

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Programa de Pós-Graduação Medicina Tropical

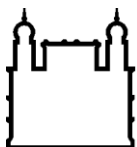
Doutorado em Medicina Tropical

Perfil epidemiológico do *Herpes simplex* no grupo de homens que fazem sexo com homens e avaliação do RNA de interferência como agente antiviral na encefalite herpética em camundongos BALB/c

Alexandre dos Santos da Silva

Rio de Janeiro

Outubro de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

ALEXANDRE DOS SANTOS DA SILVA

Perfil epidemiológico do Herpes simplex no grupo de homens que fazem sexo com homens e avaliação do RNA de interferência como agente antiviral na encefalite herpética em camundongos BALB/c

Tese apresentada à coordenação do programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz para obtenção do título de Doutor em Ciências na área de concentração: Virologia

Orientadora: Dra. Vanessa Salete de Paula

RIO DE JANEIRO

Outubro de 2015

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

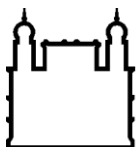
S586 Silva, Alexandre dos Santos da

Perfil epidemiológico do Herpes simplex no grupo de homens que fazem sexo com homens e avaliação do RNA de interferência como agente antiviral na encefalite herpética em camundongos BALB/c / Alexandre dos Santos da Silva. – Rio de Janeiro, 2015.
xvi, 152 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2015.
Bibliografia: f. 113-150

1. Vírus Herpes simplex 1. 2. Homens que fazem sexo com homens. 3. Modelo experimental. 4. BALB/c. 5. Encefalite herpética. 6. RNA de interferência. I. Título.

CDD 616.522



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Perfil epidemiológico do Herpes simplex no grupo de homens que fazem sexo com homens e avaliação do RNA de interferência como agente antiviral na encefalite herpética em camundongos BALB/c

Autor: Alexandre dos Santos da Silva

Orientadora: Dra. Vanessa Salete de Paula

Aprovada em: ____ / ____ / ____

EXAMINADORES:

Dr. Edson Elias da Silva (Presidente da banca)
Fundação Oswaldo Cruz/Rio de Janeiro

Dr^a. Alexandra Rodrigues de Mendonça Favacho – (Revisora)
Fundação Oswaldo Cruz/Rio de Janeiro

Dr. Adilson José de Almeida - UNIRIO/RJ
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro/Rio de Janeiro

Dr. Vinícius D'Ávila Bitencourt Pascoal
Universidade Federal Fluminense/Rio de Janeiro

Dr^a. Andressa Bernardi
Fundação Oswaldo Cruz/Rio de Janeiro

Suplentes:

Dra. Ana Maria Viana Pinto – Universidade Federal Fluminense/Rio de Janeiro

Dra. Fernanda Marcicano Burlandy – Fundação Oswaldo Cruz/Rio de Janeiro

Rio de Janeiro, 14 de Outubro 2015

Trabalho realizado no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia do Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro/RJ sob orientação da Dr^a Vanessa Salete de Paula.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt

“A vida sem ciência é uma espécie de morte”

Sócrates

“Quanto mais me aprofundo na Ciência mais me aproximo de Deus”

Albert Einstein

“O que faz de um pesquisador um ótimo pesquisador é a incrível capacidade de persistir e ter paciência”

Autor desconhecido

Esse trabalho é dedicado a minha filha e amor da minha vida Marina, pela alegria que me dá todo dia de manhã e pelo beijo que pede todo dia antes de dormir. Por ser carinhosa, alegre e inteligente. Por ser meu orgulho e minha alegria. É por você que eu faço tudo isso, para você sentir orgulho de mim. Papai te ama e nunca se esqueça: “Caiu, levantou”.

Agradecimentos

- À Deus, formador de tudo e de todos, por me dar forças e tornar possível a minha caminhada até o final desse projeto.
- À minha orientadora Dr^a. Vanessa Salete de Paula, que não desistiu de mim nesses quase 8 anos me ajudando e orientando nessa carreira como pesquisador.
- Ao Dr. Marcelo Alves Pinto, pela co-orientação no experimento animal e em boa parte dessa pesquisa.
- Aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia: Jaqueline, Aline, Amanda Perse, Renata, Yasmine, Lyana, Amanda Lopes, Camila, Andreza, Arthur, Sarah e Vinicius pelo coleguismo dentro do laboratório.
- Aos amigos da Fiocruz: Juliana Melgaço, Juliana Guimarães, Noemi Gardinali e Fabiana Melgaço pelo companheirismo, amizade, ótimas conversas e pela ajuda nos percalços que a pesquisa e a vida nos trás. Ao Gentil Arthur pelos também quase 8 anos trabalhando, conversando, brigando e discutindo, seguindo juntos com uma carreira em comum. Além de tantos outros que eu conheci dentro da Fiocruz.
- Aos amigos do *Dotô é virose*: Natália Lanza-rini e Jorlan Fernandes que tem a mesma preocupação de ensinar a Virologia como ela deve ser ensinada, ou seja, para todos. Além da amizade e companheirismo diários.
- Ao programa de pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo cruz-Fiocruz por me proporcionar a realização do curso de Doutorado em Medicina Tropical.
- Ao CNPq pela bolsa de doutorado e aos projetos aprovados que proporcionaram a realização deste trabalho.
- Aos pesquisadores Dr. Edson Elias da Silva, Dr. Adilson José de Almeida, Dr. Vinícius D'Ávila Bitencourt Pascoal, Dr^a. Andressa Bernardi, Dr^a. Ana Maria Viana Pinto e Dr^a. Fernanda Marcicano Burlandy por terem aceito o convite para serem membros da banca avaliadora e à Dr^a. Alexsandra Rodrigues de Mendonça Favacho pela revisão da tese.
- À minha família, por todo o apoio e por acreditarem em mim. Dentre eles: às minhas tias, aos meus tios, à minha tia Aninha que torce por mim e fica feliz em

dizer que o sobrinho dela é um pesquisador. Além de todos os meus primos e agora os filhos deles, por estarmos sempre juntos. Principalmente ao meu primo Robson, pelo apoio dado desde o começo. Agradeço muito à matriarca da minha família, minha avó Glória que todo dia me demonstra o que é a sabedoria e a vontade de viver, que ama toda a sua família e é uma das melhores pessoas que eu já conheci na vida. Agradeço aos meus irmãos Tairon (mesmo longe), Tauanny e André que, do jeito dele, sempre torceu por mim junto com a minha cunhada Gleice. Agradeço aos meus sobrinhos João Pedro, Mateus, Giovanna e Miguel. Agradeço à minha mãe que mesmo com pouco se esforçou para dar o melhor aos dois filhos e ao meu pai pelos conselhos e ajuda na formação do meu caráter.

- Aos meus colegas do curso de pós-graduação em Medicina Tropical pela ajuda, companheirismo e mini-cursos ministrados.

- Agradeço aos meus amigos de infância, escola, faculdade, Hemorio e de todos os momentos da minha vida. Principalmente Rafael Senos dos Santos e Anamaria Szrajbman pela força que me deram nesses 4 anos de doutorado. As nossas discussões e conversas altas horas da noite foram extremamente importantes para mim.

- À minha esposa Taís, companheira à qual eu não poderia ter escolhido melhor. Sem o seu apoio, conselhos, amizade e amor eu já teria desistido há muito tempo. Essa tese pode não ser dedicada à você, mas toda a minha carreira é dedicada a você.

- Agradeço, principalmente, à minha menina, minha filha, meu bebê, Marina. Amor da minha vida, que me enche de alegria e orgulho. Que nasceu com o pai estudando para a seleção do Doutorado há quatro anos e desde bem cedo teve que aprender que o papai e a mãe estavam estudando/trabalhando/escrevendo tese e não podiam brincar. Para a pergunta que me foi feita nos últimos meses, “papai, quando você vai parar de trabalhar”, agora eu tenho a resposta, “papai acabou de trabalhar, vamos brincar.”

Resumo

O vírus *Herpes simplex 1* (HSV-1) é um vírus neurotrópico, responsável por manifestações, como herpes labial, ceratoconjuntivite e encefalite herpética (HSE). A HSE apresenta incidência anual de 1-4 casos/milhão de habitantes, podendo causar nível reduzido de consciência, crise convulsiva e déficit motor. Além disso, pode causar sequelas como afasia, amnésia e dificuldades cognitivas, motoras ou sensoriais. A HSE pode ser mais grave e exacerbada em indivíduos co-infectados com HIV/HSV-1, principalmente em grupos de comportamento de risco. Atualmente, o tratamento da HSE com antivirais anti-herpéticos apresenta elevada toxicidade, efeitos colaterais metabólicos e resistência ao antiviral. Uma alternativa aos tratamentos atuais é o uso de pequenas moléculas de RNA de interferência (siRNA) como inibidoras da replicação viral. Os objetivos desse estudo foram (1) avaliar a prevalência da infecção por HSV em 283 homens que fazem sexo com homens (HSH) de Campo Grande, Mato Grosso do Sul e (2) utilizar o siRNA anti-HSV-1 conjugado com RVG-9R (siRNA:RVG-9R anti-HSV-1) para avaliar o tratamento da HSE *in vivo*. Inicialmente foi avaliado o perfil epidemiológico por sorologia e fatores de risco para infecção por HSV no grupo HSH. Posteriormente, foi avaliada a infecção por HSE em camundongos BALB/c inoculados com diferentes diluições da cepa HSV-1 EK pela análise dos sinais clínicos da HSE, IFN- γ e replicação do HSV-1. Por fim, o tratamento com a molécula siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 foi avaliado pela cinética da inibição da replicação viral, número de doses administradas e tratamento do siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 combinado com aciclovir no modelo experimental da HSE. Além disso, foi realizada a análise dos sinais clínicos da HSE, mortalidade e inibição da replicação viral. A soroprevalência do grupo HSH foi de 85,2% e fatores de risco como idade, nível educacional, baixa renda, práticas sexuais frequentes, uso de drogas e infecção por HIV foram associados com HSV. Animais infectados com HSV-1 EK em modelo experimental de HSE apresentaram sinais clínicos da HSE, alta mortalidade, aumento na concentração de IFN- γ e replicação do HSV-1 no cérebro e gânglio trigeminal (TG). Na avaliação do tratamento com siRNA, animais tratados com duas doses de siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 apresentaram tempo de sobrevivência prolongado, redução dos sinais clínicos da HSE e inibição da replicação viral no cérebro em 67,7% e TG em 85,7%. Além disso, animais tratados com siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 combinado com aciclovir demonstraram redução dos sinais clínicos da HSE e 100% de sobrevivência, bem como inibição da replicação viral no cérebro de 83,2% e TG de 74,5%. Em conclusão, ocorreu alta prevalência do HSV e de coinfeção HIV/HSV, o que pode aumentar a possibilidade de infecções severas da HSE no grupo HSH, facilitando a manifestação clínica. Além disso, a molécula siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 se mostrou bastante eficaz no tratamento da HSE, possibilitando a redução dos sinais clínicos de HSE, aumento de sobrevivência e inibição da replicação do HSV-1 em camundongos. Esses resultados demonstram que o siRNA pode ser utilizado como terapia antiviral alternativa no tratamento da HSE.

