomática ou manifesta-se por meio de sintomatologia inespecífica, não sendo suficiente para uma plena caracterização do quadro (Lupi e Pereira Jr, 2000; Penello *et al.*, 2010). No entanto, a infecção primária pode causar também úlcera acompanhada de sintomas sistêmicos (Barnabas e Celum, 2012).

O HSV-1 está principalmente associada com as vesículas nos lábios, ocasionando o herpes labial (Figura 1.8). Já o HSV-2 está associado a vesículas genitais, ocasionando o herpes genital. No entanto, ambos os vírus podem causar lesões em ambos os sítios de infecção (Grinde, 2013).



Figura 1.8. Herpes labial. A seta indica o sítio de infecção causada por HSV no herpes labial, evidenciando as vesículas mucocutâneas, que são manifestações clínicas desta doença. Fonte: es.paperblog.com/herpes-labial-715282/

Após essa infecção inicial, o vírus pode estabelecer latência celular nos gânglios sensoriais e, assim, posteriormente podem ocorrer recidivas pelo HSV. Essas reativações manifestam-se, quase sempre, no mesmo sítio de infecção inicial, com sintomas mais discretos, e, além disso, as lesões tendem a ser em menor número (Penello *et al.*, 2010). Ao longo do tempo, esses episódios tendem a diminuir em frequência (0-10 vezes por ano) e gravidade (Schiffer e Corey, 2013).

As infecções primárias e recorrentes são geralmente autolimitadas em indivíduos imunocompetentes. Entretanto, são nos indivíduos imunocomprometidos, como portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), que há um risco aumentado de grave doença herpética, nos quais o HSV causa significativa morbidade e mortalidade (Fisman *et al.*, 2002; Roizman, Knipe e Whitley, 2007; Knipe e Cliffe, 2008).

Essas complicações incluem meningite, hepatite, pneumonia, encefalite, com graves sequelas neurológicas para os sobreviventes, e herpes simples visceral, que são mais comuns nos pacientes com SIDA, onde os órgãos mais acometidos são pulmão, esôfago, fígado e glândulas adrenais (Penello *et al.*, 2010).

Além dos indivíduos portadores do HIV, os pacientes de transplante de órgãos, de quimioterapia e recém-nascidos podem desenvolver uma infecção disseminada com risco de vida (Penello *et al.*, 2010; Schiffer e Corey, 2013).

1.5.2. Vírus varicella-zoster

O vírus varicella-zoster (VZV) foi isolado pela primeira vez em 1953 por Thomas Weller a partir de casos de varicela (ou catapora) e herpes zoster, fornecendo evidências sugestivas de que o mesmo vírus é responsável por ambas as doenças (Arvin e Gilden, 2013).

O VZV está presente nos fluídos das vesículas cutâneas e nas secreções respiratórias. A partir disto, este vírus é transmitido através do contato direto com as lesões de pele ou por meio da inalação das partículas virais infecciosas suspensas no ar (Papaloukas, Giannouli e Papaevangelou, 2014; Zerboni *et al.*, 2014).

Com relação à infecção causada por VZV, a infecção primária se manifesta como varicela (ou catapora), doença altamente contagiosa em crianças e caracterizada por erupções vesiculares pruriginosas distribuídas pelo corpo do indivíduo (Figura 1.9A) (Hambleton e Gershon, 2005; Papaloukas, Giannouli e Papaevangelou, 2014).

Após a primo-infecção, poderá ocorrer infecção latente nos neurônios do gânglio sensorial ao longo da vida do hospedeiro. Posteriormente, pode ocorrer a reativação da infecção latente ocasionando o herpes zoster (ou cobreiro) (Hambleton e Gershon, 2005; Papaloukas, Giannouli e Papaevangelou, 2014), que se caracteriza por erupção cutânea com formação de bolhas, com distribuição no dermatomo (Figura 1.9B), sendo os dermatomos torácico e lombares os mais afetados. Além disso, esta doença é mais comum em adultos do que em crianças (Arvin, 1996; Papaloukas, Giannouli e Papaevangelou, 2014).



Figura 1.9. Doenças causadas por VZV. Em A, criança acometida por varicela, caracterizada por erupções vesiculares pruriginosas no tronco e face. Em B, idoso acometido por herpes zoster, evidenciando a típica erupção cutânea com formação de bolhas, e com distribuição no dermatômo. Fonte: www.paramim.com.pt/saude-e-bem-estar/saude-filhos/artigo/crianca-com-varicela e www.mdsaude.com/2011/04/herpes-zoster.html

Ademais, embora a varicela seja uma doença geralmente benigna, as complicações desta doença, assim como as complicações do herpes zoster, ocorrem com mais frequência em pessoas imunocomprometidas e envolvem principalmente infecções bacterianas secundárias na pele por estreptococos e estafilococos, e envolvimento do sistema nervoso central, incluindo encefalite viral, cerebelite pós-infecciosa e meningoencefalite (Arvin, 1996; Heraud *et al.*, 2005; Papaloukas, Giannouli e Papaevangelou, 2014).

1.5.3. Vírus Epstein-Barr

O vírus Epstein-Barr (EBV) foi descoberto em 1964 por Michael Epstein e Yvonne Barr usando microscopia eletrônica para detectar partículas virais em cultura de células de linfoma de Burkitt (Longnecker, Kieff e Cohen, 2013).

O EBV é transmitido através da saliva com alto título viral, principalmente durante a puberdade, mas também pode ser transmitido através de secreções genitais e por transmissão vertical, por estar presente nas células do colo do útero (Thomas *et al.*, 2006; Pagano, 2007; Grywalska *et al.*, 2013; Kaspersen e Höllsberg, 2013).

Além disso, a transmissão por transfusão sanguínea também foi documentada (Barin, 2000; Grywalska *et al.*, 2013), porém, mesmo sendo frequente a detecção deste vírus em doadores de sangue (infecção latente), a transmissão de EBV por transfusão é pouco frequente. Isto pode ser explicado pelo fato de que a maioria das pessoas (adultos) que realizam a transfusão já são imunes ao vírus. Além disso, o sangue dos doadores EBV soropositivos contém anticorpos neutralizantes e células de memória específicas, que podem proteger o destinatário da infecção (Grywalska *et al.*, 2013).

A infecção primária pelo EBV é normalmente assintomática quando adquirida na infância (Hsu e Glaser, 2000; Dowd *et al.*, 2013). No entanto, até 50% das pessoas que

adquirem a primo-infecção tarde da infância ou na adolescência pode contrair mononucleose infecciosa, conhecida como doença do beijo com base em uma rota típica de transmissão (saliva) e caracterizada com a tríade: febre, faringite e aumento dos linfonodos cervicais. Entretanto esta doença é autolimitada (Cohen *et al.*, 2011; Dowd *et al.*, 2013; Grinde, 2013; Grywalska *et al.*, 2013; Kaspersen e Höllsberg, 2013).

Após a infecção primária, os indivíduos podem permanecer portadores do EBV por toda a vida, com infecção latente deste vírus nas células B de memória do hospedeiro (Murray e Young, 2002; Grywalska *et al.*, 2013). No entanto, em alguns indivíduos, como documentado em imunocomprometidos, pode ocorrer a prolongada proliferação de linfócitos B infectados por EBV e sua transformação maligna (Filipovich *et al.*, 1992; Capello *et al.*, 2009; Chen, 2011; Grywalska *et al.*, 2013). Mesmo que outros fatores sejam muito importantes para que isso ocorra, como a falha no reconhecimento imunológico específico, o EBV é essencial para a tumorigênese (Thompson e Kurzrock, 2004; Grywalska *et al.*, 2013).

O vírus Epstein-Barr foi o primeiro vírus humano associado à carcinogênese e desde a sua descoberta, este foi encontrado em uma variedade de tumores, como linfoma de Burkitt (neoplasia de células B), linfoma de células T/NK, carcinoma da nasofaringe, linfoma de Hodgkin (neoplasia de linfonodos), tumores de células epiteliais, carcinoma gástrico e carcinoma de mama (Epstein, Achong e Barr, 1964; Henle, Henle e Diehl, 1968; Henle *et al.*, 1970; Dowd *et al.*, 2013; Grinde, 2013; Grywalska *et al.*, 2013; Hildesheim, 2013).

1.5.4. Citomegalovírus humano

O citomegalovírus humano (HCMV) foi isolado na década de 1950 individualmente por Smith, Weller (mesmo pesquisador que isolou pela primeira vez o VZV) e Rowe, porém foi precisamente Margaret Smith que, em 1955, o isolou pela primeira vez em culturas celulares (Mocarski Junior *et al.*, 2013).

O HCMV é transmitido através da saliva, sangue, secreções genitais, urina e leite materno (Swanson e Schleiss, 2013). Além disso, este vírus pode ser transmitido por transfusão sanguínea para indivíduos soronegativos (Ziemann e Hennig, 2014).

A transmissão sexual do HCMV é rara, porém o sêmen pode conter partículas virais infecciosas com o potencial de iniciar uma infecção primária (Kaspersen e Höllsberg, 2013). Já a via de transmissão vertical pode ocorrer na gravidez ou logo após a exposição do HCMV ao recém-nascido pelas secreções cervicais durante o parto vaginal, e também através da ingestão de leite materno contendo partículas infecciosas deste vírus (Schleiss, 2006; Swanson e Schleiss, 2013), sendo que a principal via de transmissão deste às grávidas é o

contato direto com crianças, especialmente os seus próprios filhos (Fowler e Pass, 2006; Almeida *et al.*, 2010).

A infecção primária por citomegalovírus humano se apresenta mais comumente como uma doença assintomática ou como uma síndrome semelhante à mononucleose infecciosa, porém benigna e autolimitada (Serna-Higuera *et al.*, 1999; Wreghitt *et al.*, 2003; Tzavella *et al.*, 2007; Bruminhent e Razonable, 2014; Chan *et al.*, 2014; Ziemann e Hennig, 2014).

Após a primo-infecção, o HCMV pode estabelecer latência celular em monócitos e linfócitos, permanecendo no hospedeiro durante sua vida, podendo ser reativado (Mocarski Junior *et al.*, 2013).

No entanto, são nos indivíduos imunocomprometidos, como os pacientes transplantados ou com SIDA, assim como em crianças infectadas congenitamente, que este vírus causa doença clínica significativa, e, ocasionalmente, pode levar à morte se não tratada (Razonable e Paya, 2003; Razonable, Emery e Forum, 2004; Kaspersen e Höllsberg, 2013; Landais e Nelson, 2013; Bruminhent e Razonable, 2014).

No que se refere à infecção congênita, crianças com sintomas da doença no momento do nascimento possuem alto risco de obter graves sequelas a longo prazo, como retardo do crescimento, retardo mental, microcefalia, coriorretinite, comprometimento neurológico, distúrbios convulsivos, perda auditiva neurosensorial, perda de visão, epilepsia, paralisia cerebral, calcificações intracranianas, esplenomegalia e/ou hepatomegalia, icterícia, anemia hemolítica, pneumonia, entre outras. Já as crianças assintomáticas ao nascimento, poderão desenvolver sequelas importantes durante os primeiros anos de vida, como alterações no desenvolvimento psico-motor e surdez (Revello e Gerna, 2002; Almeida *et al.*, 2010; Kaspersen e Höllsberg, 2013; Swanson e Schleiss, 2013).

1.5.5. Herpesvírus humano 6A, 6B e 7

O herpesvírus humano 6 (HHV-6) foi descoberto em 1986 por Zaki Salahuddin em cultura de linfócitos de indivíduos com desordens linfoproliferativas (Salahuddin *et al.*, 1986; Blauvelt, 2001) e o herpesvírus humano 7 (HHV-7) foi descoberto em 1990 por Niza Frenkel em indivíduo aparentemente saudável (Frenkel *et al.*, 1990; Blauvelt, 2001). No entanto, em 1991, duas variantes de HHV-6 foram diferenciadas uma da outra, originando o HHV-6A e HHV-6B (Schirmer *et al.*, 1991; Blauvelt, 2001). Entretanto só foram reconhecidas como duas espécies distintas pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus em 2012, devido ao aumento das evidências virológicas e epidemiológicas para apoiar esta distinção (Flamand *et al.*, 2010; Le, Gantt e Practice, 2013).

Os herpesvírus humanos 6 e 7 são transmitidos principalmente através da saliva e de secreções respiratórias, mas também podem ser transmitidos por secreções genitais e transplante (Blauvelt, 2001; Kaspersen e Höllsberg, 2013).

A primo-infecção por HHV-6 e HHV-7 normalmente ocorre nos primeiros anos de vida (Blauvelt, 2001). Mais comumente, o HHV-6 infecta crianças entre as idades de 3 e 6 meses, quando a proteção dos anticorpos maternos diminui (Okuno *et al.*, 1989; Blauvelt, 2001). Já a idade de infecção inicial pelo o HHV-7 é mais tardia, sendo a faixa etária mais comum para essa infecção entre 18 meses a 3 anos de idade (Wyatt *et al.*, 1991; Blauvelt, 2001).

Estas infecções primárias causadas pelos HHV-6 e HHV-7 podem variar de assintomáticas para doenças febris autolimitadas, incluindo exantema súbito (roséola), doença clássica da primeira infância caracterizada por máculas eritematosas ou pápulas levemente elevadas, que começa geralmente no tronco, mas se espalha para os membros superiores e inferiores (Blauvelt, 2001; Magalhães *et al.*, 2011; Grinde, 2013; Kaspersen e Höllsberg, 2013) (Figura 1.10). Após a primo-infecção estes vírus podem estabelecer latência celular em diferentes células, como linfócitos T e células epiteliais (Yamanishi, Mori e Pellett, 2013).



Figura 1.10. Roséola *infantum*. Criança com máculas eritematosas no tronco e membros superiores, que é uma manifestação clínica característica desta doença. Fonte: www.kids-center.org/thread/Roseola-Infantum.html

Embora o exantema súbito esteja bem caracterizado, notou-se que esta é frequentemente diagnosticada como sarampo, rubéola ou infecção pelo vírus dengue (Tait *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 2003; Magalhães *et al.*, 2011). Assim, a infecção primária do HHV-6 e HHV-7 devem ser incluídas no diagnóstico de doenças acometidas em jovens crianças (Magalhães *et al.*, 2011).

Com relação à reativação destes vírus, ocorre principalmente em indivíduos imunocomprometidos e pode levar à infecção generalizada em vários órgãos nestes hospedeiros, como encefalite, pneumonite e hepatite, que são os mais comumente relatados (Cone *et al.*, 1993; Drobyski *et al.*, 1993; Knox e Carrigan, 1994; Blauvelt, 2001).

1.5.6. *Herpesvírus humano 8*

O herpesvírus humano 8 (HHV-8) foi identificado por Yuan Chang, em 1994, em tecidos de sarcoma de Kaposi de indivíduos com AIDS/SIDA (Chang *et al.*, 1994; Damania e Cesarman, 2013).

O HHV-8 é transmitido, principalmente, através da saliva, mas também pode ser transmitido através de secreções genitais, por transfusão de sangue e por transplante de órgãos (Uldrick e Whitby, 2011; Kaspersen e Höllsberg, 2013; Le, Gantt e Practice, 2013). Além disso, este vírus foi detectado dentro da mucosa gastrointestinal de indivíduos HIV reagentes, sugerindo uma possível base para transmissão fecal-oral de HHV-8 (Thomas *et al.*, 1996; Blauvelt, 2001).

A primo-infecção causada por HHV-8 ocorre com frequência durante a primeira infância nas zonas de alta prevalência, em contraste com áreas de baixa prevalência, onde a soropositividade das crianças é extremamente raro (Blauvelt *et al.*, 1997; Mayama *et al.*, 1998; Le, Gantt e Practice, 2013). Além disso, a primeira infecção vem sendo descrita, quando sintomática, como tendo uma síndrome semelhante à mononucleose infecciosa (Blauvelt, 2001).

Após esta infecção, este vírus pode estabelecer latência celular em seu hospedeiro, principalmente em linfócitos B, podendo ser reativado (Damania e Cesarman, 2013).

No entanto, o risco de graves doenças relacionadas ao HHV-8 é muito maior em indivíduos imunocomprometidos, como pacientes com imunossupressão farmacológica ou com infecção pelo HIV, provavelmente devido ao deficiente controle da replicação deste vírus (Ganem, 2010; Gantt e Casper, 2011; Le, Gantt e Practice, 2013).

Essas graves doenças são distúrbios neoplásicos como o sarcoma de Kaposi, bem como, porém muito menos comumente, o linfoma de efusão primário e a doença de Castleman multicêntrica (Lebbé, Legendre e Francès, 2008; Mesri, Cesarman e Boshoff, 2010; Ariza-Heredia e Razonable, 2011; Pietrosi *et al.*, 2011; Le, Gantt e Practice, 2013). Entretanto, estas doenças são raras em indivíduos aparentemente saudáveis (Kaspersen e Höllsberg, 2013).

Com relação ao sarcoma de Kaposi, é caracterizada normalmente, por lesões cutâneas disseminadas e pigmentadas, envolvendo grandes áreas da superfície do corpo, às vezes de forma simétrica, com uma aparência característica que varia do rosa ao roxo ou marrom e muitas vezes associada com envolvimento visceral (Martellotta *et al.*, 2009; La Ferla *et al.*, 2013) (Figura 1.11).



Figura 1.11. Sarcoma de Kaposi. Paciente com SIDA (AIDS) com manifestação clínica característica desta doença, que são as lesões cutâneas disseminadas e pigmentadas, com uma aparência característica marrom. Fonte: www.avert.org/images/5474-kaposis-sarcoma

1.6. Vacinação contra infecções causadas por herpesvírus humanos

Com relação às vacinas para herpesvírus humanos, atualmente estão sendo desenvolvidas vacinas contra HSV-1, HSV-2, HCMV e EBV, sendo que estas possuem eficácia variável na prevenção de doenças (Dasgupta *et al.*, 2009; Schiller e Lowy, 2010; Sung e Schleiss, 2010; White, Suzanne Beard e Barton, 2012). Isto está ocorrendo devido aos grandes avanços em imunologia celular e molecular, que têm proporcionado uma base sólida para novas estratégias de vacinas (Chentoufi, Kritzer, *et al.*, 2012).

Entretanto, existe a prevenção, através da vacinação, de doenças causadas pelo vírus varicella-zoster. Comercializado como Varivax e Zostavax, estas contêm uma estirpe viva atenuada de VZV. A Varivax é altamente eficaz na prevenção da varicela (catapora) quando administrado em crianças, mas a imunidade diminui conforme os anos e reforços periódicos podem ser necessários durante a vida adulta. Em uma dose maior, a mesma estirpe de vacina atenuada, a Zostavax proporciona uma proteção significativa de VZV em reativações de herpes zoster (HZ) (Marin, Zhang e Seward, 2011; White, Suzanne Beard e Barton, 2012).

Com relação à vacina contra a varicela (Varivax), foi desenvolvida pela primeira vez no Japão em 1974 (Takahashi *et al.*, 1985; Papaloukas, Giannouli e Papaevangelou, 2014). Entretanto, somente em 1989, a vacina foi introduzida pela primeira vez em crianças aparentemente saudáveis no Japão e na Coreia do Sul e, em 1995, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou a vacina para crianças com idade inferior a 12 meses com uma história de varicela negativa e, a partir disto, a vacina foi implementada nos EUA (Hambleton e Gershon, 2005; Papaloukas, Giannouli e Papaevangelou, 2014).

Somente após a aprovação da *World Health Organization* (WHO), em 1998 (Who, 1998; Papaloukas, Giannouli e Papaevangelou, 2014), a vacina contra varicela (Varivax) foi implementada por mais alguns países, incluindo Austrália, Canadá, Alemanha, Grécia, Qatar, República da Coreia, Arábia Saudita, Taiwan, Uruguai e partes da Itália (Sicília) e da Espanha

(Comunidade Autónoma de Madrid) (Bonanni *et al.*, 2009; Papaloukas, Giannouli e Papaevangelou, 2014).

No Brasil, o Ministério da Saúde, por meio do Programa Nacional de Imunização (PNI), passou a oferecer, a partir do mês de setembro de 2013, em toda a rede pública de saúde a vacina contra varicela (Varivax) incluída na tetraviral, que também protege contra sarampo, caxumba e rubéola. Esta nova vacina compõe o Calendário Nacional de Vacinação e é oferecida exclusivamente para crianças de 15 meses de idade que já tenham recebido a primeira dose da vacina tríplice viral (sarampo, caxumba e rubéola) (Figura 1.12). Com a inclusão da vacina, o Ministério da Saúde estima uma redução de 80% das hospitalizações por catapora (Ministério Da Saúde, B., 2014).



CALENDÁRIO DE VACINAÇÃO DA CRIANÇA			
IDADE	VACINAS	DOSES	DOENÇAS EVITADAS
15 meses	Tríplice Bacteriana (DTP) (vacina adsorvida inativada)	1º reforço	Difteria, Tétano e Coqueluche
	Vacina Meningocócica C (vacina conjugada)	Reforço	Doença invasiva causada por <i>Neisseria meningitidis</i> do grupo C
	Vacina Oral Poliomielite (VOP) (vacina atenuada de Poliomielite 1,2,3)	1º reforço	Poliomielite ou Paralisia Infantil
	Tetraviral (vacina atenuada)	Dose única	Sarampo, Rubéola, Caxumba e Varicela

Figura 1.12. Calendário de vacinação da criança. É evidenciada, no calendário de vacinação da criança do município do Rio de Janeiro/RJ, a vacina tetraviral, que protege contra Sarampo, Rubéola, Caxumba e Varicela, e que é oferecida exclusivamente como dose única para crianças de 15 meses de idade. Fonte: (Prefeitura Do Rio De Janeiro, 2014) (modificado).

Entretanto, a implantação da vacina da varicela alterou a ecologia natural de circulação do VZV, fazendo com que a infecção natural do tipo selvagem diminuísse. Isso pode colocar as crianças não vacinadas no aumento do risco de infecção grave por este vírus, uma vez que poderia atrasar a sua primeira exposição até a idade adulta. Além disso, mesmo os vacinados estão em maior risco de doença moderada a grave por VZV se caso expor ao VZV selvagem mais tarde na vida, devido a diminuição da imunidade induzida pela vacina (Chaves *et al.*, 2007; White, Suzanne Beard e Barton, 2012). Estas e outras questões são citadas como justificativa para as políticas europeias atuais administrarem a Varivax apenas

para pacientes de alto risco, em vez de universal (Sengupta *et al.*, 2008; White, Suzanne Beard e Barton, 2012).

1.7. Tratamento das infecções causadas por herpesvírus humanos

As doenças causadas por herpesvírus humanos são diversas e, como tal, a aplicação das diferentes drogas antivirais varia com a doença em causa, com o estado imunitário do paciente e com a tolerância deste ao medicamento, uma vez que, estes são geralmente tóxicos. Sendo assim, existem diferentes terapias antivirais que atuam especificamente na replicação dos HHV, sendo os mais comuns, o aciclovir, o valaciclovir, o ganciclovir e o foscarnet (Martinho, Oliveira e Silva, 2003).