Palavras-chaves: Vírus Herpes simplex 1; Homens que fazem sexo com homens; Modelo experimental; BALB/c; Encefalite herpética; RNA de interferência

Abstract

Herpes simplex virus 1 (HSV-1) is a neurotropic virus responsible for clinical manifestations as herpes labialis, keratoconjunctivitis and herpetic encephalitis (HSE). Herpetic encephalitis (HSE) presents an annual incidence of 1-4 cases/million of inhabitants and causes reduced level of consciousness, convulsive crisis and motor deficit. Besides that, HSE can cause sequels as aphasia, amnesia and motor, cognitive or sensory difficulties. HSE can be more severe and exacerbate in individuals co-infected with HIV/HSV-1, especially in risk behavior group. Nowadays, HSE treatment with antiherpetic antivirals presents elevated toxicity, metabolic side effects and antiviral resistance. An alternative to current treatments is the use of small interference RNA (siRNA) as inhibitors of viral replication. The aim of this study was (1) to evaluate the prevalence of HSV infection in 283 men who has sex with men (MSM) from Campo Grande, Mato Grosso do Sul and (2) to utilize siRNA anti-HSV-1 conjugated with RVG-9R (siRNA:RVG-9R anti-HSV-1) to evaluate HSE treatment *in vivo*. At first was evaluated the epidemiological profile by serological testing and risk factors of HSV infection in MSM. After that, was evaluated the HSE infection of BALB/c mice inoculated with different dilutions of HSV-1 EK strain by assessment of HSE clinical signs, IFN- γ and HSV-1 replication. At last, siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 treatment was evaluated by kinetics of viral replication inhibition, number of administered doses and treatment with siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 combined with acyclovir in HSE experimental model. Besides that, was performed the analysis of HSE clinical signs, mortality and viral replication inhibition. The seroprevalence of MSM group was of 85.2% and risk factors as age, education level, low income, frequently sexual practices, drug use and HIV infection were associated with HSV. Animals infected with HSV-1 EK in HSE experimental model presented HSE clinical signs, high mortality, increase of IFN- γ concentration and HSV-1 replication in brain and trigeminal ganglia (TG). When evaluating siRNA treatment, animals treated with two doses of siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 showed prolonged survival time, reduction of HSE clinical signs and viral replication inhibition in brain (67.7%) and TG (85.7%). Also, animals treated with siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 combined with acyclovir demonstrated reduction of HSE clinical signs and survival of 100%, as well as viral replication inhibition in brain (83.2%) and in TG (74.5%). In conclusion, occurred high prevalence of HSV and HIV/HSV co-infection, which can increase the possibility of HSE severity infections on HSH group and facilitate the clinical manifestation. Besides that, the molecule siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 demonstrated to be quite effective on HSE treatment, enabling HSE clinical signs reduction, increase of survival and HSV-1 replication inhibition in mice. These results demonstrate that siRNA can be utilized as alternative antiviral therapy on HSE treatment.

Keywords: Herpes simplex virus 1; Men who have sex with men; Experimental model; BALB/c; Herpetic encephalitis; RNA interference.

Lista de Quadros

| | |
|---|---|
| Quadro 1.1.: Nomenclatura dos vírus isolados de humanos da família <i>Herpesviridae</i> e suas respectivas subfamílias..... | 3 |
|---|---|

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1.1: Estrutura do vírus HSV-1..... | 6 |
| Figura 1.2: Interações moleculares para adsorção e fusão do HSV-1 à célula..... | 7 |
| Figura 1.3: Ciclo de replicação do HSV-1..... | 9 |
| Figura 1.4: Latência e reativação do HSV-1..... | 16 |
| Figura 1.5: Manifestações Clínicas do HSV-1..... | 20 |
| Figura 1.6: Mecanismo de ação do aciclovir na replicação do HSV-1..... | 24 |
| Figura 1.7: Manifestações clínicas da encefalite herpética em camundongos BALB/c inoculados com a cepa HSV-1 EK..... | 29 |
| Figura 1.8: Estudo de co-supressão em petúnias..... | 32 |
| Figura 1.9: Mecanismo de ação do RNAi..... | 38 |
| Figura 1.10: Possíveis alvos do ciclo de replicação viral para o silenciamento gênico pelo siRNA..... | 45 |

Lista de abreviaturas e siglas

AMPV = Metapneumovírus

AAV = Vírus associados à Adenovirus

aciclo-GMP = Aciclo-guanosina monofosfato

ACMV = Vírus do mosaico africano da mandioca

ACV = Aciclovir

Ago = Proteínas Argonautas

al-1 = Gene albino-1

CBV-3 = Coxsackievirus B3

CEUA = Comissão de Ética no Uso de Animais

CVB4 = Coxsackievirus B4

DC = Células dendríticas

DNApol = DNA polimerase

EBV = Vírus Epstein-Barr

eIF-2 α = Subunidade α do fator de iniciação da tradução

endo-siRNA = siRNA de origem endógena

HAV = Vírus da Hepatite A

HBV = Vírus da Hepatite B

HCF = Fator celular do hospedeiro (do inglês = Host cell factor)

HCMV = Citomegalovírus

HCV = Vírus da Hepatite C

HEV = Vírus da Hepatite E

HHV-1 = Herpesvírus humano 1

HIV = Vírus da imunodeficiência adquirida

HSE = Encefalite Herpética

HSH = Homens que fazem sexo com homens

HSPG = Sulfato de heparana

HSV = *Vírus Herpes Simplex*

HSV-1 = *Vírus Herpes Simplex 1*

HSV-2 = *Vírus Herpes Simplex 2*

HVEM = Herpesvírus entry mediator

ICTV = Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

IFI16 = Proteína 16 induzida por interferon- γ

IFN = Interferon
IFN- γ = Interferon gama
iNOS = Óxido nítrico sintetase induzível
IRF3 = Fator 3 de regulação do IFN
KSHV = Herpesvírus associado ao sarcoma de kaposi
LAT = Transcritos associados à latência
LD50 = Dose letal média (do inglês: Median lethal dose)
miRNA = micro RNA
NGF = Fator de crescimento do nervo (do inglês: Nerve growth factor)
NLR = Receptores NOD-like (do inglês: NOD-like receptors)
OCT-1 = Fator de ligação em octâmero-1 (do inglês: octamer binding fator -1)
ODN = Oligonucleotídeos antisense
PAMP = Padrão molecular associados a patógenos
PEG – Polietilenoglicol
piRNA = piwi-interaction RNA
PKR = Quinase dependente de RNAfd (do inglês = RNA-dependent protein kinase)
PMMoV = Vírus do mosqueado do pimentão (do inglês = *Pepper mild mottle vírus*)
PRR = Receptor para reconhecimento de padrão (do inglês = Pattern recognition receptors)
PTGS = Silenciamento gênico pós-transcricional (do inglês = Post-transcriptional gene silencing)
RISC = Complexo de silenciamento mediado por RNA (do inglês: RNA-induced silencing complex)
RLR = Receptor RIG-I-like (do inglês = RIG-I-like receptors)
RNAfd = RNA fita dupla
RNAi = Interferência por RNA
RNAm = RNA mensageiro
ROS = Espécies reativas de oxigênio (do inglês = Reactive oxygen species)
RSV = Vírus respiratório sincicial (do inglês = Respiratory syncytial virus)
RVG-9R = Peptídeo derivado da glicoproteína do Rhabdovirus.
shRNA = Pequeno RNA em forma de grampo (do inglês = short hairpin RNA)
siRNA = Pequeno RNA interferente (do inglês = small interfering RNA)

SNC = Sistema nervoso central

TAP1/TAP2 = Proteínas translocadoras de peptídeos

TEV = Vírus Tobacco etch

TG = Gânglio trigeminal (do inglês = Trigeminal gânglia)

TGF- β = Fator de crescimento e transformação β (do inglês = Transforming growth factor beta)

TK = Timidina quinase (do inglês - Thymidine kinase)

TLR = Receptor Toll-like (do inglês – Toll-like receptor)

TNF- α = Fator de necrose tumoral alfa (do inglês = tumor necrosis factor alpha)

TRBP = Proteína ligadora de RNA (tar) transativadora (do inglês = Trans-activator RNA(tar)binding protein)

UFP = Unidade formadora de placa

Vero = Células do rim do macaco verde *Cercopithecus aethiops* (do inglês = African green monkey *Cercopithecus aethiops* kidney cells)

VHS = Proteína Virus host shutoff

VP16/alfa-TIF = Fator alfa trans-Indutor (do inglês = alfa gene trans-inducing fator)

VZV = Vírus *Varicela-Zoster*

ZBP1 = Proteína 1 de ligação ao DNA (do inglês = Z-DNA-binding protein 1)

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| RESUMO..... | IX |
| ABSTRACT..... | X |
| Lista de quadros..... | XI |
| Lista de figuras..... | XI |
| Lista de abreviaturas e siglas..... | XII |
| 1.INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Vírus <i>Herpes simplex 1</i> | 1 |
| 1.1.1. <i>Família Herpesviridae</i> | 1 |
| 1.1.2. <i>Histórico e características do vírus Herpes simplex 1</i> | 3 |
| 1.1.3. <i>Estrutura viral</i> | 5 |
| 1.1.4. <i>Replicação viral e latência</i> | 6 |
| 1.1.5. <i>Interação vírus-hospedeiro</i> | 10 |
| 1.1.6. <i>Resposta imune do hospedeiro</i> | 11 |
| 1.1.7. <i>Patogênese</i> | 15 |
| 1.1.8. <i>Manifestações Clínicas</i> | 16 |
| 1.1.9. <i>Epidemiologia</i> | 21 |
| 1.1.10. <i>Prevenção e controle do vírus Herpes simplex 1</i> | 22 |
| 1.2. Encefalite herpética..... | 25 |
| 1.2.1. <i>Características da Encefalite herpética</i> | 25 |
| 1.2.2. <i>Tratamento da Encefalite herpética</i> | 27 |
| 1.2.3. <i>Modelos animais no estudo da encefalite herpética</i> | 27 |
| 1.3. RNA de interferência..... | 31 |
| 1.3.1. <i>Silenciamento gênico</i> | 31 |
| 1.3.2. <i>Moléculas envolvidas no silenciamento por RNA</i> | 33 |
| 1.3.3. <i>Mecanismo de ação do siRNA</i> | 36 |
| 1.3.4. <i>Limitações no uso do siRNA</i> | 38 |
| 1.3.5. <i>Entrega do siRNA no tecido alvo</i> | 39 |
| 1.3.6. <i>Utilização do RNA de interferência</i> | 42 |
| 2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO | 46 |
| 3. OBJETIVOS | 48 |
| 3.1. Objetivo geral..... | 48 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 3.2. | Objetivos específicos..... | 48 |
| 4. | RESULTADOS | 49 |
| 4.1. | Artigo 1 - Epidemiological evaluation of herpes simplex virus in men who have sex with men in Mato Grosso do Sul, Brazil. | 50 |
| 4.2. | Artigo 2 - Intranasal challenge of BALB/c mice with HSV-1 EK strain: A experimental model for evaluation of antiviral drugs efficacy against Herpes simplex virus type I encephalitis..... | 52 |
| 4.3. | Artigo 3 - Effects of RNA interference therapy against Herpes simplex virus type I encephalitis..... | 70 |
| 5. | DISCUSSÃO | 97 |
| 5.1. | Perfil epidemiológico do grupo de comportamento de risco de Homens que fazem sexo com Homens..... | 97 |
| 5.2. | Avaliação do modelo experimental de infecção pela via intranasal de camundongos BALB/c com HSV-1 EK..... | 100 |
| 5.3. | Avaliação do RNA de interferência como agente antiviral na HSE..... | 102 |
| 6. | CONCLUSÃO | 111 |
| 7. | PERSPECTIVAS | 112 |
| 8. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 113 |
| 9. | ANEXOS | 151 |
| 9.1. | Anexo A - Aprovação do estudo do perfil epidemiológico do grupo de risco de homens que fazem sexo com homens. | 151 |
| 9.2. | Anexo B - Aprovação da utilização no uso de camundongos BALB/c em modelo experimental de encefalite herpética | 152 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Vírus *Herpes simplex 1*

1.1.1. Família *Herpesviridae*

A ordem *Herpesvirales* é dividida em três famílias, a família *Alloherpesviridae* formada por vírus de peixes e anfíbios, a família *Malacoherpesviridae* formada por vírus de moluscos e a família *Herpesviridae* formada por vírus de mamíferos, aves e répteis (Davison et al. 2009).

Os membros da família *Herpesviridae* compartilham as seguintes características (Pellet & Roizman 2013): (1) Codificam enzimas em comum, envolvidas no metabolismo dos ácidos nucleicos (timidina quinase, ribonucleotídeo redutase), na síntese do DNA (DNA polimerase, helicase, primase) e no processamento de proteínas (proteína quinases); (2) Realizam a transcrição de genes virais, síntese do DNA viral e encapsidamento viral no núcleo; (3) Possuem infecção lítica acompanhada de destruição da célula infectada e (4) Entram em latência causando a infecção persistente.

A família *Herpesviridae* é altamente disseminada na natureza. Contém 87 membros que infectam diferentes grupos de animais (ICTV 2015). A maioria das espécies animais é suscetível à infecção por, pelo menos, uma espécie de vírus desse grupo e, frequentemente, por mais de um herpesvírus. Esse grupo, provavelmente, apareceu há 400 milhões de anos atrás (McGeoch et al. 2000; Pellet & Roizman 2013). Baseado em características biológicas e genéticas, a família *Herpesviridae* é dividida em três subfamílias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae* (Davison et al. 2009; ICTV 2015). A subfamília *Alphaherpesvirinae* é formada por indivíduos que apresentam ciclo de replicação curto, rápida disseminação em cultura de tecidos, destruição eficiente de células infectadas e capacidade de estabelecer latência primariamente (mas não exclusivamente) nos nervos sensoriais. A subfamília *Betaherpesvirinae* tem como características ciclo longo de replicação, disseminação lenta em cultura de células, provocar o aumento das células infectadas (citomegalia), além de estabelecimento da latência nas glândulas secretórias, células linforeticulares, rins e outros tecidos. Já a subfamília

Gammaherpesvirinae infecta e causa infecções latentes apenas nos tecidos linfóides (ICTV 2015; Roizman et al. 2013; Shukla & Spear 2001).

Até o momento nove vírus da família *Herpesviridae* já foram isolados de humanos (Pellet & Roizman 2013). Os vírus humanos da subfamília *Alphaherpesvirinae* fazem parte do gênero *Simplexvirus* (*Virus Herpes simplex 1* e *Virus Herpes simplex 2*) e do gênero *Varicellovirus* (*Virus Varicela-Zoster*). Na subfamília *Betaherpesvirinae* são encontrados vírus do gênero *Cytomegalovirus* (*Virus Citomegalovírus*) e do gênero *Roseolovirus* (*Herpesvírus humano 6 variante A*, *Herpesvírus humano 6 variante B* e *Herpesvírus humano 7*). Já a subfamília *Gammaherpesvirinae* é formada pelo gênero *Lymphocryptovirus* (*Vírus Epstein-Barr*) e gênero *Rhadinovirus* (*Herpesvírus associado ao sarcoma de kaposi*) (Davison et al. 2009; Pellet & Roizman 2013). Atualmente todos os vírus da família *Herpesviridae* que afetam humanos foram nomeados como Herpesvírus humanos e numerados de 1 a 8 (sendo que os vírus HHV-6 são classificados como HHV-6A e HHV-6B) (Quadro 1.1) (ICTV 2015).

Quadro 1.1. Nomenclatura dos vírus isolados de humanos da família *Herpesviridae* e suas respectivas subfamílias.

| NOME ANTIGO | NOME ATUAL | SIGLA | SUBFAMÍLIA | GÊNERO |
|--|-----------------------|--------|----------------------------|--------------------------|
| <i>Vírus Herpes simplex I (HSV-1)</i> | Herpesvírus humano 1 | HHV-1 | <i>Alphaherpesvirinae</i> | <i>Simplexvirus</i> |
| <i>Vírus Herpes simplex II (HSV-2)</i> | Herpesvírus humano 2 | HHV-2 | <i>Alphaherpesvirinae</i> | <i>Simplexvirus</i> |
| <i>Vírus Varicela-Zoster (VZV)</i> | Herpesvírus humano 3 | HHV-3 | <i>Alphaherpesvirinae</i> | <i>Varicellovirus</i> |
| <i>Vírus Epstein-Barr (EBV)</i> | Herpesvírus humano 4 | HHV-4 | <i>Gammapherpesvirinae</i> | <i>Lymphocryptovirus</i> |
| <i>Citomegalovírus (HCMV)</i> | Herpesvírus humano 5 | HHV-5 | <i>Betaherpesvirinae</i> | <i>Cytomegalovirus</i> |
| <i>Herpesvírus humano 6 variante A</i> | Herpesvírus humano 6A | HHV-6A | <i>Betaherpesvirinae</i> | <i>Roseolovirus</i> |
| <i>Herpesvírus humano 6 variante B</i> | Herpesvírus humano 6B | HHV-6B | <i>Betaherpesvirinae</i> | <i>Roseolovirus</i> |
| <i>Herpesvírus humano 7</i> | Herpesvírus humano 7 | HHV-7 | <i>Betaherpesvirinae</i> | <i>Roseolovirus</i> |
| <i>Herpesvírus associado ao sarcoma de kaposi (KSHV)</i> | Herpesvírus humano 8 | HHV-8 | <i>Gammapherpesvirinae</i> | <i>Rhadinovirus</i> |

1.1.2. Histórico e características do vírus *Herpes simplex 1*

As primeiras descrições de lesões genitais que lembram as lesões causadas por vírus *Herpes simplex* foram descritas em uma tabuleta Suméria do ano 3000 a.C. e no Papiro Ebers (1500 a.C.), um dos tratados médicos mais antigos que se tem notícia (Pellet & Roizman 2013). O médico grego Hipócrates de Cós relatou em 460/377 a.C. lesões que hoje são atribuídas ao vírus. Ele também foi o primeiro a denomina-las como *herpes* (derivado do grego herpein = rastejar, réptil) e descrever as lesões causadas pelo vírus,

como vesículas e ulcerações (McGeoch et al. 2006). Todas estas manifestações caracterizavam a doença *Herpes febrilis*, que foi descrita mais tarde por Heródoto (484/425 a.C.). Um relato extremamente importante para a doença é o de John Astruc, médico do rei Luís XIV, pois ele descreveu a ocorrência de herpes genital em prostitutas Francesas. Em 1883, Unna descreveu a herpes como sendo uma doença vocacional, pois era encontrada em prostitutas (Pellet & Roizman 2013).