O aciclovir (ACV) está dentre as drogas mais estudadas e utilizadas para o tratamento contra o HSV e, além disso, também é usado no tratamento de infecções causadas por VZV e EBV. O ACV penetra em todas as células humanas, infectadas ou não, sendo um inibidor seletivo da replicação desses vírus, e requer, no seu mecanismo de ação, a conversão para trifosfato de ACV (Coen, 1996; Kimberlin e Whitley, 1996; Carvalho, 1999; Penello *et al.*, 2010).

No entanto, cepas resistentes de HSV ao ACV vêm sendo descritas, principalmente em pacientes imunocomprometidos (Coen, 1996; Kimberlin e Whitley, 1996). Essa resistência esta associada com a mutação de duas enzimas virais envolvidas na ação do ACV, que são a timidina quinase (TK) e a DNA polimerase, sendo que em 95% dos casos está associada ao gene que codifica a TK (Morfin e Thouvenot, 2003). Além disso, geralmente, o HSV é resistente ao aciclovir e a outras drogas simultaneamente, como valaciclovir e famciclovir (Penello *et al.*, 2010).

O valaciclovir, utilizado no tratamento de HSV e VZV (Munksgaard, 2004), é o éster L-valina do aciclovir (pró-droga), que, após sua absorção, é rapidamente convertido em ACV pela enzima valaciclovir-hidrolase sintetizada no fígado (Penello *et al.*, 2010).

Já o ganciclovir, muito utilizado no tratamento da infecção congênita por HCMV, é um análogo de nucleosídeo acíclico sintético estruturalmente semelhante à guanina. A sua estrutura é semelhante à do aciclovir e, como este, requer a fosforilação para a atividade antiviral (Swanson e Schleiss, 2013). Este antiviral também pode ser usado contra infecções causadas por HHV-6, embora o HHV-6A e o HHV-6B demonstrem suscetibilidades diferentes (Yoshida *et al.*, 1998; Le, Gantt e Practice, 2013), sendo o HHV6-B suscetível ao ganciclovir enquanto o HHV6-A é mais resistente a este antiviral (Le, Gantt e Practice, 2013).

Além desses antivirais tem-se o foscarnet (ácido fosfonofórmico trissódico), um inibidor da DNA polimerase viral, que é mais recomendado quando o paciente não responde

ao tratamento por outros antivirais como o aciclovir, pois o foscarnet é mais tóxico (Morfin e Thouvenot, 2003).

Nenhuma destas terapias representa uma cura para a infecção latente dos herpesvírus humanos, uma vez que apenas atuam na fase ativa do vírus, inibindo a polimerase viral por introdução, no interior da célula, de um composto fosforilado análogo a um nucleósido, que se liga ao DNA viral em replicação, impedindo, então, a continuação desta. Sendo assim, estes antivirais não atuam na latência celular (Martinho, Oliveira e Silva, 2003).

Entretanto, esses medicamentos são capazes de diminuir o tempo da doença, prevenir sintomas e, além disso, podem reduzir o risco de transmissão (Penello *et al.*, 2010).

1.8. Epidemiologia das infecções causadas por herpesvírus humanos

Quase 100% dos seres humanos no momento em que chegam à adolescência estão infectados com múltiplos herpesvírus humanos, sendo estes responsáveis por 35-40 bilhões de infecções humanas em todo o mundo, tornando-os mais prevalentes entre os patógenos conhecidos (White, Suzanne Beard e Barton, 2012).

Com relação à epidemiologia das infecções causadas por HSV, a soroprevalência do HSV-1 na população adulta é de 50% a 90% e a do HSV-2 é de 20% a 60% (Cisneros-Herreros e Herrero-Romero, 2006).

Atualmente, o HSV-1 é o vírus mais comum encontrado em herpes genital (Beigi, 2012; Grinde, 2013) e mais de um bilhão de pessoas ao redor do mundo, um sexto da população mundial, possuem esta infecção (Chentoufi, Kritzer, *et al.*, 2012). Além disso, esta doença aumenta de duas a quatro vezes o risco de adquirir o HIV (Corey *et al.*, 2004; Danve-Szatanek *et al.*, 2004; Rubbo *et al.*, 2011; Chentoufi, Kritzer, *et al.*, 2012) e também aumenta, no final da gravidez, o risco de herpes neonatal (Chentoufi, Kritzer, *et al.*, 2012).

Dentre diversas doenças oportunistas em pacientes HIV reagentes, muitas são causadas por HSV. As infecções por esses vírus tornaram-se uma consideração importante para o tratamento clínico nos portadores do HIV, já que se estima que dois terços dos indivíduos com HIV-1 são co-infectados com HSV (Chentoufi, Dervillez, *et al.*, 2012). Além disso, estudos com mulheres grávidas HIV reagentes mostram que a co-infecção com HSV aumenta significativamente o risco de transmissão perinatal do HIV (Chen *et al.*, 2005; Anzivino *et al.*, 2009).

Ademais, a infecção ocular por HSV-1 é a principal causa de cegueira no mundo. Só nos EUA mais de 400 mil pessoas possuem uma história de recorrência ocular por HSV, que, por sua vez, exige consultas médicas, medicamentos e, em casos graves, transplantes de

córnea (Carr, Härle e Gebhardt, 2001; Osorio, Cohen e Ghiasi, 2004; Chentoufi, Kritzer, *et al.*, 2012).

Com relação à epidemiologia das infecções causadas por VZV, a soroprevalência em jovens adultos de 20-29 anos de idade é de 95% (Aebi *et al.*, 2001; Nardone *et al.*, 2007; Papaloukas, Giannouli e Papaevangelou, 2014).

A varicela, doença causada por este vírus, ocasiona 60 milhões de novos casos por ano em todo o mundo, acometendo principalmente crianças de até 12 anos de idade (Plotkin, Arbetter e Starr, 1985; Papaloukas, Giannouli e Papaevangelou, 2014). No entanto, ao longo dos últimos 50 anos, o aumento do uso de creches diminuiu a idade pico de incidência para 1-4 anos (Papaloukas, Giannouli e Papaevangelou, 2014).

Além disso, estudos utilizando métodos variados e realizados em diferentes populações nos Estados Unidos, Canadá, América do Sul, Europa, Ásia e Austrália, revelaram incidência de herpes zoster (reativação do VZV) com média de 4-4,5 por 1.000 pessoas/ano. Ademais, todos esses estudos mostram aumento dessa infecção com a idade, principalmente após os 50 anos (Yawn e Gildea, 2013).

Com base em outros estudos, uma média de um milhão de novos episódios de herpes zoster foram estimados para ocorrer nos Estados Unidos anualmente, com um risco de vida de 30%, sendo que a mortalidade ocasionada por esta infecção é elevada em países severamente afetados pela pandemia do HIV/AIDS. Em regiões mais afetadas por essa pandemia, herpes zoster em adultos jovens é frequentemente um marcador de infecção por HIV (Yawn e Gildea, 2013).

Com relação à epidemiologia das infecções causadas por EBV, este vírus infecta mais de 90% da população adulta do mundo (Grywalska *et al.*, 2013), sendo que nos Estados Unidos a soroprevalência de EBV foi estimada em cerca de 66,5% entre as idades de 6-19 anos (58,5% para as crianças de 6-12 anos e 73,4% para os 12-19 anos) entre os anos 2003-2010 (Dowd *et al.*, 2013). No entanto, esta idade de início da infecção por EBV varia bastante, sendo que os países desenvolvidos possuem idades superiores para infecção primária, provavelmente devido a melhores condições de higiene e outros fatores socioeconômicos e densidade populacional (Hsu e Glaser, 2000; Dowd *et al.*, 2013).

Além disso, até 50% das pessoas que adquirem a infecção primária por EBV tarde da infância ou na adolescência pode contrair mononucleose infecciosa (Cohen *et al.*, 2011; Dowd *et al.*, 2013), sendo que a hepatite, manifestação comum da mononucleose infecciosa, afeta 90% dos pacientes (Cisneros-Herreros e Herrero-Romero, 2006).

O EBV também está associado aos linfomas não-Hodgkin (como o linfoma de Burkitt) (Petrara *et al.*, 2013), que são uma das principais causas de morte em pacientes infectados

com HIV mesmo na era TARV (Terapia antirretroviral) (Bohlius *et al.*, 2009; Simard, Pfeiffer e Engels, 2011; Petrara *et al.*, 2013), sendo que a frequência de detecção de EBV nestes tumores varia, apresentando, como exemplo, 60% de frequência com linfoma de Burkitt (Carbone *et al.*, 2009; Petrara *et al.*, 2013). Entretanto, antes da introdução da TARV, a incidência desses linfomas não-Hodgkin em indivíduos infectados com HIV-1 foi 100 vezes mais elevada comparada a população geral (Goedert *et al.*, 1998; Cancer, 2000; Petrara *et al.*, 2013).

Além disso, a alta frequência de associação deste vírus tem sido evidenciada em linfoma de Hodgkin (80% -100%) a partir de tecidos de pessoas infectadas com o HIV, o que mostra que este linfoma pode estar associado ao EBV nesses indivíduos (Grywalska *et al.*, 2013).

Já com relação à epidemiologia das infecções causadas por HCMV, a soroprevalência deste vírus é de 60-100% em todo o mundo (Rafailidis *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2014) e infecta cerca de 90% da população dos EUA (Kondo, Xu e Mocarski, 1996; Staras *et al.*, 2006; Hargett e Shenk, 2010; Swanson e Schleiss, 2013), sendo que as populações de pacientes com maior incidência de infecção primária incluem crianças de amamentação, crianças, prestadores de cuidados em creche e adolescentes sexualmente ativos (Swanson e Schleiss, 2013).

Além disso, o citomegalovírus humano é considerado o primeiro agente de infecção congênita nos países desenvolvidos, afetando cerca de 0,6-0,7% de todos os recém-nascidos, sendo que só nos Estados Unidos 20.000-40.000 crianças por ano nascem com infecção congênita por HCMV (Leung, Sauve e Davies, 2003; Dollard, Grosse e Ross, 2007; Kenneson e Cannon, 2007; Nyholm e Schleiss, 2010; Swanson e Schleiss, 2013). Das crianças infectadas, 10-15% são sintomáticas ao nascimento e 13,5% das assintomáticas irão desenvolver sequelas durante os primeiros anos de vida, como alterações no desenvolvimento psico-motor e surdez (Almeida *et al.*, 2010).

Com relação à epidemiologia das infecções causadas por HHV-6A, HHV-6B e HHV-7, a soroprevalência destes herpesvírus é maior que 90% em adultos (Wyatt *et al.*, 1991; Pruksananonda *et al.*, 1992; Hall *et al.*, 1994; Caserta *et al.*, 1998; Le, Gantt e Practice, 2013), sendo que a soroprevalência de HHV-6A e HHV-6B nestes indivíduos é superior a 95% (De Bolle, Naesens e De Clercq, 2005; Cisneros-Herreros e Herrero-Romero, 2006).

Estes herpesvírus podem causar a doença exantema súbito ou *roséola infantum* e, apesar de 30% dos indivíduos desenvolverem sintomas, a grande maioria de 2 a 4 anos de idade abrigam esses vírus (Zerr *et al.*, 2005; Grinde, 2013). Além disso, infecções por HHV-6A e HHV-6B foram registrados no coração e pulmão (66-91%), fígado (22-54%) e sistema

renal (23-55%) de transplantados (Lautenschlager e Razonable, 2012; Le, Gantt e Practice, 2013). Há menos informação sobre a taxa de infecção ativa por HHV-7 após o transplante de órgãos sólidos, embora tenha sido estimado que ocorra em 0-46% nesses pacientes (Razonable e Paya, 2002; Le, Gantt e Practice, 2013).

Com relação à epidemiologia das infecções causadas por HHV-8, a soroprevalência deste vírus varia muito no mundo, sendo menor que 10% na América do Norte, norte da Europa e Ásia, entre 10-30% no Mediterrâneo e maior que 50% na África subsaariana (Boshoff e Weiss, 2002; Mesri, Cesarman e Boshoff, 2010) (Figura 1.13).

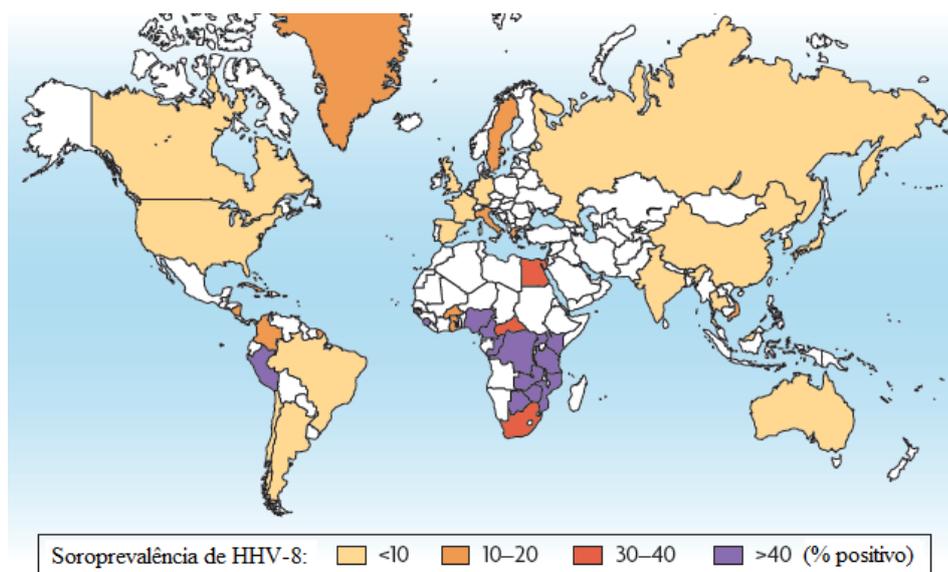


Figura 1.13. Soroprevalência de HHV-8. Estas taxas de soroprevalência foram compiladas a partir de vários estudos. Os valores representam a população em geral. A soroprevalência da infecção por HHV-8 no norte da Europa, Ásia e América do Norte é menor que 10%, mas a maior parte na África subsaariana, a soroprevalência é superior a 50%. A região do Mediterrâneo tem a soroprevalência entre 10-30%. Fonte: (Mesri, Cesarman e Boshoff, 2010) (modificado).

Além disso, o HHV-8 está associado com o sarcoma de Kaposi (SK), uma malignidade relacionada com a SIDA, sendo o risco substancialmente maior nesses indivíduos, ocorrendo em mais de 50% dos casos em fases avançadas da infecção pelo HIV (La Ferla *et al.*, 2013). Embora a taxa de SK tenha sofrido uma redução acentuada desde a introdução da terapia antirretroviral altamente ativa, o sarcoma de Kaposi permanece o segundo tumor mais frequente em pacientes infectados pelo HIV em todo o mundo e tornou-se o câncer mais comum na África subsaariana (Lucia *et al.*, 2011; La Ferla *et al.*, 2013).

Com relação à epidemiologia das infecções causadas por herpesvírus humanos na população brasileira, baseando-se em estudos com população geral e doadores de sangue, foi encontrada soroprevalência de HSV-1 de 67,2% e de HSV-2 de 11,3% (Clemens e Farhat, 2010), de VZV de 85,4% (Clemens *et al.*, 1999), de HCMV variando de 69,8% e 96,4%

(Linhares *et al.*, 1989; Souza *et al.*, 2010), de HHV-6 (HHV-6A/HHV-6B) com variação de 76,5% e 90% (Linhares *et al.*, 1991; De Freitas e Linhares, 1997), e de HHV-8 de 25% (Nascimento *et al.*, 2008). Além disso, estudos realizados no país que investigaram a soroprevalência de EBV e de HHV-7 verificaram soroprevalência de EBV de 71% em crianças e adolescentes do estado de Espírito Santo/Brasil (Figueira-Silva e Pereira, 2004) e soroprevalência de HHV-7 de 36,5% em pacientes com doenças exantemáticas no estado do Pará/Brasil (Freitas *et al.*, 2004). Na tabela abaixo pode-se observar a soroprevalência dos herpesvírus humanos no mundo e no Brasil, como discutido anteriormente.

Tabela 1.4. Soroprevalência dos herpesvírus humanos no mundo e no Brasil.

Designação	Soroprevalência no mundo	Soroprevalência no Brasil
Vírus herpes simples 1	50 - 90% ¹	67,2% ⁸
Vírus herpes simples 2	20 - 60% ¹	11,3% ⁸
Vírus varicella-zoster	95% ²	85,4% ⁹
Vírus Epstein-Barr	>90% ³	71% ¹⁰
Citomegalovírus humano	60 - 100% ⁴	69,8 – 96,4% ¹¹
Herpesvírus humano 6A	>95% ⁵	76,5 – 90% ¹²
Herpesvírus humano 6B	>95% ⁵	76,5 – 90% ¹²
Herpesvírus humano 7	>90% ⁶	36,5% ¹³
Vírus associado ao sarcoma de Kaposi	<10- >50% ⁷	25% ¹⁴

Fonte: ¹(Cisneros-Herreros e Herrero-Romero, 2006); ²(Aebi *et al.*, 2001; Nardone *et al.*, 2007; Papaloukas, Giannouli e Papaevangelou, 2014); ³(Grywalska *et al.*, 2013); ⁴(Rafailidis *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2014); ⁵(De Bolle, Naesens e De Clercq, 2005; Cisneros-Herreros e Herrero-Romero, 2006); ⁶(Wyatt *et al.*, 1991; Pruksananonda *et al.*, 1992; Hall *et al.*, 1994; Caserta *et al.*, 1998; Le, Gantt e Practice, 2013); ⁷(Boshoff e Weiss, 2002; Mesri, Cesarman e Boshoff, 2010); ⁸(Clemens e Farhat, 2010); ⁹(Clemens *et al.*, 1999); ¹⁰(Figueira-Silva e Pereira, 2004); ¹¹(Linhares *et al.*, 1989; Souza *et al.*, 2010); ¹²(Linhares *et al.*, 1991; De Freitas e Linhares, 1997); ¹³(Freitas *et al.*, 2004); ¹⁴(Nascimento *et al.*, 2008).

Ademais, no que se refere à prevalência de infecções causadas por HHV na população brasileira, apesar dos escassos estudos realizados no Brasil, estes evidenciam que esta prevalência varia conforme os grupos avaliados, se apresentando maior em grupos como em portadores do HIV comparado aos indivíduos não reagente para este vírus (Miller *et al.*, 2006; De França *et al.*, 2011).

Assim, como existem poucos trabalhos sobre a investigação epidemiológica destes vírus no país, há a necessidade de mais estudos para contribuir para a epidemiologia de HHV no Brasil (Clemens *et al.*, 1999; Figueira-Silva e Pereira, 2004; Nascimento *et al.*, 2008).

1.9. Diagnóstico laboratorial dos herpesvírus humanos

O diagnóstico dos herpesvírus humanos (HHV) é feito avaliando as características clínicas do paciente e as associando às confirmações laboratoriais da infecção. Sendo assim, o diagnóstico laboratorial tem aplicação complementar para as manifestações clínicas características causadas por estes vírus, destacando-se sua importância em indivíduos imunocomprometidos, transplantados, gestantes e recém-nascidos (Varella *et al.*, 2005; Penello *et al.*, 2010).

Em geral, as manifestações clínicas variam e podem apresentar-se em diferentes fases evolutivas (Penello *et al.*, 2010). Além disso, a extensão e gravidade das lesões estão diretamente relacionadas ao inóculo viral, imunidade do hospedeiro e predisposição genética do paciente infectado, podendo haver graves manifestações sistêmicas (Lupi, 2000; Penello *et al.*, 2010).

Com relação ao diagnóstico laboratorial utilizado para infecções causadas por herpesvírus humanos, o isolamento viral ainda é um dos principais métodos utilizados para diagnóstico desses vírus, sendo considerado “método padrão-ouro” para detecção do HSV (Varella *et al.*, 2005; Penello *et al.*, 2010). Entretanto, esta técnica é lenta, com resultados variando entre 7 a 15 dias para a detecção do HSV, por exemplo, além de ser trabalhosa e dispendiosa (Kimberlin, 2004; Penello *et al.*, 2010).

Os testes sorológicos também são utilizados para o diagnóstico das infecções causadas por HHV, como a imunofluorescência e o ensaio imunoenzimático (ELISA), sendo este muito importante no diagnóstico das infecções causadas por EBV, por exemplo. Estes métodos sorológicos são úteis como testes de confirmação de infecções recentes, porém também são importantes para o rastreio de infecções passadas. No entanto, o uso da sorologia para diagnóstico das infecções causadas por HHV está diminuindo, devido a menor especificidade e sensibilidade destes testes, que ocasionam dúvidas nas investigações sorológicas dos HHV (Who, 1991).

A partir das desvantagens destes testes sorológicos e com o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico, ocorreram mudanças na abordagem diagnóstica das infecções causadas por HHV para os métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Who, 1991).

Com relação à PCR, esta vem apresentando vantagens adicionais no diagnóstico laboratorial, principalmente por ser capaz de detectar pequenas quantidades de genoma viral, tanto em pacientes sintomáticos quanto em assintomáticos, e rapidez nesta detecção que, nos casos graves e sistêmicos da infecção tornam-se vitais (Penello *et al.*, 2010).

A técnica da PCR permite que uma região alvo do DNA seja amplificada diversas vezes, utilizando nucleotídeos, sequências iniciadoras (*primers*) e enzimas polimerases. Assim, é possível a obtenção de muitas cópias de uma sequência específica de ácido nucléico a partir de uma fita molde (Schmutzhard *et al.*, 2004).

Além disso, nos últimos anos vêm crescendo a aplicação da PCR em tempo real (qPCR) no diagnóstico da infecção, constituindo-se uma técnica de detecção e quantificação de ácidos nucléicos com alta sensibilidade e rapidez. A qPCR é uma técnica precisa, reprodutível e determina o nível de amplificação durante a fase exponencial da reação (Bustin e Mueller, 2005).

A maior vantagem da PCR em tempo real para o diagnóstico é a análise quantitativa das amostras, que é particularmente importante para o diagnóstico e tratamento de pacientes transplantados e imunocomprometidos (Schmutzhard *et al.*, 2004).

Entretanto, essas técnicas devem ser reproduzidas diversas vezes para a diferente detecção dos nove vírus da família *Herpesviridae* que infectam humanos. Já a técnica *Pan-herpesvírus*, baseada na amplificação de uma região altamente conservada do genoma dos herpesvírus através da PCR *Nested* (*Pan-PCR*) e posterior identificação da espécie viral destes através de sequenciamento do genoma viral, surgiu a fim de identificar simultaneamente os herpesvírus, diminuindo, assim, o tempo desta detecção, além de constituir uma ferramenta muito importante na procura de novos herpesvírus humanos e animais (Vandevanter *et al.*, 1996).

O *Pan-PCR* amplifica o gene que codifica a enzima DNA polimerase (DPOL) dos herpesvírus, sendo esta uma região altamente conservada do genoma destes vírus, ou seja, uma região que possui muita semelhança entre as espécies de HHV. Este nível de conservação permite o desenho de iniciadores degenerados de PCR contendo desoxi-inosina. Esses iniciadores são como uma mistura de sequências de nucleotídeos capazes de se associarem a essa região conservada fazendo com que esta técnica possua o potencial de detectar a maioria dos herpesvírus existentes. Ademais, com o sequenciamento do genoma viral, que identifica a espécie viral, o *Pan-herpesvírus* é capaz de caracterizar novos genomas virais (Ehlers *et al.*, 1999; Ehlers *et al.*, 2007).

1.10. Co-infecção HIV/Herpesvírus humanos

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é um vírus pertencente à família *Retroviridae* e é responsável pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS), o qual é caracterizado pela disfunção progressiva e fatal da função do sistema imunitário, e pela ocorrência de infecções oportunistas e tumores. São conhecidos dois tipos do HIV: o HIV-1, que é prevalente no Brasil e no mundo, e o HIV-2, com maior prevalência na África (Santos e Beck, 2009; Gibellini *et al.*, 2013).

O HIV-1 é constituído por um envelope formado por bicamada lipídica e as glicoproteínas gp120 e gp41, responsáveis pela entrada do vírus na célula hospedeira. Internamente, uma matriz protéica envolve o capsídeo viral, que, em seu interior, encontra-se o genoma viral, consistindo de duas fitas simples de RNA associadas à enzimas virais, como a transcriptase reversa (Alcântara, 2011) (Figura 1.14).

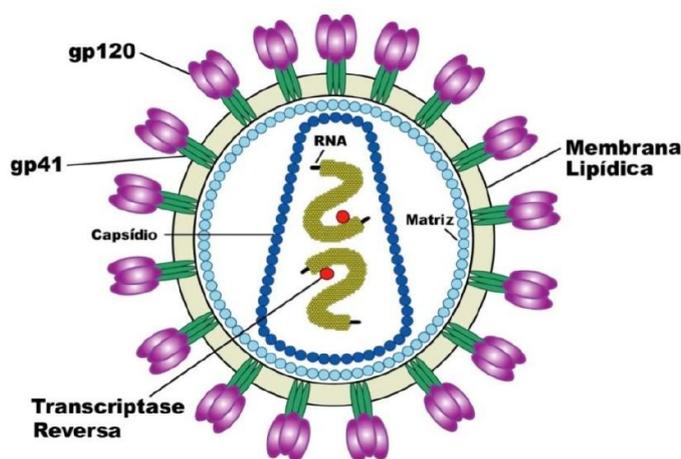


Figura 1.14. Elementos estruturais do HIV-1. Desenho esquemático evidenciando o vírus HIV-1 e suas estruturas. As setas indicam o envelope (membrana lipídica), as glicoproteínas do envelope (gp120 e gp41), a matriz protéica e o capsídeo, onde encontra-se duas fitas simples de RNA associadas à enzimas virais, como transcriptase reversa. Fonte: www.cdc.gov (modificado).

Este vírus penetra no organismo do hospedeiro e infecta particularmente linfócitos T auxiliares, os quais expressam em sua superfície a molécula CD4+, que atua como molécula receptora, e outros co-receptores, como a molécula CCR5 e CXCR4. Por intermédio destes receptores de superfície, o HIV também infecta macrófagos, células dendríticas, células do aparelho respiratório, sistema nervoso central e células epiteliais, entre outras, perpetuando, dessa forma, seu ciclo biológico. No momento em que o sistema imunológico começa a ficar comprometido, surgem, então, as doenças oportunistas (Santos e Beck, 2009).

Dentre essas doenças, muitas são causadas pela infecção dos herpesvírus humanos. No início de 1980, expressões clínicas graves da infecção causada por HHV-8 (Sarcoma de

Kaposi [SK]) estavam entre as primeiras manifestações associadas à AIDS. Posteriormente, patologias causadas por diferentes HHV, além de SK, tais como as associadas ao HSV-1/2, linfoma de Burkitt por EBV e rinitis por HCMV, foram incluídas na lista de condições definidoras de SIDA para o controle e prevenção destas doenças (Mofenson *et al.*, 2009; Munawwar e Singh, 2016). Assim, as interações entre HHV e o HIV-1 estão cada vez mais sendo reconhecidas (Suligo *et al.*, 2003; Adjei *et al.*, 2008; Lisco *et al.*, 2012; Munawwar e Singh, 2016).

Neste contexto, a co-infecção HIV/HSV-1/2 estão dentre as mais estudadas, já que as infecções por esses herpesvírus tornaram-se importantes para o tratamento clínico da SIDA, pois estima-se que dois terços dos indivíduos com HIV-1 são co-infectados com HSV (Chentoufi, Dervillez, *et al.*, 2012).

Uma das doenças oportunistas que o HSV-1/2 podem provocar é a herpes genital, conduzindo à lesões ulcerativas genitais dolorosas. Apesar dos avanços significativos feitos na terapia antiviral e educação para práticas sexuais seguras, a herpes genital continua sendo um importante problema de saúde pública, já que a prevalência da infecção pelo HSV aumentou em cerca de 30%, desde o final da década de 1980, quando infecções por HIV surgiram pela primeira vez (Chentoufi, Dervillez, *et al.*, 2012).

Além disso, a infecciosidade dos indivíduos positivos para o HIV-1 pode aumentar durante períodos de reativação de HSV-1/2, aumentando a concentração de HIV-1 no plasma e em secreções vaginais, e o risco de transmissão deste vírus (Chentoufi, Dervillez, *et al.*, 2012).

Com relação a co-infecção HIV/HHV-6 é de conhecimento que a infecção causada por este herpesvírus em indivíduos com SIDA resulta em aumento da carga viral de HHV-6, podendo ocasionar infecção generalizada disseminada em muitos órgãos, além de infecção ativa no sistema nervoso central, pneumonite e retinite (De Bolle, Naesens e De Clercq, 2005; Munawwar e Singh, 2016).

Outro exemplo de co-infecção HIV/HHV, é a infecção de indivíduos portadores de HIV infectados com HHV-8, que, devido a um sistema imune já danificado, predispõe, nestes indivíduos, a uma maior carga viral de HHV-8, que poderá contribuir para o desenvolvimento de desordens neoplásicas associado a este herpesvírus (Whitby *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 1996; Tedeschi *et al.*, 2001; Lisco *et al.*, 2006; Leao *et al.*, 2013), tais como linfoma de efusão primário (PEL), doença de Castleman multicêntrica (MCD) e sarcoma de Kaposi (SK) (Kaplan, 2013). Nestes indivíduos estas malignidades ocorrem de forma mais agressiva, com rápido curso, ocasionando alta mortalidade (Hengge *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2015).

Assim, indivíduos imunocomprometidos infectados com HIV apresentam elevados riscos de infecções causadas por herpesvírus humanos, podendo ocasionar graves doenças associadas a estes herpesvírus, além de poderem contribuir para a progressão da AIDS e transmissão do HIV (Munawwar e Singh, 2016).

1.11. Justificativa

O principal esforço nos últimos anos tem sido o de desenvolver métodos para o diagnóstico rápido de herpesvírus humanos, proporcionando, assim, a informação para o manejo do paciente e o controle das doenças.

Diante disso, novas técnicas para detecção destes vírus foram surgindo visando melhorar a sensibilidade e especificidade, além da velocidade e confiabilidade dos testes. Dentre essas, a técnica molecular de reação em cadeia da polimerase (PCR), vêm substituindo, cada vez mais, outros métodos clássicos de diagnósticos para os herpesvírus, como o isolamento viral, que requer trabalho intensivo e dispendioso. Entretanto, as diferentes variações de PCR devem ser reproduzidas diversas vezes para a diferente detecção dos nove vírus da família *Herpesviridae* que infectam humanos, podendo ocasionar demora na detecção viral.

A partir disso, este trabalho visou comprovar que o *Pan*-herpesvírus pode ser eficiente como um método de diagnóstico diferencial para detecção simultânea dos nove herpesvírus humanos, garantindo maior rapidez nesta detecção que, nos casos graves e sistêmicos da infecção, tornam-se vitais.

Ademais, no Brasil pouco é conhecido sobre a verdadeira prevalência das infecções causadas por herpesvírus humanos em indivíduos HIV reagentes, mesmo estes fazendo parte dos indivíduos que mais sofrem com infecções oportunistas causadas por esses vírus. Este escasso conhecimento é devido à ocorrência de casos assintomáticos, além dos poucos estudos realizados no país. Portanto, este estudo foi relevante para diagnosticar os casos de infecções causadas pelos HHV, podendo, assim, monitorar o quadro clínico do paciente, além de contribuir para a determinação da prevalência das infecções causadas pelos herpesvírus humanos em indivíduos portadores do HIV no Rio de Janeiro/Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Determinar a prevalência das infecções causadas pelos herpesvírus humanos em indivíduos HIV reagentes através de diagnóstico diferencial (*Pan*-herpesvírus).

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar o perfil demográfico e clínico dos indivíduos HIV reagentes;
- Detectar os herpesvírus humanos em indivíduos HIV reagentes (grupo teste) e em indivíduos não reagentes para o HIV (grupo controle) através de diagnóstico diferencial (*Pan*-herpesvírus);
- Comparar a prevalência das infecções causadas pelos herpesvírus humanos entre o grupo teste e o grupo controle;
- Avaliar fatores associados com a prevalência das infecções causadas por herpesvírus humanos em indivíduos portadores do HIV, como sexo, idade e taxas de linfócitos T CD4+;
- Determinar a carga viral das amostras reagentes para os HHV para avaliar as infecções causadas por estes vírus em indivíduos de ambos os grupos do estudo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho tratou-se de um estudo retrospectivo e prospectivo que foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia do Instituto Oswaldo Cruz/IOC em colaboração com o Hospital Universitário Gaffrée e Guinle/HUGG (centro nacional de referência em AIDS).

3.1. Aspectos éticos da pesquisa

Este projeto foi submetido à Plataforma Brasil e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos (CAAE 11350212.3.0000.5258) (Anexo 1).

3.2. População de estudo

Este trabalho avaliou dois grupos de estudo: o grupo teste e o grupo controle. O grupo teste compreendeu 241 amostras de soro de indivíduos HIV reagentes coletadas no Hospital Universitário Gaffrée e Guinle/HUGG, Rio de Janeiro, sendo que o estudo retrospectivo abrangeu 184 amostras de soro coletadas durante os anos de 2012 (95 amostras) e 2013 (89 amostras), e o estudo prospectivo compreendeu 57 amostras de soro coletadas até julho do ano de 2014. Já o grupo controle abrangeu 94 amostras de soro de indivíduos HIV não reagentes coletadas no ano de 2013 em uma campanha para testagem das hepatites virais no estado do Rio de Janeiro.

3.3. Seleção de amostras

3.3.1. Critérios de inclusão de amostras

Com relação ao grupo teste deste estudo, foram inclusas somente as amostras provenientes de pacientes portadores do HIV comprovados pela técnica imunoenzimática quimioluminescente/teste *Access HIV (BioRad, Marnes-la-Coquette, França)* e por imunocromatografia/*Imunoblot Rápido DPP® HIV-1/2 (Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil)* pelo Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, e que apresentavam dados referentes às variáveis sexo, idade e taxas de linfócitos T CD4+. Já com relação ao grupo controle deste trabalho foram adquiridas somente as amostras não reagentes nos testes do HIV (anti-HIV 1/2 e HIV RNA) e que apresentavam dados referentes às variáveis sexo e idade.

3.3.2. Critérios de exclusão de amostras

As amostras que não apresentaram volume suficiente de soro foram excluídas do estudo.

3.4. Coleta das Amostras de soro

As amostras de soro foram coletadas de cada indivíduo dos diferentes grupos de estudo. Assim, 5 mL de sangue periférico foram coletados por profissionais especializados por meio de punção venosa periférica, utilizando agulhas hipodérmicas e tubos estéreis do tipo *vacutainer* (*Becton Dickinson and Company*, Franklin Lakes, USA) contendo ativador de coágulo jateado na parede do tubo, que acelera o processo de coagulação, e gel separador para obtenção de soro. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm a 25°C por 10 minutos, o soro foi separado, aliquotado em tubo de poliestireno de 1,5 mL devidamente identificados e estocados a -20°C.

3.5. Extração do DNA dos herpesvírus humanos

A extração do DNA dos herpesvírus humanos foi realizada segundo o protocolo do *kit* comercial *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* (*Roche*, New Jersey, EUA). Primeiramente, antes do início da extração de material genético viral, foi preparada a solução de trabalho (*working solution*), que consiste na proporção de 50 µL de transportador de RNA poliA (*polyA RNA carrier*) e 2,5 mL de tampão de ligação (*Binding Buffer*). Esta solução foi preparada a cada extração, pois não podia ser armazenada.

Após isso, as amostras foram descongeladas e homogeneizadas no *vortex-Genie* (*Scientific Industries, Inc.*, EUA) por 30 segundos. Em seguida, foram adicionados, em tubos de poliestireno de 1,5 mL livres de nucleases e devidamente identificados, 200 µL de soro de cada amostra em seu respectivo tubo, sendo adicionados posteriormente 200 µL de solução de trabalho e 50 µL da solução de proteinase K. Rapidamente as amostras foram homogeneizadas por 15 segundos e incubadas aos 72°C por 10 minutos em banho-maria (Nova Técnica, São Paulo, Brasil).

Após a incubação e uma rápida centrifugação por 30 segundos na centrífuga 5415R *Eppendorf* (*Eppendorf*, Hamburgo, Alemanha), foram adicionados 100 µL de tampão de ligação (*Binding Buffer*) em cada tubo. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas por 15 segundos e centrifugadas por 30 segundos.

Posteriormente o conteúdo de cada tubo foi completamente transferido para coluna com filtro em tubos de coleta devidamente identificados. As amostras foram, então, centrifugadas a 8.000 x g por 1 minuto e ao fim da centrifugação, os tubos de coleta de cada amostra foram descartados e as colunas recolocadas em outros novos tubos.

Após essa etapa, foram adicionados 500 µL do tampão de remoção de inibidores (*Inhibitor Removal Buffer*) em cada coluna e outra centrifugação foi realizada a 8.000 x g por

1 minuto. Ao fim desta centrifugação, novamente os tubos de coleta de cada amostra foram descartados e as colunas combinadas em outros novos tubos.

Em seguida, 450 µL de tampão de lavagem (*Wash Buffer*) foram adicionados em cada coluna, seguido de centrifugação a 8.000 x g por 1 minuto e, em sequência, os tubos de coleta de cada amostra foram descartados e as colunas combinadas em outros novos tubos.

Após isso, uma segunda lavagem foi realizada como a anterior, adicionando 450 µL de tampão de lavagem (*Wash Buffer*) em cada coluna, seguido de centrifugação a 8.000 x g por 1 minuto. Posteriormente somente a solução resultante de cada amostra foi descartada, sem o descarte dos tubos de coleta, e então, estes foram novamente combinados nas suas respectivas colunas, seguido de uma centrifugação a 13.000 x g por 10 segundos. Logo após, os tubos de coleta foram descartados e as colunas foram, então, combinadas em novos tubos de poliestireno de 1,5 mL livres de nucleases e devidamente identificados.

Posteriormente foram adicionados 50 µL de tampão de eluição (*Elution Buffer*) nas colunas, que sofreram uma última centrifugação a 8.000 x g por 1 minuto. Em seguida, as colunas foram descartadas e os tubos de 1,5 mL contendo o material genético viral eluído foram estocados a -70°C até o momento da análise por *Pan*-PCR (diagnóstico diferencial) e por PCR em tempo real.

Em cada extração, o HSV-1 cultivado em cultura de células com concentração de 10⁷ cópias/mL foi incluído como controle positivo e amostras de água ultra pura foram incluídas como controles negativos .

3.6. Detecção simultânea dos herpesvírus humanos por *Pan*-herpesvírus

Para detecção simultânea dos nove herpesvírus da família *Herpesviridae* que infectam humanos foi utilizado a técnica *Pan*-herpesvírus baseada na amplificação, por PCR *Nested* (*Pan*-PCR), do gene DPOL, uma região altamente conservada do genoma dos herpesvírus, e na identificação da espécie destes através de sequenciamento do genoma viral (Ehlers *et al.*, 2007).

3.6.1. Teste de detecção de herpesvírus humanos por PCR *Nested* (*Pan*-PCR)

Para demonstrar a detecção de herpesvírus humanos por PCR *Nested* foi realizada a amplificação, como descrito no item 3.6.3, de diferentes alíquotas contendo HSV-1, HSV-2, EBV, HHV-6 (HHV-6A/HHV-6B) e HHV-8, sendo estes provenientes de cultura celular (HSV-2) e soro (HSV-1, EBV, HHV-6 e HHV-8), e extraídas anteriormente segundo o protocolo do *kit* comercial *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* (Roche, New Jersey, EUA), como consta no item 3.5. Após a amplificação, foi realizada a eletroforese como descrito no

item 3.6.4. Os resultados adquiridos foram avaliados e as alíquotas foram novamente armazenadas aos -70°C.

3.6.2. Limite de detecção da PCR Nested (Pan-PCR)

Para avaliar o limite de detecção da PCR *Nested*, uma alíquota de HSV-1 cepa KOS com título viral de 10^7 cópias/mL proveniente de cultura celular foi diluída de 1 a 10^7 cópias/mL em água RNase/DNase free (*Gibco*, NI, EUA) após a extração utilizando o kit comercial *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* (*Roche*, New Jersey, EUA), como consta no item 3.5. Após a diluição seriada, foi realizada a amplificação por PCR *Nested* seguido de eletroforese como descrito nos itens 3.6.3 e 3.6.4 deste trabalho, respectivamente. Os resultados adquiridos do limite de detecção foram avaliados e as amostras da diluição seriada foram armazenadas a -70°.

3.6.3. PCR Nested (Pan-PCR)

A PCR *Nested* foi utilizada para a amplificação do gene DPOL dos nove herpesvírus humanos através de duas etapas de amplificação.

3.6.3.1 Primeira etapa de amplificação

Na primeira etapa de amplificação foi realizada, para cada reação, uma mistura composta por 8,0 µL de água RNase/DNase free (*Gibco*, NI, EUA), 2,5 µL de tampão 10x PCR Buffer I (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA), 0,4 mM de concentração de dNTP (100 mM-*Invitrogen*, CA, EUA), 5% de DMSO a 100x (*Life Technologies*, Califórnia, EUA), 1 µM de concentração de cada oligonucleotídeo, 2 mM de concentração MgCl₂ (*Promega*, EUA), e 1,25 U/µL de *AmpliTaq Gold DNA Polymerase* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA) de acordo com o protocolo desta enzima.

Os oligonucleotídeos específicos foram desenhados e sintetizados para a detecção dos herpesvírus como descrito por Ehlers e colaboradores (Ehlers *et al.*, 2007). No quadro 3.1 estão demonstradas as sequências dos iniciadores desta primeira etapa.

Quadro 3.1. Sequências dos iniciadores referentes à primeira etapa da PCR *Nested*

Iniciadores	Sequência (5' - 3')*	Orientação	Localização**
285sDFA	GAYTTYGC[N/I]AGYYT[N/I]TAYCC	senso	DNA Pol.
285sILK	TCCTGGACAAGCAGCAR[N/I]YSGC[N/I]MT[N/I]AA	senso	DNA Pol.
285-asKG1	GTCTTGCTCACCAG[N/I]TC[N/I]AC[N/I]CCYTT	anti-senso	DNA Pol.

*Código IUPAC para indicar as posições degeneradas: I: inosina, R: purina (A/G), Y: pirimidina (C/T), M: A/C, S: C/G, N: base indefinida (A/T/C/G).
** DNA Pol.: gene que codifica a enzima DNA polimerase viral (DPOL)

Posteriormente a solução foi homogeneizada no *vortex-Genie* (*Scientific Industries, Inc.*, EUA) e sofreu uma rápida centrifugação de 30 segundos na centrífuga 5415R *Eppendorf* (*Eppendorf*, Hamburgo, Alemanha). Após isso, foram adicionados 22,5 µL da mistura em cada tubo de poliestireno de 0,5 mL devidamente identificados e 2,5 µL da respectiva amostra de DNA viral extraído anteriormente como consta no item 3.5., e novamente as soluções foram homogeneizadas e centrifugadas por 30 segundos.

Em seguida, as amostras foram colocadas no termociclador *Master Cycler Eppendorf* (*Eppendorf*, Hamburgo, Alemanha) para amplificar a região DPOL dos herpesvírus e foram submetidas ao seguinte ciclo de temperaturas apresentado no quadro 3.2. Ao final dos ciclos, os materiais foram armazenados em a -20°C para a segunda etapa da PCR *Nested*.

Quadro 3.2. Termociclagem referente à primeira etapa da PCR *Nested*

Atividade	Temperatura	Tempo	
Desnaturação inicial	95°C	12 minutos	} 45 ciclos
Desnaturação	95°C	20 segundos	
Hibridização	46°C	30 segundos	
Extensão	72°C	30 segundos	
Extensão final	72°C	10 minutos	

3.6.3.2 Segunda etapa de amplificação

Na segunda etapa de amplificação foi realizada, para cada reação, uma mistura que foi composta por 12,0 µL de água RNase/DNase free (*Gibco*, NI, EUA), 2,5 µL de tampão 10x PCR Buffer I (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA), 0,4 mM de concentração de dNTP (100 mM-*Invitrogen*, CA, EUA), 5% DMSO a 100x (*Life Technologies*, Califórnia, EUA), 1 µM de concentração de cada oligonucleotídeo, 2 mM de concentração MgCl₂ (*Promega*, EUA), e 1,25 U/µL de *AmpliTaq Gold DNA Polymerase* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA) de acordo com o protocolo desta enzima.

Os oligonucleotídeos específicos foram desenhados e sintetizados para a detecção dos herpesvírus como descrito por Ehlers e colaboradores (Ehlers *et al.*, 2007). No quadro 3.3 estão demonstradas as sequências dos iniciadores desta segunda etapa.

Quadro 3.3. Sequências dos iniciadores referentes à segunda etapa da PCR *Nested*

Iniciadores	Sequência (5' - 3')*	Orientação	Localização**
286sTGV	TGTAACCTCGGTGTAYGG[N/I]TTYAC[N/I]GG[N/I]GT	senso	DNA Pol.
286-asIYG	CACAGAGTCCGTRTC[N/I]CCRTA[N/I]AT	anti-senso	DNA Pol.

*Código IUPAC para indicar as posições degeneradas: I: inosina, R: purina (A/G), Y: pirimidina (C/T), N: base indefinida(A/T/C/G).
 ** DNA Pol.: gene que codifica a enzima DNA polimerase viral (DPOL)

Posteriormente a solução foi homogeneizada no *vortex-Genie* (*Scientific Industries, Inc.*, EUA) e sofreu uma rápida centrifugação de 30 segundos na centrífuga 5415R *Eppendorf* (*Eppendorf*, Hamburgo, Alemanha). Após isso, foram adicionados 24,0 µL da mistura em cada tubo de poliestireno de 0,5 mL devidamente identificados e 1,0 µL do respectivo *amplicon* obtido na etapa anterior (primeira etapa), e novamente as soluções foram homogeneizadas e centrifugadas por 30 segundos.