No entanto, somente no século XX, entre 1920 e 1960, foi demonstrado que os isolados virais infectavam uma imensa gama de hospedeiros, como ratos, camundongos, coelhos, cobaias e macacos (Miranda 2002). Em 1968, esse vírus foi inserido no gênero *Simplex* e, com base em diferenças epidemiológicas, clínicas e imunológicas foram divididos em *Herpes simplex 1* (HSV-1) e *Herpes simplex 2* (HSV-2) (Nahmias & Dowdle 1968). Posteriormente, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), classificou os vírus HSV-1 e HSV-2 como pertencentes à família *Herpesviridae* e à subfamília *Alphaherpesvirinae*, em virtude de suas características genômicas, sorológicas e ciclo replicativo (McGeoch et al. 2006). Atualmente, o ICTV denomina o *Vírus Herpes simplex 1* como *Herpesvírus humano 1* (HHV-1) (ICTV 2015). No entanto, a comunidade científica internacional ainda utiliza o nome *Herpes simplex 1* normalmente.

O HSV-1 é neurotrópico, possui um ciclo de replicação relativamente curto, dissemina-se rapidamente e provoca lise em cultura de células infectadas, além de infectar um amplo espectro de hospedeiros (Roizman et al. 2013).

O principal método de transmissão da doença ocorre pela exposição direta de mucosas, pele lesionada ou secreções mucosas de um indivíduo com infecção recorrente (Kleymann 2003; Nadelman & Newcomer 2000; Sciubba 2003). A transmissão pode ocorrer também a partir da exposição às secreções mucocutâneas de uma pessoa assintomática secretando o vírus na ausência da doença clínica (Sciubba 2003). A exposição inicial ao HSV-1, frequentemente, leva à invasão das células epiteliais e à replicação intracelular no local da exposição primária. Após a ocorrência da infecção primária, o vírus se desloca até os nervos sensitivos do gânglio trigeminal, aonde entra em estado de latência (Miller et al. 1998). A reativação pode ocorrer pela perda do

estado de latência a partir de fatores como estresse, fadiga, calor, frio, radiação ultravioleta e imunossupressão (Whitley et al. 1998). Após ser reativado, o vírus migra pelo caminho inverso a partir do gânglio trigeminal até a mucosa na qual ocorreu a exposição inicial à doença (Sciubba 2003).

1.1.3. Estrutura viral

O HSV-1 apresenta diâmetro de, aproximadamente, 186 nm (Pellet & Roizman 2013; Roizman et al. 2013; Roller et al. 2008). A estrutura viral do HSV-1 consiste em um cerne elétron-denso que contém o DNA, um capsídeo icosaédrico que envolve o cerne, uma camada amorfa (composta de, pelo menos, 20 proteínas) denominada tegumento que separa o capsídeo da camada mais externa e de um envelope formado por bicamada lipídica composta de, aproximadamente, 11 diferentes glicoproteínas virais (Reske et al. 2007; Roizman et al. 2013) (Figura 1.1).

Em relação ao genoma viral, o HSV-1 é composto por DNA fita dupla linear. Seu DNA possui, aproximadamente, 152 Kpb com proporção G+C de 68%. O genoma consiste de dois segmentos covalentemente ligados, o segmento L (longo) e S (curto). Cada segmento é composto de sequências únicas (U) chamadas de U_L e U_S que são flanqueadas por repetições invertidas de grande tamanho. No genoma viral são codificadas 84 proteínas (Pellet & Roizman 2013).

O capsídeo é formado por 162 capsômeros, com diâmetro variando entre 100-110 nm e simetria icosaédrica (Roizman et al. 2013). Além disso, o capsídeo é composto pelas proteínas estruturais VP5 (U_L19), VP19C (U_L38), VP23 (U_L18), VP24 (U_L26) e VP26 (U_L35) (Arduino & Porter 2008; Roizman et al. 2013).

O tegumento é uma estrutura amorfa, responsável por regular os processos celulares, composta por, pelo menos, 18 proteínas (principalmente ICP5, VHS e α -TIF), presentes entre o capsídeo e o envelope. As proteínas do tegumento servem para regular os processos celulares, evadir do sistema imune (Sen et al. 2013) e promover a transcrição dos genes virais (Egan et al. 2013).

O envelope é encontrado na camada externa do vírus apresentando uma aparência tipicamente trilaminar, sendo formado por lipídeos, proteínas e,

pelo menos, 13 glicoproteínas. Ele se forma a partir das regiões alteradas das membranas celulares ao ser liberado da célula (Mettenleiter et al. 2009; Pellet & Roizman 2013).

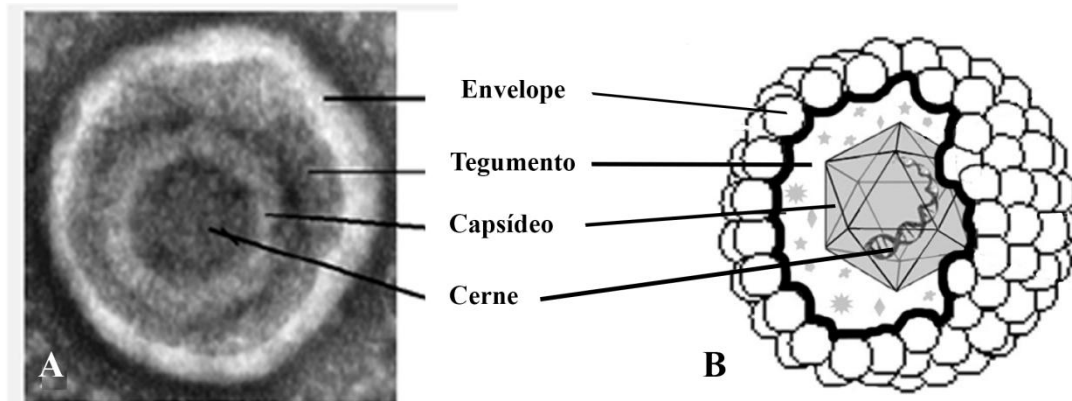


Figura 1.1 – Estrutura do vírus HSV-1. (A) Microscopia eletrônica mostrando a estrutura do vírus; (B) Desenho esquemático em corte do HSV-1 mostrando sua estrutura. As setas indicam o envelope, tegumento, capsídeo e cerne onde se encontra o genoma viral. Fonte: Modificado de Roizman et al, 2007 (Roizman et al. 2007) e Aurelian, 2008 (Aurelian 2008).

1.1.4. Replicação viral e latência

O início da replicação do vírus HSV-1 ocorre com sua adsorção à célula hospedeira através da interação de regiões ricas em glicosaminoglicanas do sulfato de heparana encontradas na superfície celular com as glicoproteínas virais do envelope gB e gC (Akhtar & Shukla 2009; Reske et al. 2007) (Figura 1.2). Outros receptores ainda não descritos podem ser utilizados na interação de gB com a superfície celular. Em seguida, a glicoproteína viral gD interage com receptores celulares, o que induz sua mudança conformacional. Os seguintes receptores são responsáveis por essa interação: receptores tipo 1 e 2 da nectina (membro da superfamília das Imunoglobulinas), *Herpesvírus entry mediator* ou HVEM (membro da família de receptores de TNF) e Heparan sulfato 3-O-sulfatado (Campadelli-Fiume et al. 2012). É provável que ocorra uma variação desses receptores de acordo com o tipo de célula infectada pelo HSV-1. Após essa interação inicial, ocorre a fusão do envelope do vírus com a membrana plasmática da célula hospedeira, ocorrendo a interação das

glicoproteínas gB, gH e gL com a glicoproteína gD (Akhtar & Shukla 2009; Reske et al. 2007; Spear et al. 2006) (Figura 1.2).

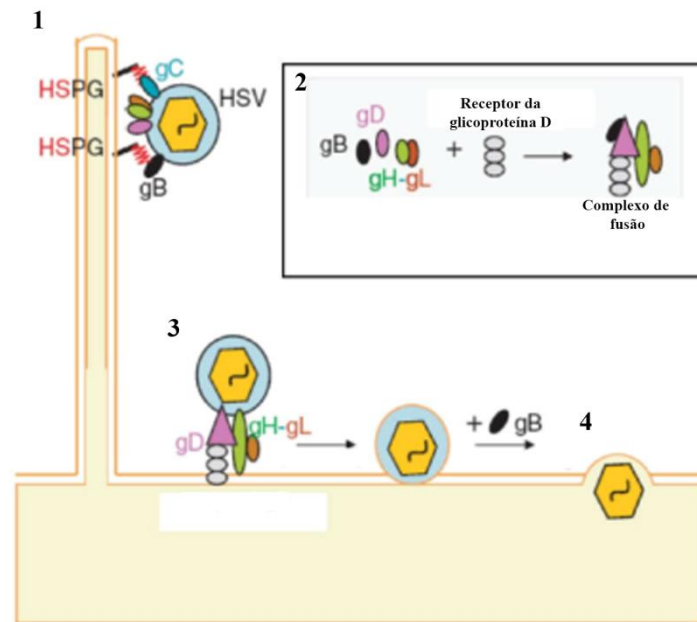


Figura 1.2 – Interações moleculares para adsorção e fusão do HSV-1 à célula. (1) A fixação inicial às células é mediada pelas glicoproteínas gC e/ou gB com o sulfato de heparana (HSPG); (2) Interação entre gD, gH-gL, gB e um receptor de gD produz mudanças conformacionais no gD; (3) Fusão das membranas viral e celular; (4) Liberação do tegumento e nucleocapsídeo no citoplasma. Fonte: Modificado de Akhtar & Shukla, 2009 (Akhtar & Shukla 2009).

Após a fusão (Figura 1.3), as proteínas do tegumento têm três destinos: (1) permanecer no citoplasma, como o que ocorre com a proteína virus host shutoff (VHS), que inibe a tradução dos RNAs mensageiros (RNAm) da célula hospedeira; (2) serem transportadas para o núcleo, como o que ocorre com a proteína fator alfa trans-Indutor (VP16/alfa-TIF), que regula a transcrição dos genes α ; (3) permanecerem associadas ao capsídeo. O capsídeo é transportado pelo citoesqueleto ao núcleo e ancorado aos poros nucleares, onde o seu DNA viral é liberado (Heldwein & Krummenacher 2008; Kelly et al. 2009). Ao chegar ao núcleo, ocorre a circularização do DNA viral, mesmo com ausência de síntese proteica viral (Strang & Stow 2005). Com o DNA circularizado, inicia-se o processo de transcrição no núcleo, mediado pela RNA polimerase II da célula infectada. Após a transcrição, o RNAm, vai ao

citoplasma, onde ocorre a síntese das proteínas virais (Roizman et al. 2013) (Figura 1.3).

O processo de expressão gênica é dividido em três etapas: os primeiros genes expressos são conhecidos como genes imediatamente precoces (genes α). Após expressão dos genes α , ocorre a expressão dos genes precoces (genes β) e, por último, são expressos os genes tardios (genes γ) (Figura 1.3).

Os genes da fase α codificam as proteínas que são responsáveis pela regulação gênica da próxima etapa de transcrição (expressão dos genes β), dentre elas, as proteínas ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 e ICP47. Estes genes têm sua própria transcrição regulada pela proteína do tegumento VP16/alfa-TIF em conjunto com a proteína OCT-1 (Fator de ligação em octâmero-1) e com o fator celular do hospedeiro (HCF), ao se ligar ao TATA Box no genoma viral, formando o complexo de pré-iniciação viral (Kelly et al. 2009; Roizman et al. 2013). A ICP0 atua estimulando a expressão de genes do HSV-1 pertencentes às fases α , β e γ (Hancock et al. 2006). A proteína ICP4 reprime a expressão dos genes imediatamente iniciais (Carrozza & DeLuca 1996; Gu & DeLuca 1994; Roberts et al. 1988) e ativa a expressão dos genes E ou L através da interação com fatores da RNA polimerase II (Gu & DeLuca 1994; Smith et al. 1993). A ICP22 não é essencial para a replicação do HSV-1 em cultura, mas é importante para expressão eficiente dos genes da fase β e γ (O'Toole et al. 2003). A ICP27 inibe o processamento do RNAm (Lindberg & Kreivi 2002; Sandri-Goldin & Mendoza 1992) e a ICP47 impede o transporte de peptídeos antigênicos para o retículo endoplasmático (Hill et al. 1995). A síntese das proteínas α ocorre entre 2-4 horas após a infecção da célula (Roizman et al. 2013).

Na fase β , são expressas as proteínas responsáveis pela replicação do DNA viral e produção de substratos para a síntese de DNA. Dentre elas, destaca-se a timidina quinase viral (TK) e a DNA polimerase viral (U_L30) (Gong et al. 2002). O pico da síntese dessas proteínas ocorre entre 5-7 horas após a infecção (Lehman & Boehmer 1999; Roizman et al. 2013).

Após o fim da fase β , inicia-se a expressão dos genes responsáveis pela síntese das proteínas estruturais do HSV-1, os genes da fase γ . A fase γ , ou tardia, se caracteriza pela produção de proteínas estruturais do vírion, (como proteínas presentes no tegumento e no envelope) e a montagem da partícula

viral (Boehmer & Lehman 1997; Roizman 1996). Essas proteínas estruturais serão responsáveis pela formação e montagem do capsídeo. Inicialmente, proteínas são responsáveis por montar um pré capsídeo contendo um “esqueleto” interno. Esse “esqueleto” interno é perdido após a inserção do DNA viral, e, após a inserção do DNA viral, o vírus é direcionado para a membrana celular onde é envelopado. A replicação completa dura em média de 18-20 horas (Jacobs et al. 1999; Pellet & Roizman 2013).

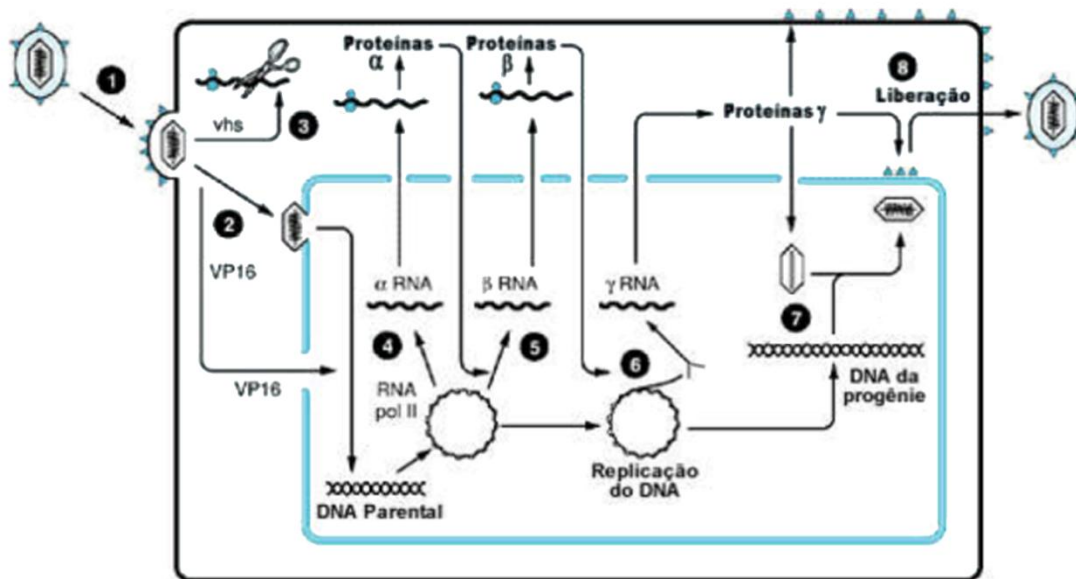


Figura 1.3 – Ciclo de replicação do HSV-1. (1) Fusão do envelope viral com a membrana celular, liberando o nucleocapsídeo viral no citoplasma. (2) O nucleocapsídeo é transportado aos poros nucleares e ocorre a liberação do DNA viral no núcleo; (3) Liberação da proteína VHS e degradação do RNAm do hospedeiro; (4) Transcrição dos genes α ; (5) Transcrição dos genes β ; (6) Replicação viral e transcrição dos genes γ ; (7) Encapsidação do DNA; (8) Aquisição do envelope e liberação de novas partículas virais por brotamento. Fonte: Modificado de Roizman et al., 2007 (Roizman et al. 2007).

Além do ciclo lítico, o HSV-1 pode, uma vez dentro da célula hospedeira, entrar em latência. Os fatores que influenciam na progressão da latência ou do ciclo reprodutivo ainda não estão bem estabelecidos, mas existem alguns modelos para o estabelecimento da latência. Um dos principais modelos para a latência leva em conta a presença do fator de crescimento do nervo (NGF), que possivelmente leva à latência pela indução da transcrição do gene viral LAT no gânglio trigeminal (Mitchell et al. 2003; Preston 2000; Roizman et al. 2013). De fato, na latência, os únicos produtos de genes virais expressos em um grande

nível, são os produtos do gene viral LAT, pois a latência leva à repressão da expressão dos genes líticos (Pellet & Roizman 2013). Quando ocorre a latência, o genoma do HSV-1 se associa a histonas, formando um DNA episomal circular. Nesse momento não se consegue detectar o vírus pelo isolamento viral (Perng & Jones 2010). Em geral, a latência é estabelecida no sistema nervoso central (SNC), sendo mais comum a sua ocorrência nos gânglios. Já foi encontrado vírus latente nos gânglios trigeminal, torácico, sacral e vagal (Pellet & Roizman 2013).

1.1.5. Interação vírus-hospedeiro

Além de células do SNC, como neurônios e células da glia (Lokensgard et al. 2002), o vírus HSV-1 é capaz de infectar células dendríticas, incluindo células de Langerhans na pele e epitélio vaginal da mucosa (Gantt & Muller 2013).

A interação vírus-hospedeiro entre o HSV-1 e as proteínas celulares é realizada para estabilizar ou bloquear a função dessas proteínas. A proteína ICP0 (fase α da replicação), por exemplo, se liga e estabiliza a proteína celular ciclina D3. Provavelmente, essa ligação leva à translocação do ICP0 e ao aumento da síntese de DNA viral e das proteínas tardias (Van Sant et al. 2001). A proteína ICP0 também está relacionada ao bloqueio da resposta imune mediada por interferons (IFN) do tipo1, evitando o acúmulo do fator 3 de regulação de IFN (IRF3) no núcleo (Paladino & Mossman 2009). A proteína ICP47 do HSV-1 também é capaz de bloquear a resposta imune ao bloquear a apresentação de antígenos. Esse bloqueio ocorre pela ligação entre a proteína ICP47 e as proteínas translocadoras de peptídeos TAP1/TAP2 (Whitley & Roizman 2001).

A proteína quinase dependente de RNA fita dupla (RNAfd), chamada de PKR é ativada pela interação vírus-hospedeiro, levando à fosforilação da subunidade α do fator de iniciação da tradução (eIF-2 α) celular, paralisando assim a síntese proteica. Essa ativação ocorre a partir do reconhecimento do RNAfd encontrado durante o ciclo de replicação viral. Esse efeito antiviral pode ser evitado pelo vírus HSV-1 pela codificação da proteína ICP34.5 que causa a desfosforilação da eIF-2 α e, conseqüentemente, mantém a síntese proteica celular, essencial para a replicação viral (Cheng et al. 2005).

Para que ocorra a replicação viral, há a necessidade de interromper determinados mecanismos celulares, como a transcrição, tradução e o processamento dos RNAm celulares. Uma das principais proteínas virais que exibe essa função é a proteína VHS, presente no tegumento do vírus. Essa proteína acelera a degradação dos RNAs mensageiros celulares e virais, além de inibir a tradução do RNAm celular (Paladino & Mossman 2009; Weir 2001). Várias proteínas imediatamente precoces do HSV-1 atuam dessa forma. A proteína ICP47 atua impedindo o processamento pós-transcricional da célula, o que favorece a tradução do RNAm viral (Weir 2001). Já a proteína ICP27 atua na replicação viral, ativação da transcrição, estabilidade do RNA e é importante para a reativação da latência viral, elevando a sensibilização celular à apoptose e os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Kim et al. 2008).