Em seguida, as amostras foram colocadas no termociclador *Master Cycler Eppendorf* (*Eppendorf*, Hamburgo, Alemanha) para amplificar a região DPOL dos herpesvírus, e foram submetidas ao seguinte ciclo de temperaturas apresentado no quadro 3.4. Ao final dos ciclos, os materiais foram armazenados a -20°C para a eletroforese.

Quadro 3.4. Termociclagem referente à segunda etapa da PCR *Nested*

Atividade	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	95°C	12 minutos
Desnaturação	95°C	20 segundos
Hibridização	46°C	30 segundos
Extensão	72°C	30 segundos
Extensão final	72°C	10 minutos

} 35 ciclos

Em cada ensaio de PCR *Nested*, o DNA do HSV-1 isolado a partir de amostra de cultura de células com concentração de 10⁷ cópias/mL foi incluído como controle positivo. Amostras de água ultra pura foram utilizadas como controles negativos.

3.6.4. Eletroforese

Para a visualização e análises dos resultados da amplificação da segunda etapa da PCR *Nested*, os fragmentos de DNA formados foram separados por eletroforese em gel de agarose à concentração de 1,5% contendo tampão Tris/Acetato/EDTA (TAE) 1x (50x – 242 g de Tris base/ 57,1 mL de ácido acético glacial/100 mL de EDTA 0,5 M pH: 8,0), agarose (*Gibco*, EUA) e 0,5% de brometo de etídio a 0,5 µg/mL (*Invitrogen*, EUA). Posterior à formação dos poços no gel de agarose, foi aplicado nestes a homogeneização de 8 µL de cada produto da segunda etapa da PCR *Nested* com 2,0 µL de tampão de amostra (50% de glicerol, 0,4% de azul de bromofenol, 0,4% de xileno cianol). Foi utilizado 6 µL do padrão de peso molecular 100 pares de bases (*Norgen Biotek Corporation*, Ontario, Canadá).

Após a aplicação do peso molecular e de todas as amostras, foi realizada a corrida e a separação dos fragmentos de DNA por eletroforese com voltagem de 85 volts na fonte por 30 minutos (*Hoefler, Inc.*, Massachusetts, EUA). Posterior a corrida, o produto amplificado da região DPOL dos herpesvírus de 160-181 pares de bases foi visualizado em luz ultravioleta no foto-documentador *Kodak Gel Logic 2200* (*Hyland Scientific*, Washington, USA) e os resultados gerados foram analisados possibilitando a identificação das amostras que foram reagentes para algum dos herpesvírus humanos.

3.6.5. Sequenciamento do genoma dos herpesvírus humanos

Após a eletroforese e análises dos resultados da amplificação por PCR *Nested*, as amostras que foram reagentes para herpesvírus, ou seja, que amplificaram a região DPOL destes vírus, foram submetidas ao sequenciamento para determinar a sequência dessa região e, assim, identificar o herpesvírus humano que foi detectado no *Pan-PCR*.

Para isso, foi realizada a preparação da reação de sequenciamento de DNA, em tubos de poliestireno de 1,5 mL livres de nucleases e devidamente identificados, onde cada reação foi composta por 5,5 µL de água RNase/DNase free (*Gibco*, NI, EUA), 1,0 µL de oligonucleotídeos da segunda etapa da PCR *Nested* a 3,2 pmol (Quadro 3.3) e 1,0 µL do respectivo *amplicon* obtido nesta etapa da PCR *Nested* realizada anteriormente.

O sequenciamento foi realizado em ambas as direções (senso e anti-senso), utilizando, assim, duas reações de sequenciamento de DNA para cada amostra amplificada na segunda etapa da PCR *Nested*, contendo, então, um único oligonucleotídeo desta etapa (senso ou anti-senso) em cada reação.

Essas reações foram entregues à plataforma de sequenciamento de DNA do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde/PDTIS (Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil), onde o sequenciamento foi realizado utilizando o *kit BigDye*

Terminator 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, USA) no termociclador *Gen Amp PCR system 9700* (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e o sequenciador ABI3730xl -96 capilares (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

As sequências nucleotídicas obtidas pela plataforma foram analisados no programa *BioEdit 7.2.5* e foram comparadas a outras sequências depositadas no *GenBank* com a utilização da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para a identificação da espécie de herpesvírus que foi detectado na PCR *Nested*. Entretanto, como o *GenBank* possui poucas sequências de HHV-6A e de HHV-6B depositadas, no momento este teste não permite a discriminação destes vírus.

3.7. Detecção e quantificação absoluta dos herpesvírus humanos por PCR em tempo real

Foi realizada a detecção e quantificação absoluta do material genético, por PCR em tempo real (qPCR), através do sistema *Real-time PCR TaqMan* (Applied Biosystems, Foster City, EUA), das amostras que foram reagentes para algum dos herpesvírus humanos no *Pan-herpesvírus*.

3.7.1. PCR em tempo real para detecção e quantificação do HSV-1

Para a detecção e quantificação do HSV-1 por qPCR, foi realizado, para cada reação, uma mistura composta por 12,5 µL de *TaqMan Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 0,25 µL de cada oligonucleotídeo a 100 nM, 0,5 µL de sonda a 100 nM e 6,5 µL de água RNase/DNase free (*Gibco*, NI, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Os oligonucleotídeos e a sonda específicos foram desenhados e sintetizados para a detecção do gene da glicoproteína D (gD/70 pares de bases) do HSV-1 como descrito por Weidmann e colaboradores (Weidmann, Armbruster e Hufert, 2008).

Além disso, para a construção da curva padrão deste teste foi utilizada curva sintética com título inicial de 10^7 cópias/mL em diluição seriada (10^1 - 10^7). No quadro 3.5 estão demonstradas as sequências dos iniciadores, da sonda e da curva padrão sintética utilizados nesta qPCR para detecção e quantificação do HSV-1. Este teste apresentou limite de detecção de 10^3 cópias/mL.

Quadro 3.5. Sequências dos iniciadores, sonda e curva padrão sintética utilizados na PCR em tempo real para detecção e quantificação do HSV-1

HSV-1	Sequência (5' - 3')
Iniciadores	senso - CGGCCGTGTGACACTATCG
	anti-senso - CTCGTAAAATGGCCCCCTCC
Sonda	FAM-CCATACCGACCACACCGACGAACC-MGB*
Curva padrão sintética	TTCGTCTCGTAAAATGGCCCCCTCCCGTATGGTTCGTCGGTGTGG TCGGTATGGATGCGTCGATAGTGTCACACGGCCGCTGATA
*Sonda MGB marcada com o fluoróforo FAM contendo <i>quencher</i> sem fluorescência.	

Posteriormente a solução foi homogeneizada no *vortex-Genie* (*Scientific Industries, Inc.*, EUA) e sofreu uma pequena centrifugação de 30 segundos na centrífuga 5415R *Eppendorf* (*Eppendorf*, Hamburgo, Alemanha). Após isso, foi distribuído 20 µL/cavidade da mistura em duplicata em placas de 96 cavidades (*Falcon®/Labware*, Franklin Lakes, USA) e, em seguida, foi adicionado 5 µL do DNA viral/cavidade extraído anteriormente (item 3.5).

Em seguida, a placa contendo as amostras foi centrifugada por 30 segundos e submetida às condições de termociclagem no *7.500 System SDS Software* versão 1.2.1 (*Applied Biosystems*, Foster City, EUA) como evidenciado no quadro 3.6. Ao final dos ciclos os resultados da quantificação foram analisados e expressos em números de cópias do DNA viral por mililitros de soro (cópias/mL).

Quadro 3.6. Termociclagem referente à PCR em tempo real para detecção e quantificação do HSV-1

Atividade	Temperatura	Tempo	
Ativação da UNG*	50°C	2 minutos	
Desnaturação e Ativação da enzima	95°C	10 minutos	
Desnaturação	95°C	15 segundos	} 40 ciclos
Hibridização e Extensão	60°C	1 minuto	
*UNG: Uracil-N-glicosilase			

Em cada ensaio de qPCR, o DNA do HSV-1 isolado a partir de amostra de cultura de células com concentração de 10⁷ cópias/mL foi incluído como controle positivo. Amostras de água ultra pura e controles sem amostra (NTC/*no template control*) foram utilizadas como controles negativos.

3.7.2. PCR em tempo real para detecção e quantificação do HHV-6 (HHV-6A e HHV-6B)

Para a detecção e quantificação do HHV-6 (HHV-6A e HHV-6B) por qPCR, foi realizado, para cada reação, uma mistura composta por 1 µL de 25x PCR *Enzyme Mix* (Life Technologies, Califórnia, EUA), 2,5 µL de cada oligonucleotídeo a 10 pmol, 2,0 µL de sonda a 5 pmol e 12,5 µL de 2x PCR *Buffer* (Life Technologies, Califórnia, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Os oligonucleotídeos e a sonda específicos foram desenhados e sintetizados para a detecção do gene da proteína VP23 do capsídeo dos HHV-6A e HHV-6B como descrito por Sassenscheidt e colaboradores (Sassenscheidt *et al.*, 2006). Este teste não permite a discriminação de HHV-6A e de HHV-6B em amostra clínica por ser um ensaio para HHV-6.

Além disso, para a construção da curva padrão deste teste foi utilizada curva sintética com título inicial de 10⁹ cópias/ml em diluição seriada (10¹-10⁹). No quadro 3.7 estão demonstradas as sequências dos iniciadores, da sonda e da curva padrão sintética utilizados nesta qPCR para detecção e quantificação do HHV-6. Este teste apresentou limite de detecção de 10¹ cópias/mL.

Quadro 3.7. Sequências dos iniciadores, sonda e curva padrão sintética utilizados na PCR em tempo real para detecção e quantificação do HHV-6 (HHV-6A e HHV-6B)

HHV-6	Sequência (5' - 3')
Iniciadores	senso - AAAGACCTAAATTGCCGCTACCT
	anti-senso - GCAAGTCATGAACATCGTCA
Sonda	VIC- TTAGATGGTGGTGAGCTGGGATCGGT-MGB
Curva padrão sintética	TTCGTGCAAGTCATGAACATCGTCACGTATACCGATCCCAGCTCACC
	ACCATCTAAATGCGTAGGTAGCGGCAATTTAGGTCTTTCTGATA
*Sonda MGB marcada com o fluoróforo VIC contendo <i>quencher</i> sem fluorescência.	

Posteriormente a solução foi homogeneizada no *vortex-Genie* (Scientific Industries, Inc., EUA) e sofreu uma pequena centrifugação de 30 segundos na centrífuga 5415R *Eppendorf* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Após isso, foi distribuído 20 µL/cavidade da mistura em duplicata em placas de 96 cavidades (Falcon®/Labware, Franklin Lakes, USA) e, em seguida, foi adicionado 5 µL do DNA viral/cavidade extraído anteriormente (item 3.5).

Em seguida, a placa contendo as amostras foi centrifugada por 30 segundos e submetida às condições de termociclagem no *7.500 System SDS Software* versão 1.2.1 (Applied Biosystems, Foster City, EUA) como evidenciado no quadro 3.8. Ao final dos ciclos

os resultados da quantificação foram analisados e expressos em números de cópias do DNA viral por mililitros de soro (cópias/mL).

Quadro 3.8. Termociclagem referente à PCR em tempo real para detecção e quantificação do HHV-6 (HHV-6A e HHV-6B)

Atividade	Temperatura	Tempo
Ativação da UNG*	50°C	2 minutos
Desnaturação e Ativação da enzima	95°C	10 minutos
Desnaturação	95°C	15 segundos
Hibridização e Extensão	60°C	1 minuto

} 40 ciclos

*UNG: Uracil-N-glicosilase

Em cada ensaio de qPCR, o DNA do HHV-6 isolado a partir de amostra clínica com concentração de 10^6 cópias/mL foi incluído como controle positivo. Amostras de água ultra pura e controles sem amostra (NTC/*no template control*) foram utilizadas como controles negativos.

3.8. Análise estatística dos resultados

Os dados obtidos referentes às variáveis analisadas e os resultados dos testes moleculares foram categorizados e armazenados em um banco de dados criado no *Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, EUA)*. Com base na análise estatística, foram utilizados o teste Qui-quadrado (χ^2 Yates ou para tendência) para comparar amostras independentes, teste *t Student* (não pareado) e ANOVA de fator único com pós-teste Bonferroni. Para análise estatística foi utilizado o programa *Statistical Package for the Social Science SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA)*. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1. Características da população de indivíduos HIV reagentes (Grupo teste)

Esta população foi composta por 241 indivíduos portadores do HIV do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle/HUGG referentes aos anos 2012, 2013 e 2014. Na tabela 4.1 pode-se observar a distribuição desses indivíduos por idade, sexo e taxas de linfócitos T CD4+ (LT CD4+) ao longo dos anos estudados.

Pode-se observar que a média de idade desses indivíduos infectados com HIV foi de $41,2 \pm 11,6$ anos. Além disso, houve variação desta média durante o período avaliado, ocorrendo, em 2013, um aumento considerado estatisticamente significativo (p -valor = 0,0176).

Com relação à distribuição por sexo, verificou-se que, em cada ano, houve ligeira predominância de indivíduos infectados pelo HIV do sexo masculino, que foi aumentando durante esses anos avaliados.

Já com relação à distribuição por taxa de linfócitos T CD4+, pode-se observar uma média total de $604,2 \pm 321,1$ dessas células/mm³ de sangue desses indivíduos HIV reagentes, além de uma pequena variação dessa média ao longo dos anos estudados, com aumento desta ocorrido no ano de 2014 ($681,2 \pm 327,5$ células/mm³). Ademais, houve predominância de indivíduos portadores do HIV com a contagem de LT-CD4+ ≥ 500 células/mm³ de sangue durante os anos avaliados e aumento da concentração desses indivíduos com a taxa de LT-CD4+ ≥ 500 células/mm³ no ano de 2014 comparados aos anos anteriores.

Tabela 4.1. Distribuição de indivíduos HIV reagentes por idade, sexo e taxas de linfócitos T CD4+ ao longo dos anos 2012-2014

	2012 (n = 95)	2013 (n = 89)	2014• (n = 57)	P-valor	Total: 2012-2014 (n = 241)
Idade (anos)				0,0176*	
Média \pm DP	39,0 \pm 11,3	43,8 \pm 11,0	40,8 \pm 12,4		41,2 \pm 11,6
Sexo, n (%)				0,9358**	
Masculino	49 (51,6)	46 (51,7)	31 (54,4)		126 (52,3)
Feminino	46 (48,4)	43 (48,3)	26 (45,6)		115 (47,7)
LT CD4+ (/mm³)				0,1164*	
Média \pm DP	580,8 \pm 299,89	579,9 \pm 334,63	681,2 \pm 327,5		604,2 \pm 321,1
LT CD4+, n (%)				0,0855**	
<500/mm ³	42 (44,2)	40 (44,9)	16 (28,1)		98 (40,7)
≥ 500 /mm ³	53 (55,8)	49 (55,1)	41 (71,9)		143 (59,3)

*ANOVA de fator único com pós-teste de Bonferroni (Idade-2012 vs Idade-2013).

**Teste Qui-quadrado para amostras independentes (em relação aos períodos estudados).

DP: desvio-padrão.

•Amostras coletadas até julho de 2014.

Esta população também foi agrupada por faixas etárias, variando de 10 a 69 anos de idade, como observado na tabela 4.2. Pode-se verificar que, dentre os anos estudados, a concentração de indivíduos HIV reagentes aumentou principalmente a partir da faixa etária de 20 a 29 anos, obtendo maiores concentrações desses indivíduos na faixa etária de 20 a 59 anos, diminuindo a partir desta. Além disso, a menor concentração desses indivíduos compreendeu a faixa etária de 10 a 19 anos. No gráfico 4.1 observam-se essas distribuições descritas.

Tabela 4.2. Distribuição de indivíduos HIV reagentes por faixa etária ao longo dos anos 2012-2014

Faixas Etárias	2012	2013	2014	Total: 2012-2014
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
10 - 19	2 (2,1%)	1 (1,1%)	0 (0,0%)	3 (1,2%)
20 - 29	21 (22,1%)	9 (10,1%)	13 (22,8%)	43 (17,8%)
30 - 39	26 (27,4%)	19 (21,3%)	13 (22,8%)	58 (24,0%)
40 - 49	30 (31,6%)	32 (36,0%)	17 (29,8%)	79 (33,0%)
50 - 59	12 (12,6%)	20 (22,5%)	10 (17,5%)	42 (17,4%)
60 - 69	4 (4,2%)	8 (9,0%)	4 (7,0%)	16 (6,6%)
Total	95 (100%)	89 (100%)	57 (100%)	241 (100%)

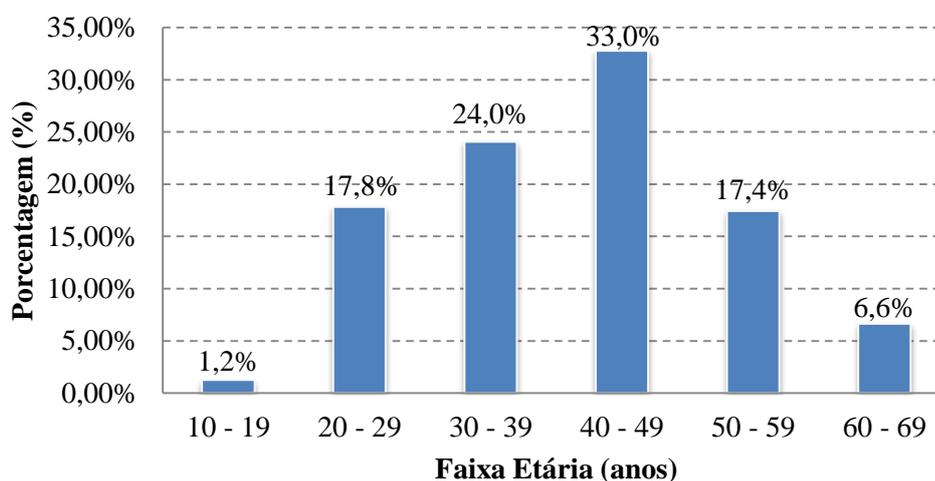


Gráfico 4.1. Gráfico indicando a distribuição de indivíduos HIV reagentes entre as faixas etárias de 10 a 69 anos de idade nos anos 2012-2014.

4.2. Teste de detecção de herpesvírus humanos por PCR *Nested* (*Pan-PCR*)

A detecção de herpesvírus humanos pela *Pan-PCR* foi demonstrada após eletroforese, como observado na figura 4.1. Nesta pode-se observar a amplificação da região DPOL do

HSV-1, HSV-2, EBV, HHV-6 (HHV-6A/HHV-6B) e HHV-8, com o padrão de bandas característico de herpesvírus na eletroforese (200 a 250 pares de bases).

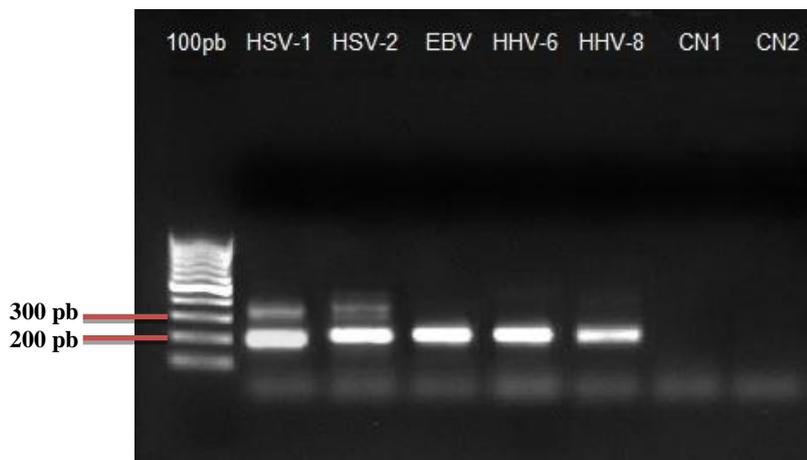


Figura 4.1. Resultado do teste de detecção de herpesvírus humanos por PCR *Nested* (*Pan-PCR*). Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da segunda etapa de amplificação da *Pan-PCR* com oligonucleotídeos para amplificar a região DPOL (160-181 pares de bases/pb – sem local de ligação dos oligonucleotídeos) dos herpesvírus. As amostras contendo HSV-1, HSV-2, EBV, HHV-6 (HHV-6A/HHV-6B) e HHV-8 estão indicadas, assim como os controles negativos da PCR (CN1) e da extração de DNA viral (CN2).

4.3. Limite de detecção da PCR *Nested* (*Pan-PCR*)

Foi avaliado o limite de detecção da *Pan-PCR* e após eletroforese foi encontrado um limite de detecção de 10^1 cópias/mL a 10^7 cópias/mL de acordo com o padrão de bandas característico de herpesvírus (200 a 250 pares de bases), como observado na figura 4.2.

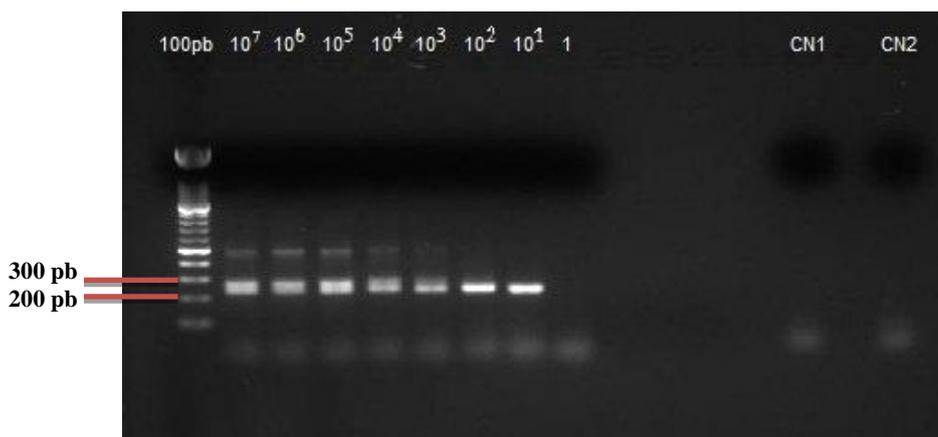


Figura 4.2. Resultado do limite de detecção da PCR *Nested* (*Pan-PCR*). Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da segunda etapa de amplificação da *Pan-PCR* com oligonucleotídeos para amplificar a região DPOL (160-181 pares de bases/pb – sem local de ligação dos oligonucleotídeos) dos herpesvírus. As amostras de diluição do HSV-1 de cultura celular estão indicadas conforme a sua diluição de 10^7 cópias/mL a 1 cópia/mL. CN1 (controle negativo da PCR), CN2 (controle negativo da extração de DNA viral).