Quando ocorre a replicação viral, ocorrem mudanças que afetam a integridade celular como: destruição dos cromossomos celulares, desaparecimento do nucléolo, fragmentação do complexo de Golgi e rearranjo dos microtúbulos. Outras mudanças celulares desencadeadas pela infecção por HSV-1 são o arredondamento celular, células multinucleadas e formação de grumos. Todas as alterações celulares que ocorrem durante a replicação viral são importantes, pois possibilitam o ambiente necessário para a síntese do DNA viral, aumento da glicosilação e exocitose viral, além de prevenir a resposta do hospedeiro contra a infecção pelo HSV-1 (Roizman et al. 2013).

A apoptose celular é inibida por proteínas do vírus que possuem mecanismos anti-apoptóticos, como: gD, ICP4, ICP27, ICP6 e ICP34.5 (Roizman et al. 2013). Além dessas proteínas, miRNAs codificados por transcritos associados à latência (LATs) possuem função anti-apoptótica, pois regulam a expressão de moléculas envolvidas na sinalização do fator de crescimento e transformação β (TGF- β), proteína importante na apoptose celular (Gupta et al. 2006).

1.1.6. Resposta imune do hospedeiro

Diferente de outras infecções virais, a família *Herpesviridae*, bem como o HSV-1, tem a capacidade de persistir em um indivíduo imunocompetente pelo mecanismo de latência, dificultando a atuação da resposta imune contra o

vírus. A resposta imune consegue controlar a infecção pelo HSV-1 apenas quando o vírus está se multiplicando (infecção aguda) (Lang & Nikolich-Zugich 2005). Além da latência, várias proteínas expressas por genes do HSV-1 desempenham um papel ativo na redução ou bloqueio da resposta imune do hospedeiro. Várias são as ações realizadas pela resposta imune contra o HSV-1, envolvendo tanto a imunidade inata quanto a adquirida. Além disso, vários são os fatores que podem atuar como mecanismos de defesa do hospedeiro contra as infecções pelo vírus como a constituição genética do hospedeiro, células NK, macrófagos, linfócitos T, anticorpos e citocinas (Roizman et al. 2013).

A primeira linha de defesa contra a infecção causada pelo HSV-1 são os mecanismos da resposta imune inata, como interferons, macrófagos e células NK, enquanto ocorre a produção de anticorpos neutralizantes e linfócitos T (CD4+ e CD8+) (Egan et al. 2013). Mas a resposta imune adquirida também é necessária para o controle da infecção primária pelo HSV-1 (Roizman et al. 2013). A atuação da resposta imune inata é mais importante na infecção primária quando comparada com a infecção recorrente, pois quando ocorre a infecção recorrente, a atuação dos anticorpos e linfócitos T da resposta imune adquirida, ocorrem mais rapidamente (Cunningham & Mikloska 2001). O papel principal dos linfócitos B na infecção não é o de produção de anticorpos, mas sim de apresentação de antígenos e secreção de citocinas (Egan et al. 2013).

O sistema nervoso possui células com função semelhante à dos macrófagos, chamadas de micróglia. As micróglias são pequenas células da glia, encontradas no cérebro e na medula relacionadas à resposta imune inata no SNC expressando imunorreceptores importantes para a resposta imune no SNC (Gosselin et al. 2010; Graeber & Streit 2010). A micróglia, junto com os macrófagos e células dendríticas (DCs) imaturas, são responsáveis pelo reconhecimento inicial de patógenos invasores no SNC, como ocorre na infecção pelo HSV-1 (Esiri et al. 1995; Lokensgard et al. 2002; Marques et al. 2006). Essas células atuam ao reconhecer os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) do HSV-1, através de receptores Tol-like (TLRs) e, possivelmente, através de outros receptores para reconhecimento de padrões (PRRs) ainda não descritos (Aravalli et al. 2007; Kawai & Akira 2010). Os PRRs que reconhecidamente reconhecem as infecções pelo vírus incluem o

TLR2, TLR3, TLR9, os receptores RIG-I-like (RLRs), receptores NOD-like (NLRs), proteína 16 induzida por interferon- γ (IFI16), helicase Ku70, proteína 1 de ligação ao DNA (ZBP1), helicase DEAH box helicase 9, helicase DEAH box 36 e helicase DDX60 (Gantt & Muller 2013).

A infecção pelo vírus HSV-1 depende da resposta imune celular para ser controlada. O controle através da resposta imune celular ocorre por meio de células do SNC (micróglias e macrófagos) ou através de células infiltradas como monócitos, linfócitos TCD8⁺ e linfócitos TCD4⁺ (Lima et al. 2010; Marques et al. 2006; van Lint et al. 2004). Os macrófagos são extremamente importantes na encefalite herpética (HSE) causada pelo HSV-1. Um estudo demonstrou que, após serem inoculados com o vírus e ocorrer depleção dos macrófagos, camundongos C57BL/6 (naturalmente resistentes à infecção pelo HSV-1) tem um aumento em sua mortalidade (Lundberg et al. 2003). As DCs exercem importante papel ao reconhecer os patógenos mediados pelos TLRs (Janeway & Medzhitov 2002), aumentar a produção de IFN- γ pelas células NK *in vitro* e promover sua ativação *in vivo* (Zanoni et al. 2005).

Em um modelo experimental de úlcera da córnea herpética, sendo a córnea um órgão imunoprevilegiado como o cérebro, foi demonstrado que os linfócitos TCD8⁺ são extremamente importantes para a manutenção do mecanismo de latência do HSV-1 no gânglio trigeminal. O aumento da expressão da proteína PD-1, que indica exaustão dos linfócitos TCD8⁺, correspondeu ao aumento dos casos de úlcera de córnea herpética após diminuição do mecanismo de latência viral (Mott et al. 2009). Outro modelo de infecção por HSV-1, nesse caso um modelo subcutâneo, demonstrou que linfócitos TCD8⁺ são rapidamente drenados dos linfonodos regionais em direção ao local da infecção (Stock et al. 2011). Linfócitos TCD8⁺ específicos para o HSV parecem ser as células efetoras centrais no controle da infecção latente dos neurônios. Em camundongos, linfócitos TCD8⁺ são retidos em células dos gânglios sensoriais onde está ocorrendo infecção latente, bloqueando a reativação viral pela produção de IFN- γ . A redução de linfócitos TCD8⁺ nessas células pode ser vista em condições de estresse, levando à reativação viral (Gantt & Muller 2013).

As quimiocinas produzidas nos tecidos infectados são moléculas essenciais, pois são responsáveis pela migração dos leucócitos até o local da

infecção viral (Pease & Williams 2006; Wuest & Carr 2008). Após a infecção por HSV-1, foi verificada a presença de várias quimiocinas, como CCL5/RANTES, CCL2/MCP-1, CXCL10/IP-10 e CCL3/MIP-1 alfa, além da presença de citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IFN- γ (Cook et al. 2004; Lima et al. 2010; Wuest & Carr 2008).

Os IFN-I (dividido em IFN- α e IFN- β) e IFN-II (IFN- γ) são importantes no controle da infecção pelo HSV-1. A infecção pelo HSV-1 pode inibir a produção do IFN- α , principalmente pela ação de ICP27 (Johnson & Knipe 2010). O IFN- γ é um dos principais elementos envolvidos no controle da infecção, ativando macrófagos infectados por patógenos intracelulares e auxiliando na manutenção da resposta imune celular do tipo Th1 (Janeway et al. 2007; Vollstedt et al. 2004). O IFN- γ atua aumentando a produção do óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e também das ROS, sendo que é mais comum a produção do iNOS nos macrófagos e das ROS nos neutrófilos (Flannagan et al. 2009; Schroder et al. 2004). A síntese de óxido nítrico pela iNOS é importante para o controle da infecção, mas leva ao dano neuronal (Sheridan & Beck 2008). Além disso, estudos demonstram a importância do controle da infecção no gânglio trigeminal pelas moléculas TNF- α , IFN- γ e iNOS à partir da ação dos macrófagos (Kodukula et al. 1999). Mas quando a infecção atinge o cérebro, a micróglia se torna a célula mais importante na produção de iNOS (Marques et al. 2008).

Camundongos com IFN-I bloqueados por anticorpos neutralizantes apresentaram alta mortalidade ao serem infectados com baixas doses de HSV-1, o que demonstrou a importância das proteínas IFN-I no controle da infecção pelo vírus (Vollstedt et al. 2004). Estudos demonstraram que os IFN- β e IFN- γ atuam sinergicamente no controle da infecção por HSV-1, além de sugerirem que o IFN- γ atua como um inibidor de replicação viral mais potente que o IFN- β e que pode funcionar como um segundo sinal na ativação do estado celular antiviral (Sainz & Halford 2002). Já as proteínas IFN-III (IFN- λ), aumentam a indução da resposta imune inata mediada pela TLR3, elevando a proteção contra o HSV-1 no SNC (Li et al. 2012).

Em camundongos infectados pelo vírus HSV-1 por escarificação da córnea, ocorre aumento da produção da citocina TNF- α no gânglio trigeminal, no terceiro dia após a infecção. O TNF- α , atua mediando a resposta

inflamatória na infecção pelo HSV-1 (Ank et al. 2008). A partir do quinto dia após a infecção o título viral do HSV-1 no gânglio trigeminal atinge o seu ápice e são encontradas também IL-6 e IFN- γ , sendo o infiltrado celular no gânglio trigeminal basicamente formado por macrófagos e células dendríticas. No décimo quarto dia após a infecção, o vírus HSV-1 não é mais detectado e a produção de IL-6, TNF- α e IFN- γ diminui, dando lugar a citocinas que atuam controlando a infecção, como IL-4 (Shimeld et al. 1997).

Outro fator importante na resposta imune é a autofagia na resistência da infecção pelo HSV-1, particularmente nos neurônios, pois o vírus necessita escapar da autofagia para causar encefalite. Duas proteínas são importantes nesse processo: ICP34.5 (inibe a proteína autofágica celular Beclina-1) e US11 (inibe a quinase dependente de RNAfd (PKR), que atua induzindo a resposta autofágica) (Gantt & Muller 2013).