4.4. Detecção de herpesvírus humanos em indivíduos HIV reagentes por *Pan-herpesvírus*

A detecção de herpesvírus humanos em 241 indivíduos HIV reagentes foi realizada através do *Pan-herpesvírus*: PCR *Nested* e sequenciamento do genoma viral, como observado na tabela 4.3. Verificou-se que, na PCR *Nested*, utilizando oligonucleotídeos para amplificar a região DPOL dos herpesvírus, 34 desses indivíduos, ou seja, 14,1% foram reagentes para algum dos herpesvírus humanos.

Além disso, foi encontrada uma prevalência da co-infecção HIV/HHV de 31,6% (30/95) no ano de 2012, 3,4% (3/89) no ano de 2013 e 1,8% (1/57) no ano de 2014, verificando, então, maior prevalência da co-infecção HIV/HHV no ano 2012, ocorrendo diminuição da prevalência dessa co-infecção ao longo dos anos estudados, sendo considerada estatisticamente significativa (p -valor < 0,0001).

Na mesma tabela, também é evidenciado a identificação da espécie de herpesvírus humanos, pelo sequenciamento do DNA viral, nos portadores do HIV que foram reagentes para algum herpesvírus na PCR *Nested*. Com isso, pode-se verificar a infecção por HSV-1, HHV-6 (HHV-6A/HHV-6B) e HHV-8 nestes indivíduos, sendo a co-infecção HIV/HSV-1 a mais prevalente (13,0%; 31/241).

Ademais, foi encontrada uma prevalência da co-infecção HIV/HSV-1 de 29,5% (28/95) no ano de 2012, 2,2% (2/89) no ano de 2013 e 1,8% (1/57) no ano de 2014, verificando, então, uma diminuição da prevalência dessa co-infecção no período avaliado. Sendo assim, a diminuição da prevalência da co-infecção HIV/HHV considerada estatisticamente significativa como analisado anteriormente (p -valor < 0,0001) foi devido à co-infecção HIV/HSV-1, sendo este herpesvírus humano responsável por este resultado.

No gráfico 4.2 observam-se esses resultados da detecção dos HHV em portadores do HIV descritos.

Tabela 4.3. Resultados da detecção de herpesvírus humanos por *Pan-herpesvírus* na população de indivíduos HIV reagentes (2012-2014)

	2012 (n = 95)		2013 (n = 89)		2014 (n = 57)	P-valor	Total: 2012-2014 (n = 241)		
HHV+, n (%)	30 (31,6)		3 (3,4)		1 (1,8)	< 0,0001*	34 (14,1)		
PCR <i>Nested</i>									
HHV+, n (%)	HSV-1	HHV-6	HSV-1	HHV-8	HSV-1		HSV-1	HHV-6	HHV-8
Sequenciamento	28 (29,5)	2 (2,1)	2 (2,2)	1 (1,1)	1 (1,8)	31 (13,0)	2 (0,8)	1 (0,4)	

*Teste Qui-quadrado para amostras independentes (em relação aos períodos estudados).

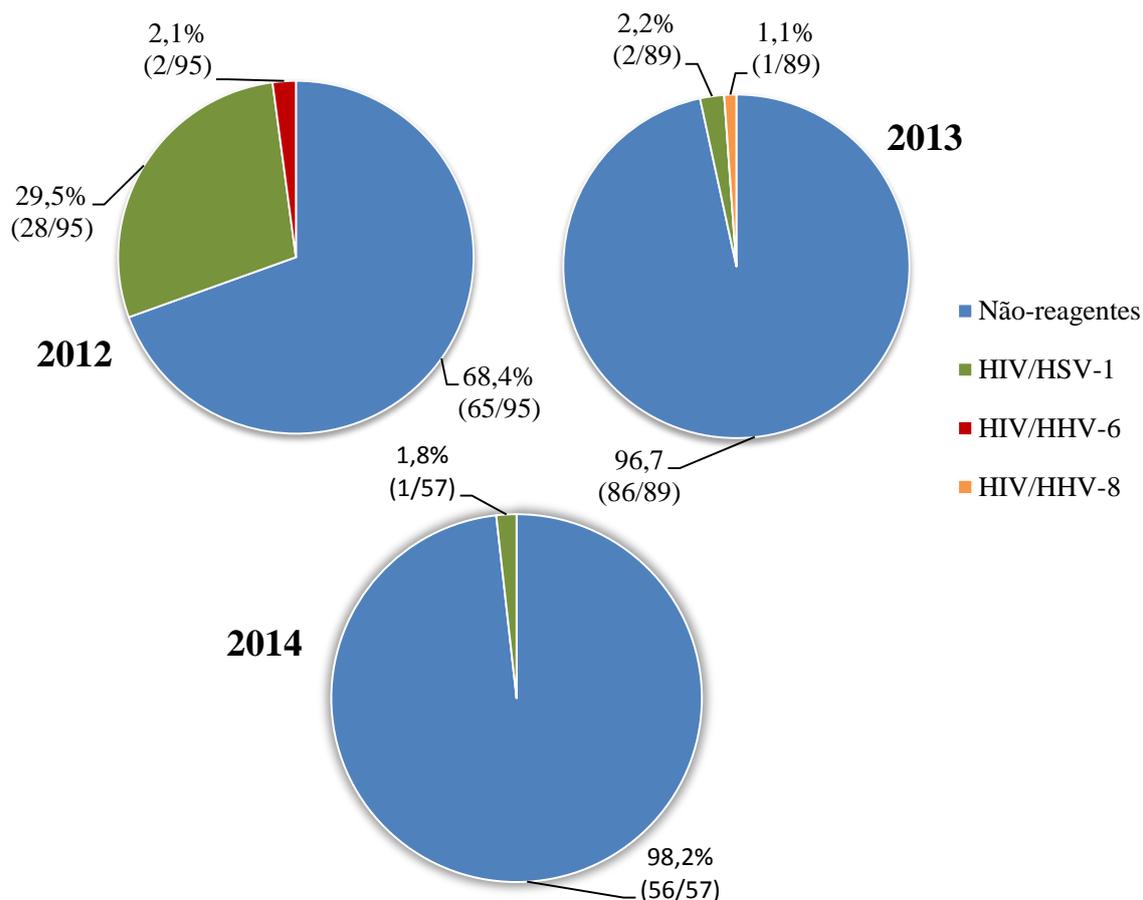


Gráfico 4.2. Gráfico indicando os resultados da detecção de herpesvírus humanos por *Pan*-herpesvírus na população de indivíduos portadores do HIV (2012-2014).

4.5. Comparação da detecção de herpesvírus humanos por *Pan*-herpesvírus entre os grupos controle (HIV não reagente) e teste (HIV reagente)

Neste trabalho foi realizada a comparação da detecção de herpesvírus humanos, por *Pan*-herpesvírus, entre 94 indivíduos não reagentes para HIV (grupo controle) e 241 indivíduos portadores do HIV (grupo teste) como evidenciado na tabela 4.4.

Sendo assim, o grupo controle, que contou com uma população com média de idade de $50,6 \pm 17,8$ anos, sendo ligeiramente composta por homens (52,1%; 49/94), obteve menor prevalência da infecção por HHV (1,1%; 1/94) comparada a prevalência da infecção por esses vírus encontrada em indivíduos portadores do HIV (14,1%; 34/241). Além disso, com a identificação da espécie de herpesvírus humanos pelo sequenciamento do genoma viral, verificou-se que os indivíduos do grupo teste apresentavam prevalência de infecção causada por diferentes HHV, incluindo infecções por HSV-1, HHV-6 (HHV-6A/HHV-6B) e HHV-8, comparado aos indivíduos do grupo controle, que apresentaram somente um indivíduo com infecção por HHV-6.

Tabela 4.4. Comparação da detecção de herpesvírus humanos por *Pan*-herpesvírus entre os grupos controle (HIV-) e teste (HIV+), e a distribuição desses indivíduos por idade e sexo

	Grupo controle (HIV-) (<i>n</i> = 94)	Grupo teste (HIV+) (<i>n</i> = 241)		
Idade (anos)				
Média ± DP	50,6 ± 17,8	41,2 ± 11,6		
Valor Mínimo	14	17		
Valor Máximo	86	69		
Sexo, <i>n</i> (%; IC95%)				
Masculino	49 (52,1; 41,7 – 62,4)	126 (52,3; 41,9 – 62,6)		
Feminino	45 (47,9; 37,5 – 58,2)	115 (47,7; 37,3 – 58,0)		
HHV+, <i>n</i> (%)				
PCR <i>Nested</i>	1 (1,1)	34 (14,1)		
HHV+, <i>n</i> (%)				
Sequenciamento	1 (1,1)	31 (13,0)	2 (0,8)	1 (0,4)

DP: desvio-padrão.

4.6. Associação da detecção da co-infecção HIV/HSV-1 com as variáveis idade, sexo e taxas de linfócito T CD4+

Pode-se verificar, na tabela 4.5, a associação da detecção do vírus herpes simples 1 (HSV-1) em indivíduos portadores do HIV com alguns fatores como idade, sexo e taxas de linfócito T CD4+ (LT CD4+). Foram excluídos os casos de HHV-6 (*n* = 2) e HHV-8 (*n* = 1), já que a co-infecção HIV/HSV-1 foi a mais prevalente nesses indivíduos como evidenciado anteriormente (tabela 4.3).

Com isso, pode-se observar que houve pouca variação da média e faixa-etária entre os indivíduos portadores do HIV reagentes para HSV-1 comparado aos que não eram reagentes para este vírus.

Com relação à associação da detecção da co-infecção HIV/HSV-1 com o sexo, verificou-se que a detecção desta co-infecção foi maior nos indivíduos do sexo masculino (64,5%; 20/31), porém este dado não foi considerado estatisticamente significativo.

Já com relação à associação da detecção da co-infecção HIV/HSV-1 com as taxas de linfócito T CD4+, pode-se observar que a média destas taxas foi menor nos indivíduos reagentes para HSV-1 (490,2 ± 299,2 células/mm³) comparado aos indivíduos não reagentes para este vírus (622,8 ± 323,4 células/mm³). Além disso, 61,3% (19/31) destes indivíduos com co-infecção HIV/HSV-1 apresentaram taxas de LT CD4+ <500 células/mm³ e 62,8% (130/207) dos indivíduos não reagente para HSV-1 apresentaram taxas de LT CD4+ ≥500

células/mm³. Ambos os dados foram considerados estatisticamente significativos (p -valor = 0,0327/ p -valor = 0,0186).

Tabela 4.5. Associação da detecção da co-infecção HIV/HSV-1 com as variáveis idade, sexo e taxas de linfócito T CD4+

	HIV+/HSV-1+ ($n = 31$)	HIV+/HSV-1- ($n = 207$)	<i>P</i> -valor
Idade (anos)			0,2302*
Média ± DP	39,0 ± 13,2	41,7 ± 11,4	
Valor Mínimo	17,0	17,0	
Valor Máximo	68,0	69,0	
Sexo , n (%; IC95%)			0,1643**
Masculino	20 (64,5; 54,5 – 71,8)	102 (49,3; 39,1 – 59,8)	
Feminino	11 (35,5; 25,5 – 45,4)	105 (50,7; 40,3 – 61,0)	
LT CD4+ (/mm ³)			0,0327*
Média ± DP	490,2 ± 299,2	622,8 ± 323,4	
Valor Mínimo	87,0	27,0	
Valor Máximo	1.269,0	1.786,0	
LT CD4+ , n (%; IC95%)			0,0186*
<500/mm ³	19 (61,3; 51,1 – 71,4)	77 (37,2; 27,1 – 47,2)	
≥500/mm ³	12 (38,7; 28,5 – 48,8)	130 (62,8; 52,7 – 72,8)	

*Teste *t* de Student (não pareado).

**Teste Qui-quadrado para amostras independentes.

DP: desvio-padrão.

4.7. Determinação da carga viral por PCR em tempo real dos indivíduos dos grupos controle (HIV-) e teste (HIV+) reagentes para herpesvírus humanos no *Pan*-herpesvírus

Neste estudo também foi determinada a carga viral, por PCR em tempo real (qPCR), dos indivíduos não reagentes para HIV (grupo controle) e dos indivíduos portadores do HIV (grupo teste) que foram reagentes para herpesvírus humanos no *Pan*-herpesvírus como evidenciado na tabela 4.6.

Assim, foi verificado uma variação de 10³ a 10⁴ cópias/mL nos indivíduos com infecção causada por HSV-1 e uma variação de 10⁵ a 10⁶ cópias/mL nos indivíduos com infecção causada por HHV-6 (HHV-6A/HHV-6B).

Entretanto, a qPCR específica para a detecção do HSV-1 somente detectou 13% (4/31) das amostras de soro que foram reagentes para este vírus. Não foi possível a determinação da carga viral de HHV-8 neste trabalho.

Tabela 4.6. Determinação da carga viral por PCR em tempo real dos indivíduos dos grupos controle (HIV-) e teste (HIV+) reagentes para herpesvírus humanos no *Pan*-herpesvírus

	Grupo controle (HIV-) (n = 94)		Grupo teste (HIV+) (n = 241)	
HHV+, n (%)	HHV-6	HSV-1	HHV-6	HHV-8
<i>Pan</i> -herpesvírus	1 (1,1)	31 (13,0)	2 (0,8)	1 (0,4)
HHV+, n (%)	HHV-6	HSV-1	HHV-6	
PCR em tempo real	1 (100)	4 (13,0)	2 (100)	*
Carga viral (cópias/mL)	10 ⁵	10 ³ 10 ⁴	10 ⁵ 10 ⁶	

* Teste não realizado.

5. DISCUSSÃO

Os quadros de infecção grave por herpesvírus humanos ocorrem principalmente em indivíduos imunocomprometidos, como portadores do HIV (Paludan *et al.*, 2011; White, Suzanne Beard e Barton, 2012). Entretanto, mesmo com estimativa de 734 mil pessoas vivendo com o HIV no Brasil no ano de 2013 (Unaid, 2015), existem poucos dados sobre a verdadeira prevalência das infecções causadas por herpesvírus nesses indivíduos, devido, principalmente, aos poucos estudos realizados no país.

Sendo assim, o presente trabalho visou colaborar para a determinação da prevalência da co-infecção HIV/herpesvírus humanos no Brasil a partir de um diagnóstico com detecção simultânea dos nove herpesvírus humanos (*Pan*-herpesvírus), que é baseado na amplificação, por PCR *Nested*, de uma região altamente conservada (DPOL) do genoma desses vírus e na identificação da espécie viral pelo sequenciamento do genoma viral, diminuindo, assim, o tempo desta detecção, além de ser uma técnica sensível e específica.

Antes de iniciar a investigação da prevalência da co-infecção HIV/herpesvírus humanos, foi realizada a análise das características destes indivíduos portadores do HIV com relação ao sexo, idade e taxas de linfócitos T CD4+. Assim, foi analisado o perfil destes indivíduos em relação ao sexo ao longo dos anos 2012 a 2014 e foi verificado que houve ligeira predominância e crescente aumento de indivíduos portadores do HIV do sexo masculino durante esse período avaliado. Este dado corrobora com o que foi avaliado pelo Ministério da Saúde, que informa em seu último boletim epidemiológico publicado avaliando a epidemia do HIV/AIDS até junho de 2014, que desde os anos 80, o Brasil obteve predominância de indivíduos masculinos portadores do HIV, com a razão de sexos tendo apresentado variações graduais ao longo do tempo. Entretanto, a partir de 2009, houve aumento nos casos de homens, atingindo em 2013, uma razão de sexos de 1,8 casos em homens para cada caso em mulheres (Ministério Da Saúde, 2014).

A explicação para a predominância de indivíduos HIV reagentes do sexo masculino pode estar relacionada com o fato de que, durante muitos anos no Brasil, a maior prevalência de infecções causadas pelo HIV era associada aos indivíduos homossexuais masculinos (Ministério Da Saúde, 2013). Entretanto, está ocorrendo crescente aumento de indivíduos infectados pelo HIV do sexo masculino, que pode ser esclarecido pelo fato de que, nos últimos anos no Brasil, foi observada tendência ao aumento a cerca de jovens de 15 a 24 anos do sexo masculino, de idosos com 60 anos ou mais deste sexo e de homens que fazem sexo com homens (HSH) infectados com o HIV, como informado pelo Ministério da Saúde (Ministério Da Saúde, 2014).

Além da análise com relação ao sexo, foi avaliado a distribuição dos indivíduos portadores do HIV por faixas etárias ao longo dos anos estudados, e, como se pôde observar com este estudo, houve maior concentração de indivíduos HIV reagentes, principalmente a partir da faixa etária de 20 a 29 anos, obtendo maiores concentrações na faixa etária de 20 a 59 anos, e apresentando uma redução a partir desta. Além disso, a menor concentração desses indivíduos compreendeu a faixa etária de 10 a 19 anos.

Estes dados reforçam as análises do Ministério da Saúde, que afirma que nos últimos anos (2012 a 2014) a maior predominância de indivíduos HIV reagentes foi observada entre aqueles com 20 a 59 anos, reduzindo a partir desta, sendo que a maior concentração desses indivíduos foi a partir dos 20 anos de idade. Além disso, a menor concentração de pessoas portadores do HIV também foi encontrada em crianças e adolescentes (10 a 19 anos) (Ministério Da Saúde, 2014).

Sendo assim, com relação à maior predominância de indivíduos HIV reagentes a partir dos 20 anos e à maior concentração desses indivíduos sendo encontrada entre 20 a 59 anos pode ser explicado pelo fato de que esta faixa etária compreende a população mais ativa sexualmente (Departamento De Dst.Aids E Hepatites Virais, 2013) .

Além disso, a menor concentração de indivíduos portadores do HIV entre crianças se deve aos programas de monitoramento da transmissão vertical do HIV no Brasil, que vêm ajudando a reduzir o número de infecção por este vírus nesta transmissão, além de ser uma população não ativa sexualmente (Ministério Da Saúde, 2014).

Com relação à menor concentração de indivíduos portadores do HIV entre os adolescentes, se deve ao fato dessa população estar iniciando suas atividades sexuais (Departamento De Dst.Aids E Hepatites Virais, 2013). Entretanto, nos últimos anos estes jovens estão apresentando tendência ao aumento de infecção por HIV (Ministério Da Saúde, 2014) devido ao fato da diminuição da prevenção nas relações sexuais por estes indivíduos. Isto ocorreu pela diminuição da conscientização da prevenção realizada pelas campanhas educativas fornecidas pelo governo e pela sociedade com o foco para esta população. A partir disto, atualmente o Ministério da Saúde vem focando suas campanhas de conscientização para os jovens, de acordo com o departamento de doenças sexualmente transmissíveis, AIDS e hepatites virais (Departamento De Dst.Aids E Hepatites Virais, 2015b).

Já com relação à redução da concentração de indivíduos HIV reagentes a partir dos 60 anos pode ser explicado pela diminuição da atividade sexual a partir desta idade comparada a de adultos. Entretanto, com o aumento da qualidade de vida ao longo dos anos, a atividade sexual desses indivíduos está aumentando e sem prevenção, de acordo com o departamento de doenças sexualmente transmissíveis, AIDS e hepatites virais (Departamento De Dst.Aids E

Hepatites Virais, 2003), apresentando, assim, aumento da concentração de indivíduos portadores do HIV entre os indivíduos com 60 anos ou mais (Ministério Da Saúde, 2014). A partir disto, nos últimos anos o Ministério da Saúde, além das campanhas de conscientização para os jovens, estão realizando campanhas para idosos, de acordo com o departamento de doenças sexualmente transmissíveis, AIDS e hepatites virais (Departamento De Dst.Aids E Hepatites Virais, 2008).

Além deste, esta redução da concentração de indivíduos reagentes para o HIV a partir dos 60 anos pode ser explicado pela menor expectativa de vida dos indivíduos portadores deste vírus comparados com a população geral. Entretanto, a expectativa de vida destes indivíduos cresceu ao longo dos anos por conta de mudanças políticas e melhorias implementadas nas diretrizes contra infecções causadas pelo HIV adotadas pelo governo brasileiro, como a política nacional brasileira de acesso livre ao tratamento antirretroviral (TARV), além das melhorias nos esquemas iniciais e subsequentes deste tratamento, que vêm contribuindo substancialmente para esse aumento da expectativa de vida desses indivíduos, passando há atingir 18,9 anos a mais em 2014 para quem faz uso do TARV (Departamento De Dst.Aids E Hepatites Virais, 2015c).

Ademais, esse aumento da concentração de pessoas portadores do HIV entre os indivíduos com 60 anos ou mais pode estar influenciando no aumento da média da idade dos indivíduos infectados por este vírus, como verificado neste trabalho, onde foi observado aumento, em 2013, da média da idade dos indivíduos infectados com HIV considerado estatisticamente significativo (p -valor = 0,0176).

Além da avaliação por sexo e por faixa etária, também foi analisado o perfil de linfócito T CD4+ (LT CD4+) destes indivíduos portadores do HIV durante o período 2012 a 2014. Sendo assim, foi constatada predominância de indivíduos HIV reagentes com a contagem de LT CD4+ ≥ 500 células/mm³ de sangue durante os anos avaliados, porém ocorrendo aumento da concentração destes indivíduos no ano de 2014 comparados aos anos anteriores.

Sendo assim, neste estudo 59,3% (143/241) dos participantes apresentaram a contagem de LT CD4+ ≥ 500 células/mm³ de sangue devido ao fato da provável adesão da maioria dos pacientes ao tratamento antirretroviral (TARV) contra o HIV, influenciando, assim, na supressão da replicação viral deste vírus nesses indivíduos e ocasionando o aumento e/ou estabilidade das taxas de LT CD4+ e a recuperação imune, sendo este tratamento, então, importante para a não progressão da doença, melhorando a qualidade e a expectativa de vida desses indivíduos portadores do HIV (Ministério Da Saúde, 2013). Esta possível adesão da maioria dos pacientes participantes do estudo pode também estar influenciando a média total

de LT CD4+ encontrada nestes indivíduos que foi de $604,2 \pm 321,1$ células/mm³, indicando que a infecção pelo HIV está sendo controlada.

Além disso, no Brasil, a partir de dezembro de 2013, passou a ser recomendado o início do TARV para indivíduos HIV reagentes independentemente da contagem de linfócitos T CD4+ como prevenção da transmissão deste vírus (Ministério Da Saúde, 2014). Sendo que anteriormente a isto, a recomendação para este tratamento era para indivíduos HIV reagentes com taxa de LT CD4+ <500 células/mm³ de sangue (Departamento De Dst.Aids E Hepatites Virais, 2012; Ministério Da Saúde, 2014).

Devido, então, a essa implementação para o início do TARV independentemente da contagem de LT CD4+, ocorreu, em 2014, um aumento de indivíduos portadores do HIV que iniciaram o TARV com a taxa de LT CD4+ ≥ 500 células/mm³ comparado aos anos anteriores (Ministério Da Saúde, 2014). Sendo assim, este fato pode estar relacionado com o aumento da concentração dos indivíduos portadores do HIV com contagem LT CD4+ ≥ 500 células/mm³ observado no ano de 2014 deste trabalho. Além disso, este fato também pode estar influenciando o aumento da média de LT CD4+ encontrado nos indivíduos HIV reagentes neste ano de 2014 ($681,2 \pm 327,5$ células/mm³) comparado aos anos anteriores (2012/2013).

Após análise das características destes indivíduos portadores do HIV, foi realizada a avaliação da detecção de herpesvírus humanos (HHV) pela PCR *Nested* (*Pan-PCR*), além da avaliação do limite de detecção deste teste. Sendo assim, foi demonstrado neste trabalho que a PCR *Nested* foi capaz de amplificar a região DPOL (200 a 250 pares de bases) dos herpesvírus humanos avaliados: HSV-1, HSV-2, EBV, HHV-6 (HHV-6A/HHV-6B) e HHV-8. Entretanto, neste estudo não foi possível avaliar a detecção dos demais HHV por este teste, como VZV, HCMV e HHV-7, devido a falta de amostras contendo estes vírus.

Porém, além de confirmar estes achados deste trabalho, a análise da detecção de herpesvírus por esta PCR *Nested* realizado por Ehlers e colaboradores (Ehlers *et al.*, 1999) constatou a detecção de VZV e HCMV, além dos herpesvírus humanos, como HSV-1, HSV-2, EBV e HHV-8, e de outros herpesvírus utilizando o mesmo conjunto de oligonucleotídeos degenerados contendo desoxi-inosina para amplificar a região DPOL destes vírus. Outro trabalho realizado por Paula e colaboradores (Paula *et al.*, 2014), que utilizou este teste como diagnóstico clínico, detectou HHV-6 em indivíduo imunocompetente com hepatite, confirmando pela primeira vez a detecção deste herpesvírus por esta técnica. Entretanto, em ambos os trabalhos não foi realizado a detecção de HHV-7, devido a falta de amostras contendo este herpesvírus.

A partir disto, apesar de ambos os trabalhos não evidenciarem esta detecção de HHV-7 por PCR *Nested*, estes estudos constataram a especificidade que este teste apresenta para detecção simultânea desses herpesvírus que infectam humanos.

Já com relação ao limite de detecção da PCR *Nested*, foi avaliada a menor concentração do DNA viral dos herpesvírus, em cópias/mL, que pode ser detectado sob as condições experimentais estabelecidas deste teste baseado no protocolo de Ehlers e colaboradores (Ehlers *et al.*, 2007), já que não foi avaliado anteriormente nessas condições, como consta na literatura. Sendo assim, como observado pelo limite de detecção encontrado, a menor concentração do alvo (região DPOL) sob as condições do protocolo deste método foi de 10^1 cópias de DNA viral/mL, sendo considerado, então, que este método descrito para a detecção de uma região altamente conservada de uma ampla variedade de genomas de herpesvírus possui boa sensibilidade, já que detecta uma carga viral baixa.

Posterior à análise da PCR *Nested* foi avaliada a prevalência da infecção de herpesvírus humanos em indivíduos HIV reagentes durante o período de 2012 a 2014 por *Pan*-herpesvírus. Sendo assim, de acordo com a detecção de HHV realizada pela PCR *Nested*, dentre as 241 amostras de soro analisadas, foi encontrada uma prevalência da co-infecção HIV/HHV de 14,1% (34/241), sendo que a maior prevalência observada ocorreu no ano 2012 com 31,6% (30/95) dos indivíduos portadores do HIV infectados com algum dos HHV. Ademais, a partir deste ano ocorreu diminuição da prevalência desta co-infecção ao longo dos anos estudados, sendo considerada estatisticamente significativa (p -valor $<0,0001$).

Após o sequenciamento do DNA viral, que identificou a espécie de herpesvírus humanos nos indivíduos portadores do HIV que foram reagentes para algum herpesvírus na PCR *Nested*, foi constatado que esta prevalência da co-infecção HIV/HHV encontrada está bastante relacionada à co-infecção HIV/HSV-1, já que esta foi a mais prevalente (13,0%; 31/241) nestes indivíduos HIV reagentes.

Ademais, esta co-infecção HIV/HSV-1 também está relacionado com a maior prevalência de herpesvírus humanos encontrada nos portadores do HIV no ano de 2012 e com a diminuição da prevalência desta co-infecção ao longo dos anos, pois foi verificado também maior prevalência da co-infecção HIV/HSV-1 no ano de 2012 (29,5%; 28/95), além da diminuição da prevalência desta co-infecção ao longo dos anos estudados. Sendo assim, a infecção por HSV-1 em indivíduos portadores do HIV neste período avaliado (2012-2014) influenciou na prevalência da co-infecção HIV/HHV encontrada neste trabalho, sendo também responsável pela análise estatisticamente significativa observada (p -valor $<0,0001$).

Além dessa, foi encontrada a co-infecção HIV/HHV-6 (HHV-6A/HHV-6B) e a co-infecção HIV/HHV-8, com 0,8% (2/241) e 0,4% (1/241) dos indivíduos portadores do HIV com infecção por estes herpesvírus humanos, respectivamente.

Com relação à prevalência da co-infecção HIV/HSV-1, pôde-se observar na literatura a variação da prevalência desta co-infecção entre os países, variando de 1,5% na África Subsaariana (Siddiqi *et al.*, 2014) e de 16% nos EUA (Miller *et al.*, 2006).

Ademais, no Brasil também foi constatada variação da prevalência desta co-infecção, variando de 3,8% a 51,1% nos estudos avaliados (Carvalho *et al.*, 2010; Pinheiro *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2013; Perse Da Silva *et al.*, 2015). Sendo assim, a prevalência da co-infecção HIV/HSV-1 de 13% (31/241) encontrada neste trabalho condiz com os achados sobre a detecção de HSV-1 em portadores do HIV no Brasil. Entretanto, mais estudos sobre esta investigação necessitam ser realizados para melhor compreensão da prevalência da co-infecção HIV/HSV-1.

Além do mais, nos últimos anos o Brasil realizou mudanças nas diretrizes terapêuticas contra o HIV. Com isso, em setembro de 2012 passou-se a recomendar o tratamento antirretroviral (TARV) para pessoas HIV reagentes com taxa de LT CD4+ <500 células/mm³ de sangue e, em dezembro de 2013, passou-se a propor o TARV independentemente da contagem de linfócitos T CD4+ (Departamento De Dst.Aids E Hepatites Virais, 2012; Ministério Da Saúde, 2013 ; 2014). Sendo assim, estas estratégias ocasionaram aumento de indivíduos portadores do HIV aderindo ao TARV com taxas de LT CD4+ <500 células/mm³ em 2013 e com LT CD4+ ≥500 células/mm³ em 2014 (Ministério Da Saúde, 2013 ; 2014)

Ademais, o uso do TARV pode acarretar no maior controle da replicação do HIV e consequente recuperação do sistema imune dos indivíduos infectados por este vírus (Ministério Da Saúde, 2013). Sendo assim, estas mudanças de diretrizes para o uso de TARV por indivíduos HIV reagentes realizadas no Brasil nos últimos anos pode estar relacionado com a diminuição da co-infecção HIV/HSV-1 a partir do ano de 2012 e com a consequente maior prevalência desta co-infecção encontrada neste ano com este trabalho. Isto porque nos anos 2013 e 2014 o Hospital Universitário Gaffrée e Guinle/HUGG, centro nacional de referência em AIDS, provavelmente passou a receber os indivíduos HIV reagentes com taxas de LT CD4+ maiores comparado aos indivíduos portadores deste vírus nos anos anteriores, como 2012, e somado ao uso de TARV que estes indivíduos passaram a aderir, possivelmente mantiveram, então, estas taxas de LT CD4+, acarretando no controle das infecções oportunistas pelo HSV-1.

Ademais, somado a estas novas diretrizes para o uso de TARV, a partir de 2013 o Hospital Universitário Gaffrée e Guinle/HUGG passou a receber os indivíduos HIV reagentes

de Centros de Testagem e Aconselhamento (CTA). Estes são serviços de saúde que realizam ações de diagnóstico e prevenção de doenças sexualmente transmissíveis, sendo responsáveis por encaminhar as pessoas reagentes para o HIV para tratamento nos serviços de referência (Departamento De Dst.Aids E Hepatites Virais, 2015a). Com isso, os indivíduos portadores do HIV encaminhados pelo CTA para o tratamento antirretroviral no HUGG detectaram a infecção por este vírus antes da progressão para a doença (AIDS). Sendo assim, este fato também pode estar associado com essa diminuição da co-infecção HIV/HSV-1 ao longo dos anos deste estudo, pois mais indivíduos com HIV sem AIDS fizeram parte dos pacientes para o TARV atendidos por este centro de referência.

Com relação à prevalência da co-infecção HIV/HHV-6 (HHV-6A/HHV-6B) foram identificados somente dois estudos na literatura que realizaram a detecção desta co-infecção, sendo que, em 1998, Kourí e colaboradores encontraram uma prevalência de 2% em Cuba (Kourí *et al.*, 1998), e em 2013, Pinheiro e colaboradores identificaram uma prevalência de 18% em crianças HIV reagentes no Rio de Janeiro/Brasil (Pinheiro *et al.*, 2013).

Ambos as prevalências da co-infecção HIV/HHV-6 encontradas na literatura diferem com a prevalência desta co-infecção identificada neste trabalho, onde 0,8% (2/241) dos indivíduos portadores do HIV estavam com infecção por este herpesvírus humano.

Portanto, pôde-se verificar que mais estudos de detecção de HHV-6 (HHV-6A/HHV-6B) em portadores do HIV necessitam ser realizados a fim de colaborar para a determinação da prevalência da co-infecção HIV/HHV-6.

Além disso, por haver até o presente momento poucas sequências do genoma dos herpesvírus humanos 6A e do 6B depositadas no *GenBank* devido a recente classificação de herpesvírus humano 6 em duas novas espécies virais realizada pelo ICTV em 2012 (Flamand *et al.*, 2010; Le, Gantt e Practice, 2013), não foi possível distinguir com precisão essas novas espécies, sendo necessário a diferenciação destes vírus através de PCR específica para HHV-6A e para HHV-6B, o que não foi possível neste trabalho.

Com relação à co-infecção HIV/HHV-8, a prevalência desta co-infecção variou de 0% a 57% nos estudos analisados (Polstra *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2010; Del Mistro *et al.*, 2012; Pinheiro *et al.*, 2013). Com isso, foi verificado que a prevalência da co-infecção HIV/HHV-8 foi maior em países como Holanda com 41% (Polstra *et al.*, 2003), Itália com 46% (Del Mistro *et al.*, 2012) e EUA com 57% (Miller *et al.*, 2006), comparado ao Brasil, que obteve a prevalência desta co-infecção variando entre 0% e 26% (Carvalho *et al.*, 2010; Pinheiro *et al.*, 2013).

Sendo assim, a prevalência da infecção por HHV-8 em portadores do HIV encontrada neste estudo (0,4%; 1/241) corrobora com os achados da literatura, que indicam que a

prevalência desta co-infecção é menor no Brasil comparado aos outros países. Entretanto, mais estudos sobre esta investigação necessitam serem realizados no Brasil para melhor compreensão da prevalência da co-infecção HIV/HHV-8.

Portanto, a partir dessas análises da prevalência de infecções causadas por herpesvírus humanos em indivíduos HIV reagentes, pôde-se verificar que estes estudos epidemiológicos são escassos no Brasil, precisando de maiores investigações sobre a prevalência da co-infecção HIV/HHV no país. Sendo assim, os resultados gerados neste trabalho colaboram para os dados na literatura contribuindo para a determinação da prevalência desta co-infecção no Brasil e no mundo.

Além disso, até o momento na literatura não existem trabalhos disponíveis sobre o uso do *Pan*-herpesvírus como ferramenta na avaliação simultânea da prevalência dos nove herpesvírus humanos, fazendo com que este trabalho seja o pioneiro na utilização desta metodologia em prol da análise epidemiológica destes herpesvírus.

Posterior a esta avaliação da detecção de herpesvírus humanos em indivíduos portadores do HIV por *Pan*-herpesvírus, foi realizada a análise da comparação da detecção de HHV entre o grupo teste (HIV reagentes) e o grupo controle (HIV não reagentes) deste trabalho.

Sendo assim, o grupo controle, que contou com uma população de 94 indivíduos não reagentes para o HIV, com média de idade de $50,6 \pm 17,8$ anos e sendo ligeiramente composta por homens (52,1%; 49/94), obteve menor prevalência da infecção por HHV (1,1%; 1/94), sendo esta referente à infecção causada por HHV-6 (HHV-6A/HHV-6B), comparada a prevalência da infecção por esses vírus encontrada em indivíduos portadores do HIV (14,1%; 34/241), referentes às infecções por HSV-1, HHV-6 e HHV-8.

Esta maior detecção de herpesvírus humanos em portadores do HIV comparada a menor detecção encontrada em indivíduos não reagentes para este vírus corroboram com os resultados encontrados em outros trabalhos da literatura, como o de Miller e colaboradores (2006), que observaram prevalência de EBV, HHV-8, HCMV e HSV-1 em indivíduos HIV reagentes de 90%, 57%, 31% e 16%, respectivamente, comparado com 48%, 24%, 2% e 2% em amostras do grupo controle (HIV não reagentes) (Miller *et al.*, 2006).

Esta maior prevalência em portadores do HIV pode ser explicado pelo fato destes indivíduos serem imunocomprometidos acarretando em menor controle de infecções e possuindo, assim, maiores probabilidades de primo-infecção, reativações e complicações causadas por herpesvírus (Paludan *et al.*, 2011; White, Suzanne Beard e Barton, 2012).

Ademais, o único indivíduo do grupo controle que foi reagente para herpesvírus humano provavelmente estava com imunidade reduzida, evidenciando que pessoas da

população geral HIV não reagentes podem apresentar primo-infecção e recidivas por HHV, porém a doença grave atribuível à infecção por estes vírus é rara em indivíduos imunocompetentes (White, Suzanne Beard e Barton, 2012).

Após a comparação da detecção de HHV entre o grupo teste (HIV reagentes) e o grupo controle (HIV não reagentes), foi realizado a avaliação da associação da detecção da co-infecção HIV/HSV-1 com as variáveis idade, sexo e taxas de linfócito T CD4+ (LT CD4+) visando avaliar possíveis fatores de risco da infecção por herpes simples 1 em indivíduos HIV reagentes. As co-infecções HIV/HHV-6 e HIV/HHV-8 foram excluídas desta análise, devido ao reduzido número de amostras com HHV-6 e HHV-8 que foram detectadas.

Assim, como houve pouca variação da média e faixa-etária entre os indivíduos portadores do HIV reagentes para HSV-1 comparado aos que não eram reagentes para este vírus, pôde-se observar que não houve associação estatística significativa entre a idade e a co-infecção HIV/HSV-1. Além disso, apesar de ter sido encontrada uma prevalência desta co-infecção maior nos indivíduos do sexo masculino (64,5%; 20/31), também não foi verificada associação estatística significativa da infecção por HSV-1 nestes indivíduos portadores do HIV com o sexo. Sendo assim, como analisado, não houve associação dessa co-infecção com os fatores idade e sexo, indicando que a infecção por HSV-1 em portadores do HIV independe dessas variáveis.

Contudo, após avaliar a associação da co-infecção HIV/HSV-1 com as taxas de LT CD4+, foi observado associação estatística significativa (p -valor = 0,0327/ p -valor = 0,0186) entres esses, pois indivíduos portadores do HIV reagentes para HSV-1 apresentaram menor média de LT CD4+ ($490,2 \pm 299,2$ células/mm³) comparado aos indivíduos não reagentes para este herpesvírus ($622,8 \pm 323,4$ células/mm³), além de que a maior porcentagem (61,3%; 19/31) destes indivíduos com infecção por HSV-1 apresentaram taxas de LT CD4+ <500 células/mm³ enquanto a maioria (62,8%; 130/207) dos portadores do HIV sem infecção para este herpesvírus apresentaram taxas de LT CD4+ ≥ 500 /mm³ de sangue.

Isto indica que os indivíduos HIV reagentes com taxas de linfócito T CD4+ <500 células/mm³ possuem maiores chances de infecções por HSV-1 confirmando as informações da literatura que informa que indivíduos imunocomprometidos possuem menor controle de infecções dispendo de maiores probabilidades de reativações e complicações causadas por herpesvírus humanos (Paludan *et al.*, 2011; White, Suzanne Beard e Barton, 2012).

Neste trabalho também foi realizada a detecção e quantificação de HSV-1 e HHV-6 (HHV-6A/HHV-6B), através da técnica de PCR em tempo real (qPCR), a fim de determinar a carga viral das amostras de soro de indivíduos de ambos os grupos que foram reagentes para

estes vírus no *Pan*-herpesvírus. Isto foi realizado com a finalidade de avaliar as infecções causadas por estes herpesvírus nestes indivíduos.

Sendo assim, foi verificada uma variação de 10^3 a 10^4 cópias/mL nos indivíduos com infecção causada por HSV-1 e uma variação de 10^5 a 10^6 cópias/mL nos indivíduos com infecção causada por HHV-6 (HHV-6A/HHV-6B). Entretanto, a qPCR específica para detecção de HSV-1 somente detectou 13% (4/31) das amostras de soro de indivíduos que foram reagentes para este vírus, enquanto a qPCR específica para detecção de HHV-6 detectou 100% (3/3) das amostras de soro de indivíduos que foram reagentes para este herpesvírus.

Assim, a partir destes resultados, foi verificado que a qPCR específica para a detecção e quantificação de HSV-1 apresentou menor sensibilidade na detecção deste vírus comparado ao *Pan*-herpesvírus, com apenas 4 amostras de soro de indivíduos reagentes para este herpesvírus sendo quantificada, sendo constatado nestes indivíduos alta carga viral produzida nas infecções causadas por HSV-1.

Além disso, foi observado que os indivíduos infectados com HHV-6 apresentaram carga viral alta, sendo a qPCR específica para a detecção e quantificação deste vírus foi muito sensível nesta detecção.

Contudo, por ser um ensaio consenso de HHV-6, este teste não permite a discriminação de HHV-6A e de HHV-6B sendo necessária a diferenciação da carga viral destes vírus através de qPCR específica para cada um destes herpesvírus.

Neste trabalho não foi realizado a determinação da carga viral de HHV-8, pois não foi possível a reprodução da qPCR para a detecção e quantificação deste vírus.

Por fim, pôde-se observar com este estudo que o *Pan*-herpesvírus utilizado para detecção simultânea dos nove herpesvírus que infectam humanos foi eficiente para a detecção das infecções causadas por estes vírus em indivíduos HIV reagentes e em indivíduos não reagentes para o HIV, evidenciando que este método pode contribuir para o diagnóstico e monitoramento de infecções causadas por herpesvírus, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Além disso, os resultados obtidos neste trabalho a partir deste método colaboraram para a determinação da prevalência da co-infecção HIV/HHV no Rio de Janeiro/Brasil.

6. CONCLUSÕES

- Os indivíduos portadores do HIV participantes deste estudo eram predominantemente do sexo masculino e apresentaram maiores concentrações na faixa etária de 20-59 anos;
- Neste estudo, se constatou a predominância de indivíduos HIV reagentes com contagem de linfócitos T CD4+ ≥ 500 células/mm³;
- O *Pan*-herpesvírus foi eficiente na detecção de infecções causadas pelos herpesvírus humanos em indivíduos HIV reagentes sendo eficaz no diagnóstico das co-infecções HIV/HSV-1, HIV/HHV-6 e HIV/HHV-8;
- A maior prevalência de infecções causadas por herpesvírus humanos em portadores do HIV foi referente ao HSV-1, se apresentando com moderada prevalência nestes indivíduos, enquanto foi encontrada baixa prevalência de infecções causadas por HHV-6 e por HHV-8 nestes indivíduos HIV reagentes deste trabalho;
- A prevalência de infecções causadas por HHV em indivíduos não reagentes para o HIV (grupo controle) foi baixa comparado ao grupo teste (HIV reagentes), além de ser referente somente à infecção causada por HHV-6;
- Neste estudo não houve associação da detecção da co-infecção HIV/HSV-1 com as variáveis sexo e idade, porém foi verificado a associação estatisticamente significativa da detecção desta co-infecção com as taxas de linfócitos T CD4+, evidenciando que a taxa LT CD4+ < 500 células/mm³ é um fator de risco para infecções causadas por HSV-1 em indivíduos portadores do HIV (p -valor =0,0327/ p -valor =0,0186);
- A PCR em tempo real para detecção de HSV-1 foi pouco sensível nesta detecção comparado ao *Pan*-herpesvírus, enquanto a qPCR para detecção de HHV-6 foi muito sensível na detecção deste herpesvírus;
- As infecções causadas por HSV-1 e HHV-6 em ambos os indivíduos do grupo teste (HIV reagentes) e controle (HIV não reagentes) apresentaram elevadas cargas virais;
- Os resultados deste estudo foram relevantes para determinar a prevalência das infecções causadas por herpesvírus humanos em indivíduos HIV reagentes no Rio de Janeiro/Brasil.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADJEI, A. A. et al. Seroprevalence of HHV-8, CMV, and EBV among the general population in Ghana, West Africa. **BMC Infect Dis**, v. 8, p. 111, 2008. ISSN 1471-2334. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18706107> >.

AEBI, C. et al. Age-specific seroprevalence to varicella-zoster virus: study in Swiss children and analysis of European data. **Vaccine**, v. 19, n. 23-24, p. 3097-103, Apr 2001. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11312004> >.

ALCÂNTARA, K. C. **Epidemiologia molecular do HIV-1, resistência aos antirretrovirais em gestantes e transmissão vertical no estado de Goiás**. 2011. 217 Instituto de Patologia e Medicina Tropical, Universidade Federal de Goiás/UFG, Goiás.

ALMEIDA, S. et al. Infecção congênita pelo Citomegalovirus – avaliação de um novo método de rastreio. **Acta Pediátrica Portuguesa**, v. 42, n. 5, p. 205-208, 2010.

ANZIVINO, E. et al. Herpes simplex virus infection in pregnancy and in neonate: status of art of epidemiology, diagnosis, therapy and prevention. **Virol J**, v. 6, p. 40, 2009. ISSN 1743-422X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19348670> >.

ARIZA-HEREDIA, E. J.; RAZONABLE, R. R. Human herpes virus 8 in solid organ transplantation. **Transplantation**, v. 92, n. 8, p. 837-44, Oct 2011. ISSN 1534-6080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21946171> >.

ARVIN, A. et al. **Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis**. first. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

ARVIN, A. M. Varicella-zoster virus. **Clin Microbiol Rev**, v. 9, n. 3, p. 361-81, Jul 1996. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8809466> >.

ARVIN, A. M.; GILDEN, D. Varicella-Zoster Virus. In: KNIPE, D. M. e HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. Sixth. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, v.2, 2013. p.2015-2057.