1.1.7. Patogênese

O principal método de transmissão do vírus ocorre pela exposição direta de mucosas, pele lesionada ou secreções mucosas de um indivíduo com infecção recorrente (Kleymann 2003; Nadelman & Newcomer 2000; Sciubba 2003). A transmissão pode ocorrer também a partir da exposição às secreções mucocutâneas de uma pessoa assintomática secretando o vírus na ausência da doença clínica (Sciubba 2003). Apesar do tropismo pelos gânglios existe a possibilidade da ocorrência de latência em outros tecidos, como a córnea (Liesegang 2001). O período de incubação do vírus na infecção primária varia de 1-28 dias (Mole et al. 1997). Anticorpos neutralizantes aparecem entre 4-7 dias após o começo da doença e tem seu pico em aproximadamente 3 semanas (Pellet & Roizman 2013).

A exposição inicial ao HSV-1 frequentemente leva à invasão das células epiteliais e à replicação intracelular no local da exposição primária. Após a ocorrência da infecção primária, o vírus se desloca até os nervos sensitivos do gânglio trigeminal, através de fluxo axonal retrógrado. Ao chegar ao gânglio trigeminal, o vírus entra em estado de latência (Arduino & Porter 2008; Miller et al. 1998; Preston 2000). A reativação leva à migração do vírus pelo caminho inverso a partir do gânglio trigeminal até a mucosa na qual ocorreu a exposição inicial (Cunningham et al. 2006; Hufner et al. 2006; Sciubba 2003) (Figura 1.4).

Infecções sistêmicas são raras, mas podem ocorrer principalmente em indivíduos imunossuprimidos ou em casos de infecções neonatais (Schmutzhard 2001).

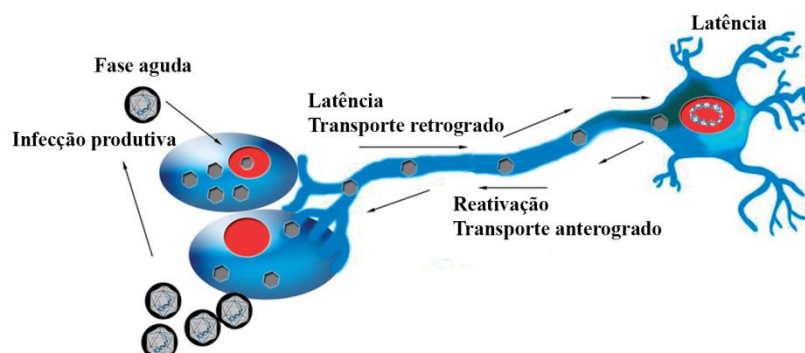


Figura 1.4 - Latência e reativação do HSV-1 Fonte: Modificado de Aurelian, 2008 (Aurelian 2008).

A replicação do vírus HSV-1 causa várias modificações patológicas na célula. Essas modificações levam à morte celular mediada pelo vírus e pela resposta inflamatória associada. A análise histopatológica de lesões epiteliais demonstra um aumento no tamanho das células infectadas e aparecimento de cromatina condensada nos núcleos seguidas da degeneração do núcleo celular (Arduino & Porter 2008; Roizman et al. 2013). O grau da patologia é parecido tanto na infecção primária quanto nas recorrências, variando apenas a gravidade da citopatologia. A resposta inflamatória tem menor intensidade em casos de recorrência da doença (Roizman et al. 2013).

1.1.8. Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas relacionadas à infecção pelo HSV-1 podem variar desde infecções assintomáticas passando por lesões vesiculares, herpes labial, gengivostomatite, ceratoconjuntivite, herpes neonatal, herpes genital e HSE (Figura 1.5) (Fatahzadeh & Schwartz 2007a). Além destes, o HSV-1 pode causar manifestações clínicas como: eczema herpeticum, HSV-1 visceral em imunocomprometidos, eritema multiforme e extensas lesões durante a quimioterapia (Schleiss 2009). As manifestações clínicas da infecção herpética estão relacionadas com as características clínicas, imunológicas e idade dos indivíduos infectados (Liesegang 2001).

As infecções assintomáticas podem ocorrer em qualquer faixa etária, mas ocorrem principalmente em crianças. Em boa parte dos casos, indivíduos que possuem infecção assintomática, podem transmitir o vírus normalmente, mesmo sem apresentar nenhum sintoma (Roizman et al. 2013). Indivíduos com infecção assintomática podem transmitir o HSV-1 a partir da saliva. A transmissão assintomática é reconhecida como a fonte mais importante de transmissão do HSV-1 (Koelle & Wald 2000), especialmente a transmissão do vírus aos parceiros sexuais via herpes genital (Tronstein et al. 2011).

Geralmente a infecção primária na região da mucosa oral ou no local primário da infecção leva ao aparecimento de erupções mucocutâneas vesiculares características da infecção pelo vírus HSV-1. Nas erupções vesiculares ocorre secreção ativa e consequente transmissão do vírus (Roizman et al. 2013). Os sintomas clínicos em casos de infecções primárias variam de infecção assintomática ou pela combinação de febre, lesões vesiculares ou ulcerativas, garganta inflamada, edema, linfadenopatia localizada, anorexia ou mal estar (Pellet & Roizman 2013). O período de incubação dura de 2-12 dias (Pellet & Roizman 2013).

A manifestação clínica mais comum da infecção pelo HSV-1 é a herpes labial, onde ocorre recorrência de lesões orolabiais. O aparecimento das lesões é precedido por um período prodrômico, caracterizado por vários sintomas locais como dor, queimação, coceira ou formigamento. Ocorre dor local em toda a evolução do herpes labial, mas ela é mais intensa no início da manifestação clínica. Esses sintomas duram menos de 6 horas, seguido pela formação de lesões vesiculares em 24 a 48 horas. Após a formação das lesões, estas evoluem para úlceras ou pústulas, que formarão uma crosta entre 72 a 96 horas após a infecção. A cura, em geral, ocorre espontaneamente entre 8 a 10 dias após o início do aparecimento das vesículas (Roizman et al. 2013).

A gengivoestomatite herpética ocorre na região da mucosa oral e tipicamente afeta os lábios, a língua, as gengivas, o palato duro e o palato mole. A recorrência da infecção por HSV-1 causando como manifestação clínica a gengivoestomatite herpética não é comum em pacientes saudáveis, mas pode ocorrer em pacientes imunocomprometidos, podendo ser mais extensa e/ou agressiva. A fase aguda da doença tem início abrupto, causando

sintomas que variam, podendo ocorrer febre, calafrios, náuseas, anorexia, irritabilidade, mal-estar, linfadenopatia submandibular e dor de cabeça (Kolokotronis & Doumas 2006).

As infecções oculares herpéticas são consideradas as maiores causas de morbidade visual no mundo (Remeijer et al. 2004). Em geral, a doença ocular herpética é unilateral em aproximadamente 98% dos casos de infecção primária (Souza et al. 2003). Dentre as doenças oculares herpéticas, a ceratoconjuntivite herpética é a causa mais comum de cegueira infecciosa em países desenvolvidos. Nessa manifestação clínica, o vírus infecta e se replica nas células epiteliais da superfície ocular (Carr et al. 2001). Na infecção primária ocorre tipicamente a blefaroconjuntivite (inflamação simultânea da conjuntivite e das pálpebras), acompanhada por pequenas lesões brancas na superfície da córnea. Além desses sintomas, a infecção pode levar à ocorrência de dor ocular, secura ocular e sinusite. Em grande parte dos casos, as infecções são resolvidas espontaneamente em poucas semanas. As infecções recorrentes podem ser mais severas, com o aparecimento de placas brancas formadas por lesões e ulceração dendrítica, localizada em células epiteliais infectadas. Além disso, ocorre perda de sensação nas áreas lesionadas, ocasionando anestesia córnea generalizada, secura ocular crônica, conjuntivite intermitente e sinusite crônica. Com a persistência da infecção, ocorre o aumento da concentração do DNA viral, acarretando em respostas imunológicas contra a expressão antigênica viral no estroma e consequente resposta autoimune nos olhos. Essa resposta autoimune pode resultar na destruição e perda da visão por opacificação da córnea, levando à necessidade de transplante de córnea (ceratoplastia) em boa parte dos casos (Carr et al. 2001; Suresh & Tullo 1999).

Pacientes que necessitam da ceratoplastia têm grande risco de problemas relacionados ao transplante (Thompson et al. 2003). O resultado do pós-operatório pode ser complicado pelos episódios recorrentes de HSV-1 e pela rejeição do enxerto (Ficker et al. 1988; Lomholt et al. 1995). Estudos anteriores demonstraram a ocorrência de 15% a 56% de rejeição no transplante de córnea em pacientes com ceratoconjuntivite herpética mundialmente (Barney & Foster 1994; Cohen et al. 1983; Tan et al. 2009). Em

relação ao Brasil, a rejeição de ceratoplastia ocorre em 36,8% dos casos (Araújo et al. 2002).

A herpes neonatal pode ser adquirida de três maneiras: *in útero* (5%), perinatal (85%) e pós-parto (10%). Cinco fatores influenciam a passagem do HSV da mãe para o neonato: tipo de infecção materna (primária *versus* recorrente), status do anticorpo materno, duração da ruptura das membranas, integridade das barreiras mucocutâneas, tipo de parto (cesariana *versus* parto natural). Um fator de risco bastante importante para a herpes neonatal é a presença de infecção genital pelo HSV em mães que apresentam infecção primária da doença perto do fim da gravidez. Nesse caso, mães que apresentaram infecção primária da doença têm 60% de risco de transmitir o vírus para seus filhos, comparado com 25% de risco de mães com infecção recorrente. Esse risco aumentado tem relação tanto pelas baixas concentrações de anti-HSV transplacentárias em mulheres com infecção primária e altas quantidades de HSV que são secretados por longos períodos de tempo no trato genital materno (Kimberlin 2007). A herpes neonatal pode evoluir para HSE, infecção limitada localmente (limitada à pele, boca e olhos) e forma disseminada (envolve o fígado, glândula adrenal e pulmão) que se assemelha ao quadro de sepse bacteriana (Kurt-Jones et al. 2004).