BARIN, F. [Viruses and unconventional transmissible agents: update on transmission via blood]. **Transfus Clin Biol**, v. 7 Suppl 1, p. 5s-10s, Jun 2000. ISSN 1246-7820. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10919217> >.

BARNABAS, R. V.; CELUM, C. Infectious co-factors in HIV-1 transmission herpes simplex virus type-2 and HIV-1: new insights and interventions. **Curr HIV Res**, v. 10, n. 3, p. 228-37, Apr 2012. ISSN 1873-4251. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22384842> >.

BEIGI, R. H. **Sexually transmitted diseases**. New York: WileyBlackwell, 2012.

BLAUVELT, A. Skin diseases associated with human herpesvirus 6, 7, and 8 infection. **J Investig Dermatol Symp Proc**, v. 6, n. 3, p. 197-202, Dec 2001. ISSN 1087-0024. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11924827> >.

BLAUVELT, A. et al. Human herpesvirus 8 infection occurs following adolescence in the United States. **J Infect Dis**, v. 176, n. 3, p. 771-4, Sep 1997. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9291330> >.

BOHLIUS, J. et al. Incidence and risk factors of HIV-related non-Hodgkin's lymphoma in the era of combination antiretroviral therapy: a European multicohort study. **Antivir Ther**, v. 14, n. 8, p. 1065-74, 2009. ISSN 2040-2058. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20032536> >.

BONANNI, P. et al. Varicella vaccination in Europe - taking the practical approach. **BMC Med**, v. 7, p. 26, 2009. ISSN 1741-7015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19476611> >.

BOSHOFF, C.; WEISS, R. AIDS-related malignancies. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 5, p. 373-82, May 2002. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12044013> >.

BRADY, R. C.; BERNSTEIN, D. I. Treatment of herpes simplex virus infections. **Antiviral Res**, v. 61, n. 2, p. 73-81, Feb 2004. ISSN 0166-3542. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14670580> >.

BRUMINHENT, J.; RAZONABLE, R. R. Management of cytomegalovirus infection and disease in liver transplant recipients. **World J Hepatol**, v. 6, n. 6, p. 370-83, Jun 2014. ISSN 1948-5182. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25018848> >.

BUSTIN, S. A.; MUELLER, R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. **Clin Sci (Lond)**, v. 109, n. 4, p. 365-79, Oct 2005. ISSN 0143-5221. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16171460> >.

CALDERWOOD, M. A. et al. Epstein-Barr virus and virus human protein interaction maps. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 18, p. 7606-11, May 2007. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17446270> >.

CANCER, I. C. O. H. A. Highly active antiretroviral therapy and incidence of cancer in human immunodeficiency virus-infected adults. **J Natl Cancer Inst**, v. 92, n. 22, p. 1823-30, Nov 2000. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11078759> >.

CAPELLO, D. et al. Molecular characterization of post-transplant lymphoproliferative disorders of donor origin occurring in liver transplant recipients. **J Pathol**, v. 218, n. 4, p. 478-86, Aug 2009. ISSN 1096-9896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19391128> >.

CARBONE, A. et al. HIV-associated lymphomas and gamma-herpesviruses. **Blood**, v. 113, n. 6, p. 1213-24, Feb 2009. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18955561> >.

CARR, D. J.; HÄRLE, P.; GEBHARDT, B. M. The immune response to ocular herpes simplex virus type 1 infection. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 226, n. 5, p. 353-66, May 2001. ISSN 1535-3702. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11393165> >.

CARVALHO, K. S. et al. PCR detection of multiple human herpesvirus DNA in saliva from HIV-infected individuals in Teresina, State of Piauí, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 6, p. 620-3, 2010 Nov-Dec 2010. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21181010> >.

CARVALHO, L. H. [Infectious mononucleosis]. **J Pediatr (Rio J)**, v. 75 Suppl 1, p. S115-25, Jul 1999. ISSN 1678-4782. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14685489> >.

CASERTA, M. T. et al. Primary human herpesvirus 7 infection: a comparison of human herpesvirus 7 and human herpesvirus 6 infections in children. **J Pediatr**, v. 133, n. 3, p. 386-9, Sep 1998. ISSN 0022-3476. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9738722> >.

CHAN, A. et al. Cytomegalovirus hepatitis and pancreatitis in the immunocompetent. **Ochsner J**, v. 14, n. 2, p. 295-9, 2014. ISSN 1524-5012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24940147> >.

CHANG, Y. et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. **Science**, v. 266, n. 5192, p. 1865-9, Dec 1994. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7997879> >.

CHAVES, S. S. et al. Loss of vaccine-induced immunity to varicella over time. **N Engl J Med**, v. 356, n. 11, p. 1121-9, Mar 2007. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17360990> >.

CHAYAVICHITSILP, P. et al. Herpes simplex. **Pediatr Rev**, v. 30, n. 4, p. 119-29; quiz 130, Apr 2009. ISSN 1526-3347. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19339385> >.

CHEN, K. T. et al. Genital herpes simplex virus infection and perinatal transmission of human immunodeficiency virus. **Obstet Gynecol**, v. 106, n. 6, p. 1341-8, Dec 2005. ISSN 0029-7844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16319261> >.

CHEN, M. R. Epstein-barr virus, the immune system, and associated diseases. **Front Microbiol**, v. 2, p. 5, 2011. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21687403> >.

CHENTOUFI, A. A. et al. Current trends in negative immuno-synergy between two sexually transmitted infectious viruses: HIV-1 and HSV-1/2. **Curr Trends Immunol**, v. 13, p. 51-68, 2012. ISSN 0972-4567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23355766> >.

_____. Towards a rational design of an asymptomatic clinical herpes vaccine: the old, the new, and the unknown. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, p. 187585, 2012. ISSN 1740-2530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22548113> >.

CISNEROS-HERREROS, J. M.; HERRERO-ROMERO, M. [Hepatitis due to herpes group viruses]. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 24, n. 6, p. 392-7; quiz 398, 2006 Jun-Jul 2006. ISSN 0213-005X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16792943> >.

CLEMENS, S. A. et al. [Seroepidemiology of Varicella in Brazil - results of a prospective cross-sectional study]. **J Pediatr (Rio J)**, v. 75, n. 6, p. 433-41, 1999 Nov-Dec 1999. ISSN 1678-4782. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14685498> >.

CLEMENS, S. A.; FARHAT, C. K. Seroprevalence of herpes simplex 1-2 antibodies in Brazil. **Rev Saude Publica**, v. 44, n. 4, p. 726-34, Aug 2010. ISSN 1518-8787. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20676563> >.

COEN, D. M. Antiviral drug resistance in herpes simplex virus. **Adv Exp Med Biol**, v. 394, p. 49-57, 1996. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8815709> >.

COHEN, J. I. et al. Epstein-Barr virus: an important vaccine target for cancer prevention. **Sci Transl Med**, v. 3, n. 107, p. 107fs7, Nov 2011. ISSN 1946-6242. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22049067> >.

CONE, R. W. et al. Human herpesvirus 6 in lung tissue from patients with pneumonitis after bone marrow transplantation. **N Engl J Med**, v. 329, n. 3, p. 156-61, Jul 1993. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8390614> >.

CONNOLLY, S. A. et al. Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 5, p. 369-81, May 2011. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21478902> >.

COREY, L. et al. The effects of herpes simplex virus-2 on HIV-1 acquisition and transmission: a review of two overlapping epidemics. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 35, n. 5, p. 435-45, Apr 2004. ISSN 1525-4135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15021308> >.

DAMANIA, B. A.; CESARMAN, E. Kaposi's Sarcoma - Associated Herpesvirus. In: KNIPE, D. M. e HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. Sixth. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, v.2, 2013. cap. 65, p.2080-2126.

DANVE-SZATANEK, C. et al. Surveillance network for herpes simplex virus resistance to antiviral drugs: 3-year follow-up. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 1, p. 242-9, Jan 2004. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14715760> >.

DASGUPTA, G. et al. New concepts in herpes simplex virus vaccine development: notes from the battlefield. **Expert Rev Vaccines**, v. 8, n. 8, p. 1023-35, Aug 2009. ISSN 1744-8395. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19627185> >.

DAVISON, A. J. et al. The order Herpesvirales. **Arch Virol**, v. 154, n. 1, p. 171-7, 2009. ISSN 1432-8798. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19066710> >.

DE BOLLE, L.; NAESENS, L.; DE CLERCQ, E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 1, p. 217-45, Jan 2005. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15653828> >.

DE FRANÇA, T. R. et al. Salivary shedding of HHV-8 in people infected or not by human immunodeficiency virus 1. **J Oral Pathol Med**, v. 40, n. 1, p. 97-102, Jan 2011. ISSN 1600-0714. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20969629> >.

DE FREITAS, R. B.; LINHARES, A. C. Prevalence of human herpesvirus 6 antibody in the population of Belém, Pará, northern Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 91, n. 5, p. 538-40, 1997 Sep-Oct 1997. ISSN 0035-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9463661> >.

DEL MISTRO, A. et al. Oral human papillomavirus and human herpesvirus-8 infections among human immunodeficiency virus type 1-infected men and women in Italy. **Sex Transm Dis**, v. 39, n. 11, p. 894-8, Nov 2012. ISSN 1537-4521. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23064540> >.

DEPARTAMENTO DE DST.AIDS E HEPATITES VIRAIS, M. D. S. Número de soropositivos cresce entre a terceira idade. <http://www.aids.gov.br/node/39570>, 2003. Acesso em: Agosto de 2015.

_____. Governo lança campanha de prevenção da aids na terceira idade. <http://www.aids.gov.br/galerias/2008/40623>, 2008. Acesso em: Agosto de 2015.

_____. Recomendações de terapia antirretroviral para adultos vivendo com HIV/aids no Brasil.

http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2012/52140/consenso_adulto2012_principais_mudancas_pdf_11946.pdf, 2012. Acesso em: Agosto de 2015.

_____. Programa Nacional de DST e AIDS. <http://aids.gov.br>, 2013. Acesso em: Novembro de 2013

_____. Centro de Testagem e Aconselhamento. http://www.aids.gov.br/tipo_endereco/centro-de-testagem-e-aconselhamento, 2015a. Acesso em: Novembro de 2015.

_____. ONU aponta Brasil como referência mundial no controle da Aids. <http://www.aids.gov.br/noticia/2015/onu-aponta-brasil-como-referencia-mundial-no-controle-da-aids>, 2015b. Acesso em: Agosto de 2015.

_____. Programa brasileiro de AIDS salva 9,2 milhões de anos de vida, afirma trabalho apresentado nos EUA. <http://www.aids.gov.br/noticia/2015/programa-brasileiro-de-aids-salva-92-milhoes-de-anos-de-vida-afirma-trabalho-apresentad>, 2015c. Acesso em: Novembro de 2015.

DESHMANE, S. L.; FRASER, N. W. During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. **J Virol**, v. 63, n. 2, p. 943-7, Feb 1989. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2536115> >.

DOLLARD, S. C.; GROSSE, S. D.; ROSS, D. S. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. **Rev Med Virol**, v. 17, n. 5, p. 355-63, 2007 Sep-Oct 2007. ISSN 1052-9276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17542052> >.

DOWD, J. B. et al. Seroprevalence of Epstein-Barr virus infection in U.S. children ages 6-19, 2003-2010. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64921, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23717674> >.

DROBYSKI, W. R. et al. Human herpesvirus-6 (HHV-6) infection in allogeneic bone marrow transplant recipients: evidence of a marrow-suppressive role for HHV-6 in vivo. **J Infect Dis**, v. 167, n. 3, p. 735-9, Mar 1993. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8382723> >.

EHLERS, B. et al. Detection of new DNA polymerase genes of known and potentially novel herpesviruses by PCR with degenerate and deoxyinosine-substituted primers. **Virus Genes**, v. 18, n. 3, p. 211-20, 1999. ISSN 0920-8569. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10456789> >.

_____. Identification of novel rodent herpesviruses, including the first gammaherpesvirus of *Mus musculus*. **J Virol**, v. 81, n. 15, p. 8091-100, Aug 2007. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17507487> >.

EPSTEIN, M. A.; ACHONG, B. G.; BARR, Y. M. VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. **Lancet**, v. 1, n. 7335, p. 702-3, Mar 1964. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14107961> >.

FIGUEIRA-SILVA, C. M.; PEREIRA, F. E. Prevalence of Epstein-Barr virus antibodies in healthy children and adolescents in Vitória, State of Espírito Santo, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 37, n. 5, p. 409-12, 2004 Sep-Oct 2004. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15361959> >.

FILIPOVICH, A. H. et al. Primary immunodeficiencies: genetic risk factors for lymphoma. **Cancer Res**, v. 52, n. 19 Suppl, p. 5465s-5467s, Oct 1992. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1327508> >.

FISMAN, D. N. et al. Projection of the future dimensions and costs of the genital herpes simplex type 2 epidemic in the United States. **Sex Transm Dis**, v. 29, n. 10, p. 608-22, Oct 2002. ISSN 0148-5717. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12370529> >.

FLAMAND, L. et al. Review, part 1: Human herpesvirus-6-basic biology, diagnostic testing, and antiviral efficacy. **J Med Virol**, v. 82, n. 9, p. 1560-8, Sep 2010. ISSN 1096-9071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20648610> >.

FOWLER, K. B.; PASS, R. F. Risk factors for congenital cytomegalovirus infection in the offspring of young women: exposure to young children and recent onset of sexual activity. **Pediatrics**, v. 118, n. 2, p. e286-92, Aug 2006. ISSN 1098-4275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16847076> >.

FREITAS, R. B. et al. Human herpesvirus-7 as a cause of exanthematous illnesses in Belém, Pará, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 46, n. 3, p. 139-43, 2004 May-Jun 2004. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15286816> >.

FRENKEL, N. et al. Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 2, p. 748-52, Jan 1990. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2153965> >.

GANEM, D. Kapsoi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. In: KNIPE, D. M. e HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. fifth. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, v.2, 2007. p.2847-2888.

_____. KSHV and the pathogenesis of Kaposi sarcoma: listening to human biology and medicine. **J Clin Invest**, v. 120, n. 4, p. 939-49, Apr 2010. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20364091> >.

GANTT, S.; CASPER, C. Human herpesvirus 8-associated neoplasms: the roles of viral replication and antiviral treatment. **Curr Opin Infect Dis**, v. 24, n. 4, p. 295-301, Aug 2011. ISSN 1473-6527. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21666458> >.

GIBELLINI, D. et al. Effects of human immunodeficiency virus on the erythrocyte and megakaryocyte lineages. **World J Virol**, v. 2, n. 2, p. 91-101, May 2013. ISSN 2220-3249. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24175233> >.

GILBERT, C.; BESTMAN-SMITH, J.; BOIVIN, G. Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. **Drug Resist Updat**, v. 5, n. 2, p. 88-114, Apr 2002. ISSN 1368-7646. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12135584> >.

GOEDERT, J. J. et al. Spectrum of AIDS-associated malignant disorders. **Lancet**, v. 351, n. 9119, p. 1833-9, Jun 1998. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9652666> >.

GRINDE, B. Herpesviruses: latency and reactivation - viral strategies and host response. **J Oral Microbiol**, v. 5, 2013. ISSN 2000-2297. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24167660> >.

GRYWALSKA, E. et al. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. **Postepy Hig Med Dosw (Online)**, v. 67, p. 481-90, 2013. ISSN 1732-2693. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23752600> >.

HADINOTO, V. et al. The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 7, p. e1000496, Jul 2009. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19578433> >.

HALL, C. B. et al. Human herpesvirus-6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. **N Engl J Med**, v. 331, n. 7, p. 432-8, Aug 1994. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8035839> >.

HAMBLETON, S.; GERSHON, A. A. Preventing varicella-zoster disease. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 1, p. 70-80, Jan 2005. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15653819> >.

HARGETT, D.; SHENK, T. E. Experimental human cytomegalovirus latency in CD14+ monocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 46, p. 20039-44, Nov 2010. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21041645> >.

HENGGE, U. R. et al. Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 1: epidemiology, environmental predispositions, clinical manifestations, and therapy. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 5, p. 281-292, 2002. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00263-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00263-3) >. Acesso em: 2015/10/11.

HENLE, G.; HENLE, W.; DIEHL, V. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-ypse virus to infectious mononucleosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 59, n. 1, p. 94-101, Jan 1968. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5242134> >.

HENLE, W. et al. Antibodies to Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma, other head and neck neoplasms, and control groups. **J Natl Cancer Inst**, v. 44, n. 1, p. 225-31, Jan 1970. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11515035> >.

HERAUD, S. L. et al. Frecuencia de infección por VIH en pacientes con episodio agudo de herpes zoster. **Rev Med Hered**, v. 16, n. 1, p. 19-25, 2005.

HILDESHEIM, A. Invited commentary: Epstein-Barr virus-based screening for the early detection of nasopharyngeal carcinoma: a new frontier. **Am J Epidemiol**, v. 177, n. 3, p. 251-3, Feb 2013. ISSN 1476-6256. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23255781> >.

HSU, J. L.; GLASER, S. L. Epstein-barr virus-associated malignancies: epidemiologic patterns and etiologic implications. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 34, n. 1, p. 27-53, Apr 2000. ISSN 1040-8428. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10781747> >.

ITZHAKI, R. F.; WOZNIAK, M. A. Herpes simplex virus type 1, apolipoprotein E, and cholesterol: a dangerous liaison in Alzheimer's disease and other disorders. **Prog Lipid Res**, v. 45, n. 1, p. 73-90, Jan 2006. ISSN 0163-7827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16406033> >.

JOHNSON, D. C.; BAINES, J. D. Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 5, p. 382-94, May 2011. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21494278> >.

KAPLAN, L. D. Human herpesvirus-8: Kaposi sarcoma, multicentric Castleman disease, and primary effusion lymphoma. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2013, p. 103-8, 2013. ISSN 1520-4383. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24319170> >.

KASPERSEN, M. D.; HÖLLSBERG, P. Seminal shedding of human herpesviruses. **Virol J**, v. 10, p. 226, 2013. ISSN 1743-422X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23834839> >.

KENNESON, A.; CANNON, M. J. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. **Rev Med Virol**, v. 17, n. 4, p. 253-76, 2007 Jul-Aug 2007. ISSN 1052-9276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17579921> >.

KIMBERLIN, D. Herpes simplex virus, meningitis and encephalitis in neonates. **Herpes**, v. 11 Suppl 2, p. 65A-76A, Jun 2004. ISSN 0969-7667. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15319092> >.

KIMBERLIN, D. W.; WHITLEY, R. J. Antiviral resistance: mechanisms, clinical significance, and future implications. **J Antimicrob Chemother**, v. 37, n. 3, p. 403-21, Mar 1996. ISSN 0305-7453. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9182098> >.

KLEIN, E.; KIS, L. L.; KLEIN, G. Epstein-Barr virus infection in humans: from harmless to life endangering virus-lymphocyte interactions. **Oncogene**, v. 26, n. 9, p. 1297-305, Feb 2007. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17322915> >.

KNIPE, D. M.; CLIFFE, A. Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 3, p. 211-21, Mar 2008. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18264117> >.

KNOX, K. K.; CARRIGAN, D. R. Disseminated active HHV-6 infections in patients with AIDS. **Lancet**, v. 343, n. 8897, p. 577-8, Mar 1994. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7906332> >.

KONDO, K.; XU, J.; MOCARSKI, E. S. Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocyte-macrophage progenitors in culture and in seropositive individuals. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 20, p. 11137-42, Oct 1996. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8855322> >.

KOURÍ, V. et al. [Herpesvirus detection in immunocompromised patients with meningoencephalitis by the polymerase chain reaction technic]. **Rev Cubana Med Trop**, v. 50, n. 3, p. 186-90, 1998. ISSN 0375-0760. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10349441> >.

LA FERLA, L. et al. Kaposi' s sarcoma in HIV-positive patients: the state of art in the HAART-era. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 17, n. 17, p. 2354-65, Sep 2013. ISSN 1128-3602. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24065230> >.

LANDAIS, I.; NELSON, J. A. Functional genomics approaches to understand cytomegalovirus replication, latency and pathogenesis. **Curr Opin Virol**, v. 3, n. 4, p. 408-15, Aug 2013. ISSN 1879-6265. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23816389> >.

LAUTENSCHLAGER, I.; RAZONABLE, R. R. Human herpesvirus-6 infections in kidney, liver, lung, and heart transplantation: review. **Transpl Int**, v. 25, n. 5, p. 493-502, May 2012. ISSN 1432-2277. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22356254> >.

LE, J.; GANTT, S.; PRACTICE, A. I. D. C. O. Human herpesvirus 6, 7 and 8 in solid organ transplantation. **Am J Transplant**, v. 13 Suppl 4, p. 128-37, Mar 2013. ISSN 1600-6143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23465006> >.

LEAO, J. C. et al. Intrahost genetic variability of human herpes virus-8. **J Med Virol**, v. 85, n. 4, p. 636-45, Apr 2013. ISSN 1096-9071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23417616> >.

LEBBÉ, C.; LEGENDRE, C.; FRANCÈS, C. Kaposi sarcoma in transplantation. **Transplant Rev (Orlando)**, v. 22, n. 4, p. 252-61, Oct 2008. ISSN 1557-9816. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18656341> >.

LEUNG, A. K.; SAUVE, R. S.; DAVIES, H. D. Congenital cytomegalovirus infection. **J Natl Med Assoc**, v. 95, n. 3, p. 213-8, Mar 2003. ISSN 1943-4693. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12749681> >.

LING, P. D. et al. The dynamics of herpesvirus and polyomavirus reactivation and shedding in healthy adults: a 14-month longitudinal study. **J Infect Dis**, v. 187, n. 10, p. 1571-80, May 2003. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12721937> >.

LINHARES, M. I. et al. Prevalence of cytomegalovirus antibodies in Brazilian and Japanese populations in the north-east of Brazil. **Microbiol Immunol**, v. 33, n. 11, p. 975-80, 1989. ISSN 0385-5600. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2556629> >.

_____. Seroprevalence of human herpesvirus 6 infection in Brazilian and Japanese populations in the north-east of Brazil. **Microbiol Immunol**, v. 35, n. 11, p. 1023-7, 1991. ISSN 0385-5600. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1663574> >.

LISCO, A. et al. Pregnancy and human herpesvirus 8 reactivation in human immunodeficiency virus type 1-infected women. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 11, p. 3863-71, Nov 2006. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16943357> >.

_____. Semen of HIV-1-infected individuals: local shedding of herpesviruses and reprogrammed cytokine network. **J Infect Dis**, v. 205, n. 1, p. 97-105, Jan 2012. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22107749> >.

LIU, F.; ZHOU, Z. H. Comparative virion structures of human herpesviruses. In: ARVIN, A.; CAMPADELLI-FIUME, G., et al (Ed.). **Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis**. first. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. cap. 3,

LONGNECKER, R. M.; KIEFF, E.; COHEN, J. I. Epstein-Barr Virus. In: KNIPE, D. M. e HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. Sixth. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, v.2, 2013. cap. 61, p.1898-1959.

LUCIA, M. B. et al. Exposure to HIV-protease inhibitors selects for increased expression of P-glycoprotein (ABCB1) in Kaposi's sarcoma cells. **Br J Cancer**, v. 105, n. 4, p. 513-22, Aug 2011. ISSN 1532-1827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21829205> >.

LUPI, O. Herpes Simples. **An Bras Dermatol**, v. 75, n. 3, p. 261-77, 2000.

LUPI, O.; PEREIRA JR, A. Herpes Simples. In: LUPI, O.; SILVA, A., *et al* (Ed.). **Herpes: Clínica, Diagnóstico e Tratamento**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000.

MACHADO, P. R. et al. Human herpesvirus 8 (HHV-8) detected by nested polymerase chain reaction (PCR) in HIV patients with or without Kaposi's sarcoma. An analytic cross-sectional study. **Sao Paulo Med J**, Apr 2015. ISSN 1806-9460. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25885486> >.

MAGALHÃES, I. E. M. et al. Detection of human herpesvirus 7 infection in young children presenting with exanthema subitum. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 371-3, May 2011. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21655829> >.

MARIN, M.; ZHANG, J. X.; SEWARD, J. F. Near elimination of varicella deaths in the US after implementation of the vaccination program. **Pediatrics**, v. 128, n. 2, p. 214-20, Aug 2011. ISSN 1098-4275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21788222> >.

MARTELLOTTA, F. et al. AIDS-related Kaposi's sarcoma: state of the art and therapeutic strategies. **Curr HIV Res**, v. 7, n. 6, p. 634-8, Nov 2009. ISSN 1873-4251. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19929800> >.

MARTINHO, A.; OLIVEIRA, A.; SILVA, C. **Herpesvírus humanos**. 2003. 49 Biologia, Universidade de Évora, Évora.

MAYAMA, S. et al. Prevalence and transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in Ugandan children and adolescents. **Int J Cancer**, v. 77, n. 6, p. 817-20, Sep 1998. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9714046> >.

MESRI, E. A.; CESARMAN, E.; BOSHOFF, C. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 10, p. 707-19, Oct 2010. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20865011> >.

MILLER, C. S. et al. High prevalence of multiple human herpesviruses in saliva from human immunodeficiency virus-infected persons in the era of highly active antiretroviral therapy. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 7, p. 2409-15, Jul 2006. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16825357> >.

MILNE, R. S. et al. Glycoprotein D receptor-dependent, low-pH-independent endocytic entry of herpes simplex virus type 1. **J Virol**, v. 79, n. 11, p. 6655-63, Jun 2005. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15890903> >.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico HIV. AIDS.** DEPARTAMENTO DE DST, A. E. H. V. Brasília: Ministério da Saúde 2013

_____. **Boletim epidemiológico HIV. AIDS.** DEPARTAMENTO DE DST, A. E. H. V. Brasília: Ministério da Saúde 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. Portal da Saúde. <http://portalsaude.saude.gov.br>, 2013. Acesso em: Novembro de 2013.

_____. Portal da Saúde. <http://portalsaude.saude.gov.br>, 2014. Acesso em: Setembro de 2014.

MOCARSKI, E.; SHENK, T.; PASS, R. Cytomegaloviruses. In: KNIPE, D. e HOWELY, P. (Ed.). **Fields Virology**. fifth. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, v.2, 2007. p.2847-2888.

MOCARSKI JUNIOR, E. S. et al. Cytomegaloviruses. In: KNIPE, D. M. e HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. Sixth. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, v.2, 2013. cap. 62, p.1960-2014.

MOFENSON, L. M. et al. Guidelines for the Prevention and Treatment of Opportunistic Infections among HIV-exposed and HIV-infected children: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America, the Pediatric Infectious Diseases Society, and the American Academy of Pediatrics. **MMWR Recomm Rep**, v. 58, n. RR-11, p. 1-166, Sep 2009. ISSN 1545-8601. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19730409> >.

MOORE, P. S. et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection prior to onset of Kaposi's sarcoma. **AIDS**, v. 10, n. 2, p. 175-80, Feb 1996. ISSN 0269-9370. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8838705> >.

MORFIN, F.; THOUVENOT, D. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. **J Clin Virol**, v. 26, n. 1, p. 29-37, Jan 2003. ISSN 1386-6532. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12589832> >.

MUNAWWAR, A.; SINGH, S. Human Herpesviruses as Copathogens of HIV Infection, Their Role in HIV Transmission, and Disease Progression. **J Lab Physicians**, v. 8, n. 1, p. 5-18, 2016 Jan-Jun 2016. ISSN 0974-2727. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27013807> >.

MUNKSGAARD, B. Other herpesviruses: HHV-6, HHV-7, HHV-8, HSV-1 and -2, VZV. **Am J Transplant**, v. 4 Suppl 10, p. 66-71, Nov 2004. ISSN 1600-6135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15504215> >.

MURRAY, P. G.; YOUNG, L. S. The Role of the Epstein-Barr virus in human disease. **Front Biosci**, v. 7, p. d519-40, Feb 2002. ISSN 1093-9946. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11815292> >.

NARDONE, A. et al. The comparative sero-epidemiology of varicella zoster virus in 11 countries in the European region. **Vaccine**, v. 25, n. 45, p. 7866-72, Nov 2007. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17919788> >.

NASCIMENTO, M. C. et al. Prevalence of, and risk factors for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection among blood donors in Brazil: a multi-center serosurvey. **J Med Virol**, v. 80, n. 7, p. 1202-10, Jul 2008. ISSN 0146-6615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18461622> >.

NICOLA, A. V.; MCEVOY, A. M.; STRAUS, S. E. Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. **J Virol**, v. 77, n. 9, p. 5324-32, May 2003. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12692234> >.

NYHOLM, J. L.; SCHLEISS, M. R. Prevention of maternal cytomegalovirus infection: current status and future prospects. **Int J Womens Health**, v. 2, p. 23-35, 2010. ISSN 1179-1411. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21072294> >.

OKUNO, T. et al. Seroepidemiology of human herpesvirus 6 infection in normal children and adults. **J Clin Microbiol**, v. 27, n. 4, p. 651-3, Apr 1989. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2542358> >.

OLIVAL, G. S. et al. Multiple sclerosis and herpesvirus interaction. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 71, n. 9B, p. 727-30, Sep 2013. ISSN 1678-4227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24141514> >.

OLIVEIRA, S. A. et al. Primary human herpesvirus-6 and -7 infections, often coinciding, misdiagnosed as measles in children from a tropical region of Brazil. **Epidemiol Infect**, v. 131, n. 2, p. 873-9, Oct 2003. ISSN 0950-2688. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14596528> >.

OSORIO, Y.; COHEN, J.; GHIASI, H. Improved protection from primary ocular HSV-1 infection and establishment of latency using multigenic DNA vaccines. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 45, n. 2, p. 506-14, Feb 2004. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744892> >.

PAGANO, J. S. Is Epstein-Barr virus transmitted sexually? **J Infect Dis**, v. 195, n. 4, p. 469-70, Feb 2007. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17230404> >.

PALUDAN, S. R. et al. Recognition of herpesviruses by the innate immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 2, p. 143-54, Feb 2011. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21267015> >.

PAPALOUKAS, O.; GIANNOULI, G.; PAPAEVANGELOU, V. Successes and challenges in varicella vaccine. **Ther Adv Vaccines**, v. 2, n. 2, p. 39-55, Mar 2014. ISSN 2051-0136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24757524> >.

PAULA, V. S. et al. Acute liver failure in an immunocompetent patient. **J Clin Virol**, v. 60, n. 1, p. 1-3, May 2014. ISSN 1873-5967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24704110> >.

PELLET, P. E.; ROIZMAN, B. *Herpesviridae* In: LIPPINCORT, W. W. (Ed.). **Fields Virology**. Sixth. Philadelphia, v.2, 2013. cap. 59, p.1802 - 1822.

PENELLO, A. M. et al. Herpes genital. **J bras Doenças Sex Transm**, v. 22, n. 2, p. 64-72, 2010.

PERNG, G. C.; JONES, C. Towards an understanding of the herpes simplex virus type 1 latency-reactivation cycle. **Interdiscip Perspect Infect Dis**, v. 2010, p. 262415, 2010. ISSN 1687-7098. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20169002> >.

PERSE DA SILVA, A. et al. Genotypic Characterization of Herpes Simplex Virus Type 1 Isolates in Immunocompromised Patients in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0136825, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26407292> >.

PETRARA, M. R. et al. Epstein-Barr virus-driven lymphomagenesis in the context of human immunodeficiency virus type 1 infection. **Front Microbiol**, v. 4, p. 311, 2013. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24151490> >.

PIETROSI, G. et al. Primary and reactivated HHV8 infection and disease after liver transplantation: a prospective study. **Am J Transplant**, v. 11, n. 12, p. 2715-23, Dec 2011. ISSN 1600-6143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21966899> >.

PINHEIRO, R. O. S. et al. Current status of herpesvirus identification in the oral cavity of HIV-infected children. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 46, n. 1, p. 15-9, 2013 Jan-Feb 2013. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23563819> >.

PLOTKIN, S. A.; ARBETTER, A. A.; STARR, S. E. The future of varicella vaccine. **Postgrad Med J**, v. 61 Suppl 4, p. 155-62, 1985. ISSN 0032-5473. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3014474> >.

POLSTRA, A. M. et al. Human herpesvirus 8 load in matched serum and plasma samples of patients with AIDS-associated Kaposi's sarcoma. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 12, p. 5488-91, Dec 2003. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14662929> >.

PREFEITURA DO RIO DE JANEIRO, R. Portal da prefeitura da cidade do Rio de Janeiro. http://www.rio.rj.gov.br/dlstatic/10112/4860791/4125704/calendariodevacinacao_crianca_2014AGOSTO.pdf acesso 15.09.2014, 2014. Acesso em: Agosto de 2014.

PRUKSANANONDA, P. et al. Primary human herpesvirus 6 infection in young children. **N Engl J Med**, v. 326, n. 22, p. 1445-50, May 1992. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1315416> >.

RAFAILIDIS, P. I. et al. Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review. **Virol J**, v. 5, p. 47, 2008. ISSN 1743-422X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18371229> >.

RAZONABLE, R. R.; EMERY, V. C.; FORUM), T. A. M. O. T. I. I. H. M. Management of CMV infection and disease in transplant patients. 27-29 February 2004. **Herpes**, v. 11, n. 3, p. 77-86, Dec 2004. ISSN 0969-7667. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15960905> >.

RAZONABLE, R. R.; PAYA, C. V. The impact of human herpesvirus-6 and -7 infection on the outcome of liver transplantation. **Liver Transpl**, v. 8, n. 8, p. 651-8, Aug 2002. ISSN 1527-6465. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12149755> >.

_____. Herpesvirus infections in transplant recipients: current challenges in the clinical management of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infections. **Herpes**, v. 10, n. 3, p. 60-5, Dec 2003. ISSN 0969-7667. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14759337> >.

REVELLO, M. G.; GERNA, G. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, n. 4, p. 680-715, Oct 2002. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12364375> >.

RICKINSON, A.; KIEFF, E. Epstein-Barr Virus. In: KNIPE, D. M. e HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. fifth. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, v.2, 2007. p.2655-2700.

ROIZMAN, B. et al. Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Intervirol**, v. 16, n. 4, p. 201-17, 1981. ISSN 0300-5526. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7343541> >.

ROIZMAN, B.; KNIPE, D. M.; WHITLEY, R. J. Herpes Simplex Viruses. In: KNIPE, D. M. e HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. fifth. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, v.2, 2007. p.2502-2601.

_____. Herpes Simplex Viruses. In: KNIPE, D. M. e HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. Sixth. Philadelphia Lippincott, Williams & Wilkins, v.2, 2013. cap. 60, p.1823-1897.

ROIZMAN, B.; WHITLEY, R. J. The nine ages of herpes simplex virus. **Herpes**, v. 8, n. 1, p. 23-7, Mar 2001. ISSN 0969-7667. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11867013> >.

RUBBO, P. A. et al. HIV-1 infection impairs HSV-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell response by reducing Th1 cytokines and CCR5 ligand secretion. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 58, n. 1, p. 9-17, Sep 2011. ISSN 1944-7884. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21646911> >.

SALAHUDDIN, S. Z. et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. **Science**, v. 234, n. 4776, p. 596-601, Oct 1986. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2876520> >.

SANTOS, J. S.; BECK, S. T. Coinfecção tuberculose e HIV: um importante desafio - Artigo de revisão. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 41, n. 3, p. 209-215, 2009.

SASSENSCHEIDT, J. et al. Detection of beta-herpesviruses in allogenic stem cell recipients by quantitative real-time PCR. **J Virol Methods**, v. 138, n. 1-2, p. 40-8, Dec 2006. ISSN 0166-0934. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16956672> >.

SCHIFFER, J. T.; COREY, L. Rapid host immune response and viral dynamics in herpes simplex virus-2 infection. **Nat Med**, v. 19, n. 3, p. 280-90, Mar 2013. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23467247> >.

SCHILLER, J. T.; LOWY, D. R. Vaccines to prevent infections by oncoviruses. **Annu Rev Microbiol**, v. 64, p. 23-41, 2010. ISSN 1545-3251. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20420520> >.

SCHIRMER, E. C. et al. Differentiation between two distinct classes of viruses now classified as human herpesvirus 6. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 13, p. 5922-6, Jul 1991. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1648234> >.

SCHLEISS, M. R. Acquisition of human cytomegalovirus infection in infants via breast milk: natural immunization or cause for concern? **Rev Med Virol**, v. 16, n. 2, p. 73-82, 2006 Mar-Apr 2006. ISSN 1052-9276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16287195> >.

SCHMUTZHARD, J. et al. 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**, v. 29, n. 2, p. 120-6, Feb 2004. ISSN 1386-6532. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14747031> >.

SEDÝ, J. R.; SPEAR, P. G.; WARE, C. F. Cross-regulation between herpesviruses and the TNF superfamily members. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 11, p. 861-73, Nov 2008. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18949019> >.

SENGUPTA, N. et al. Varicella vaccination in Europe: are we ready for a universal childhood programme? **Eur J Pediatr**, v. 167, n. 1, p. 47-55, Jan 2008. ISSN 1432-1076. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17334784> >.

SERNA-HIGUERA, C. et al. Acute cholestatic hepatitis by cytomegalovirus in an immunocompetent patient resolved with ganciclovir. **J Clin Gastroenterol**, v. 29, n. 3, p. 276-7, Oct 1999. ISSN 0192-0790. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10509956> >.

SIDDIQI, O. K. et al. Molecular diagnosis of central nervous system opportunistic infections in HIV-infected Zambian adults. **Clin Infect Dis**, v. 58, n. 12, p. 1771-7, Jun 2014. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24668125> >.

SIMARD, E. P.; PFEIFFER, R. M.; ENGELS, E. A. Cumulative incidence of cancer among individuals with acquired immunodeficiency syndrome in the United States. **Cancer**, v. 117, n. 5, p. 1089-96, Mar 2011. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20960504> >.

SOUZA, M. A. et al. Seroprevalence of cytomegalovirus antibodies in blood donors in southern, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 4, p. 359-61, 2010 Jul-Aug 2010. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20802930> >.

SOUZA, R. P. et al. Simultaneous detection of seven sexually transmitted agents in human immunodeficiency virus-infected Brazilian women by multiplex polymerase chain reaction. **Am J Trop Med Hyg**, v. 89, n. 6, p. 1199-202, Dec 2013. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24080632> >.

STARAS, S. A. et al. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. **Clin Infect Dis**, v. 43, n. 9, p. 1143-51, Nov 2006. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17029132> >.

SULIGOI, B. et al. Effect of multiple herpesvirus infections on the progression of HIV disease in a cohort of HIV seroconverters. **J Med Virol**, v. 69, n. 2, p. 182-7, Feb 2003. ISSN 0146-6615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12683405> >.

SUNG, H.; SCHLEISS, M. R. Update on the current status of cytomegalovirus vaccines. **Expert Rev Vaccines**, v. 9, n. 11, p. 1303-14, Nov 2010. ISSN 1744-8395. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21087108> >.

SWANSON, E. C.; SCHLEISS, M. R. Congenital cytomegalovirus infection: new prospects for prevention and therapy. **Pediatr Clin North Am**, v. 60, n. 2, p. 335-49, Apr 2013. ISSN 1557-8240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23481104> >.

TAIT, D. R. et al. Exanthem subitum (roseola infantum) misdiagnosed as measles or rubella [corrected]. **BMJ**, v. 312, n. 7023, p. 101-2, Jan 1996. ISSN 0959-8138. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8555893> >.

TAKAHASHI, M. et al. Clinical experience with Oka live varicella vaccine in Japan. **Postgrad Med J**, v. 61 Suppl 4, p. 61-7, 1985. ISSN 0032-5473. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3014479> >.

TEDESCHI, R. et al. Viral load of human herpesvirus 8 in peripheral blood of human immunodeficiency virus-infected patients with Kaposi's sarcoma. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 12, p. 4269-73, Dec 2001. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11724831> >.

THOMAS, J. A. et al. HHV8 DNA in normal gastrointestinal mucosa from HIV seropositive people. **Lancet**, v. 347, n. 9011, p. 1337-8, May 1996. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8622537> >.

THOMAS, R. et al. Evidence of shared Epstein-Barr viral isolates between sexual partners, and low level EBV in genital secretions. **J Med Virol**, v. 78, n. 9, p. 1204-9, Sep 2006. ISSN 0146-6615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16847960> >.

THOMPSON, M. P.; KURZROCK, R. Epstein-Barr virus and cancer. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 3, p. 803-21, Feb 2004. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14871955> >.

TRONSTEIN, E. et al. Genital shedding of herpes simplex virus among symptomatic and asymptomatic persons with HSV-2 infection. **JAMA**, v. 305, n. 14, p. 1441-9, Apr 2011. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21486977> >.

TZAVELLA, K. et al. Portal hypertension caused by acute cytomegalovirus infection with liver involvement in an immunocompetent patient. **Scand J Infect Dis**, v. 39, n. 2, p. 177-8, 2007. ISSN 0036-5548. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17366040> >.

ULDRICK, T. S.; WHITBY, D. Update on KSHV epidemiology, Kaposi Sarcoma pathogenesis, and treatment of Kaposi Sarcoma. **Cancer Lett**, v. 305, n. 2, p. 150-62, Jun 2011. ISSN 1872-7980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21377267> >.

UNAIDS, B. Brasil avança no cumprimento da meta 90-90-90. http://www.unaids.org.br/midia/press_releases.asp, 2015. Acesso em: Agosto de 2015.

VANDEVANTER, D. R. et al. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 7, p. 1666-71, Jul 1996. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8784566> >.

VARELLA, R. et al. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus herpes simples (HSV) em pacientes transplantados e não-transplantados. **J Bras Patol Med Lab**, v. 41, 2005.

VIRGIN, H. W.; SPECK, S. H. Unraveling immunity to gamma-herpesviruses: a new model for understanding the role of immunity in chronic virus infection. **Curr Opin Immunol**, v. 11, n. 4, p. 371-9, Aug 1999. ISSN 0952-7915. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10448140> >.

WEIDMANN, M.; ARMBRUSTER, K.; HUFERT, F. T. 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**, v. 42, n. 4, p. 326-34, Aug 2008. ISSN 1386-6532. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18439871> >.

WHITBY, D. et al. Detection of Kaposi sarcoma associated herpesvirus in peripheral blood of HIV-infected individuals and progression to Kaposi's sarcoma. **Lancet**, v. 346, n. 8978, p. 799-802, Sep 1995. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7674745> >.

WHITE, D. W.; SUZANNE BEARD, R.; BARTON, E. S. Immune modulation during latent herpesvirus infection. **Immunol Rev**, v. 245, n. 1, p. 189-208, Jan 2012. ISSN 1600-065X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22168421> >.

WHITLEY, R. J. Herpes simplex virus infection. **Semin Pediatr Infect Dis**, v. 13, n. 1, p. 6-11, Jan 2002. ISSN 1045-1870. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12118847> >.

WHO. Diagnosis of human herpesviruses: memorandum from a WHO meeting. **Bull World Health Organ**, v. 69, n. 3, p. 277-83, 1991. ISSN 0042-9686. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1654224> >.

_____. Varicella vaccines. WHO position paper. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 73, n. 32, p. 241-8, Aug 1998. ISSN 0049-8114. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9715106> >.

WREGHITT, T. G. et al. Cytomegalovirus infection in immunocompetent patients. **Clin Infect Dis**, v. 37, n. 12, p. 1603-6, Dec 2003. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14689339> >.

WYATT, L. S. et al. Human herpesvirus 7: antigenic properties and prevalence in children and adults. **J Virol**, v. 65, n. 11, p. 6260-5, Nov 1991. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1656093> >.

YAMANISHI, K.; MORI, Y.; PELLETT, P. E. Human Herpesviruses 6 and 7. In: KNIPE, D. M. e HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. Sixth. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, v.2, 2013. cap. 64, p.2058-2079.

YAWN, B. P.; GILDEN, D. The global epidemiology of herpes zoster. **Neurology**, v. 81, n. 10, p. 928-30, Sep 2013. ISSN 1526-632X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23999562> >.

YOSHIDA, M. et al. Comparison of antiviral compounds against human herpesvirus 6 and 7. **Antiviral Res**, v. 40, n. 1-2, p. 73-84, Dec 1998. ISSN 0166-3542. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9864048> >.

ZERBONI, L. et al. Molecular mechanisms of varicella zoster virus pathogenesis. **Nat Rev Microbiol**, v. 12, n. 3, p. 197-210, Mar 2014. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24509782> >.

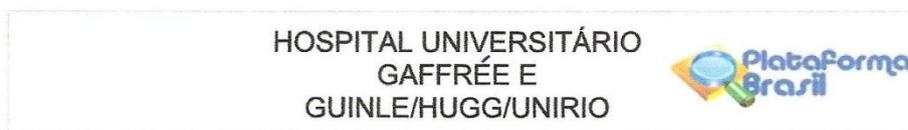
ZERR, D. M. et al. A population-based study of primary human herpesvirus 6 infection. **N Engl J Med**, v. 352, n. 8, p. 768-76, Feb 2005. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15728809> >.

ZIEMANN, M.; HENNIG, H. Prevention of Transfusion-Transmitted Cytomegalovirus Infections: Which is the Optimal Strategy? **Transfus Med Hemother**, v. 41, n. 1, p. 40-4, Feb 2014. ISSN 1660-3796. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24659946> >.

ZOLINI, G. P. P. **Ativação da resposta imune inata mediada por receptores do tipo toll na infecção com vírus herpes simplex tipo 1 (hsv-1) em modelo murinho**. 2012. 129 (Doutorado em Ciências). Biologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, Belo Horizonte.

8. ANEXOS

8.1 Anexo 1: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos



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
GAFFRÉE 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