A herpes genital é a infecção sexualmente transmitida mais comum mundialmente, sendo responsável por considerável morbidade pelo aparecimento de úlceras genitais. Essas lesões duram em média três semanas (Pellet & Roizman 2013). São comuns o aparecimento de sintomas como parestesia (sensações cutâneas subjetivas, como frio, calor ou formigamento) e disestesia (alteração da sensibilidade local). As infecções primárias podem ser associadas com febre, disúria, adenopatia inguinal localizada e mal estar. Essa manifestação clínica é fonte importante de transmissão vertical do HSV da mãe para o filho e representa um fator de risco para a aquisição e transmissão do HIV (Fleming & Wasserheit 1999; Wald et al. 1993). Antigamente, as infecções genitais causadas pelo vírus HSV-2 eram reconhecidas como a causa mais frequente de herpes genital (Wald et al. 1995), mas estudos posteriores demonstraram que as infecções genitais causadas pelo vírus HSV-1 vem aumentando consideravelmente (Lafferty et al. 2000). Esse aumento tem levado a uma significativa mudança na epidemiologia das infecções genitais por

HSV, ocorrendo substituição do HSV-2 pelo HSV-1 como causa mais comum da infecção (Bernstein et al. 2013). Os possíveis fatores para essa substituição são as baixas taxas atuais de infecções orais por HSV-1 em crianças e a consequente baixa imunidade à infecções genitais por HSV-1 transmitidas sexualmente ou a mudança no comportamento sexual consequentemente levando ao aumento do contato oral-genital (Pena et al. 2010). Por esse motivo, a herpes genital se encontra altamente associada com grupos de comportamento de risco como o grupo de homens que fazem sexo com homens (HSH).

Pacientes imunocomprometidos, seja por terapia imunossupressora, pela ação de outras doenças (principalmente HIV), transplantes ou má nutrição têm maior risco de sofrerem infecções graves por HSV-1. Nesses casos, há maior probabilidade da ocorrência de infecções mais graves, podendo ocorrer aumento de lesões ulcerativas ou o aparecimento de HSE (Pellet & Roizman 2013).

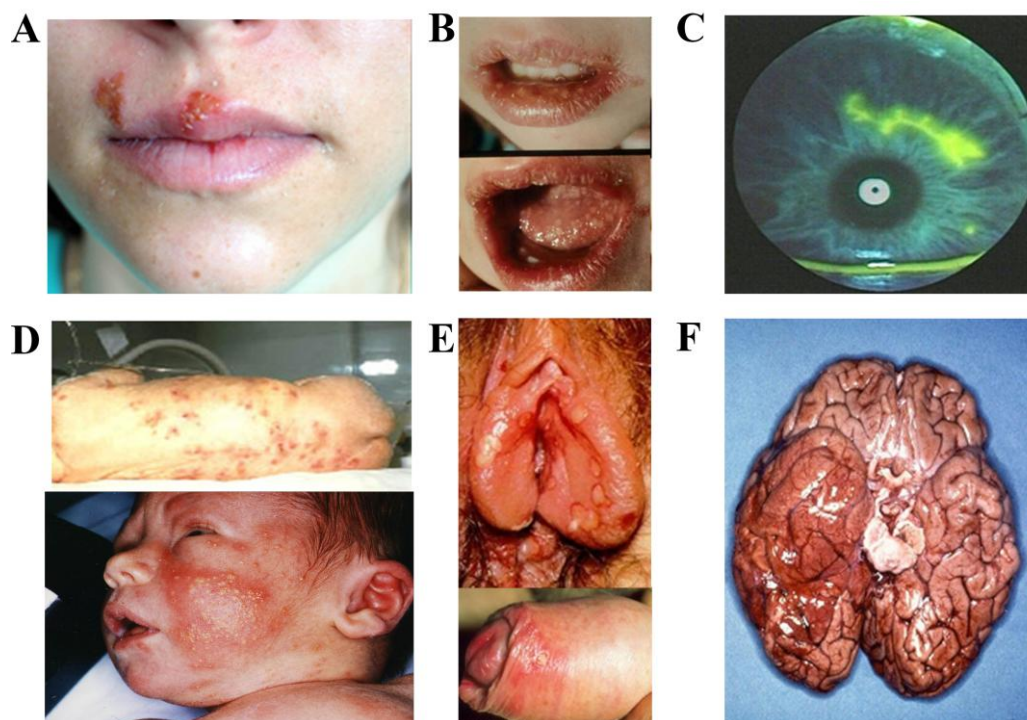


Figura 1.5 – Manifestações Clínicas do HSV-1. (A) Recorrência da infecção; (B) Gengivoestomatite herpética em criança; (C) Olho com Ceratoconjuntivite herpética; (D) Herpes neonatal; (E) Herpes genital acometendo a vulva e o pênis; (F) Cérebro acometido por encefalite herpética. Fonte: Whitley, 2001 (Whitley & Roizman 2001), <http://www.cureforherpes.org>, <http://www.sciencephoto.com> e <http://www.pathguy.com> (modificado).

1.1.9. Epidemiologia

A infecção pelo vírus HSV-1 está entre as infecções virais humanas mais comuns no mundo todo, com prevalência de 70% a 90% em adultos (Dalkvist et al. 1995; Miller et al. 1998; Rabenau et al. 2002; Stock et al. 2001). Não há variação sazonal na incidência das infecções, principalmente pela característica do vírus em se tornar latente no gânglio trigeminal, o que proporciona a ocorrência de infecções recorrentes de herpes e torna a transmissão do vírus possível em qualquer época do ano (Roizman et al. 2013). O vírus é frequentemente transmitido horizontalmente durante a infância, mas ocorre aumento significativo com o aumento da idade (Cowan et al. 2003; Looker & Garnett 2005).

No Brasil, estudos soropidemiológicos encontraram prevalência de 67,2% de anticorpos anti-HSV-1 na população, mas a notificação das infecções pelo vírus não é mandatória e há poucos trabalhos sobre sua prevalência. Por isso, acredita-se na existência de uma maior prevalência da infecção no Brasil (Clemens & Farhat 2010; Cowan et al. 2003; Da Rosa-Santos et al. 1996). Estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que a cada ano são encontrados mais de 640.000 novos casos de herpes genital no Brasil (Ministério da Saúde 2015). No Rio de Janeiro, foi demonstrado soropositividade para HSV-1 em 50% da população com 7 anos de idade, em 75% da população com 15 anos de idade e em 95% da população com 30 anos de idade (Cowan et al. 2003). Além disso, um estudo contemplando outras cidades além do Rio de Janeiro (Porto Alegre, Fortaleza e Manaus) demonstrou resultados similares, com soropositividade de 56,6% em indivíduos entre 6-10 anos, de 70,1% entre indivíduos de 11-15 anos e de 83,8% entre indivíduos com 31-40 anos (Clemens & Farhat 2010).

Os principais fatores que influenciam a infecção por HSV-1 são a idade, condição socioeconômica e localização geográfica. Em países em desenvolvimento e populações de baixo nível socioeconômico, a infecção ocorre em indivíduos mais novos, diferente do que ocorre em sociedades industrializadas e em indivíduos de classe média, pois estes adquirem esse vírus quando mais velhos (Pellet & Roizman 2013). Em mais de 90% dos casos de crianças infectadas pelo HSV-1, a infecção ocorre de forma assintomática. A

prevalência da infecção de HSV-1 aumenta com a idade, chegando ao ápice por volta dos 30 anos de idade (Looker & Garnett 2005). Os sítios mais comuns de infecção são os lábios e a boca, porém qualquer órgão pode ser infectado pelo vírus (Roizman et al. 2013).

A importância da infecção por HSV-1 cresce ao se avaliar os grupos de comportamento sexual de risco como o grupo de homens que fazem sexo com homens (HSH) e o grupo de mulheres profissionais do sexo. Um estudo que relacionava a herpes genital encontrada em indivíduos do grupo HSH no Reino Unido demonstrou que 50% dos casos de infecções primárias de herpes genitais são causados por HSV-1 (Hill et al. 2009). O comportamento sexual de risco pode aumentar a exposição ao vírus e causar herpes genital, que é um fator de risco para a infecção por HIV (Fleming & Wasserheit 1999; Wald et al. 1993).

Existe pouca informação acerca da variabilidade genética do vírus HSV-1 (Norberg et al. 2007). Os trabalhos existentes de caracterização molecular desses vírus foram realizados, principalmente, em países desenvolvidos como Alemanha, Irlanda, Holanda e Suécia (Duan et al. 2008; Norberg et al. 2007; Rose & Crowley 2013; Schmidt-Chanasit et al. 2010), porém existem poucas informações sobre a evolução das cepas circulantes em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Até o presente momento não existem relatos na literatura de trabalhos de caracterização dos genótipos circulantes no Brasil.

1.1.10. Prevenção e controle do vírus Herpes simplex 1

Medidas de prevenção da infecção pelo HSV-1 e hábitos de higiene devem ser ensinadas aos adolescentes e grupos de risco como o grupo de homens que fazem sexo com homens. O uso do preservativo é importante para a prevenção da Herpes genital e da Herpes neonatal, sendo obrigatório no caso de mulheres grávidas. No caso de suspeita de infecção primária, deve-se optar por cesariana. Profissionais da área de saúde devem ser afastados do trabalho se apresentarem lesões nos lábios ou nas mãos para que não transmitam a doença para pacientes imunossuprimidos, bebês ou gestantes (Miranda 2002).

Até o momento não existem vacinas eficientes para o controle da infecção pelo HSV-1, principalmente pelas características do vírus de ser neurovirulento e de entrar em latência no SNC, mas vários trabalhos estão sendo realizados, principalmente utilizando vacinas virais selvagens, vacinas de vírus inativados, vacinas de subunidades virais, vacinas de HSV-1 recombinantes e vacinas que utilizam vetores virais para entrega dos antígenos virais (Pellet & Roizman 2013).

Existem vários fármacos utilizados no tratamento anti-herpético. Os antivirais mais importantes no tratamento da infecção pelo HSV-1 são os análogos de nucleosídeos, sendo o aciclovir (ACV) considerado como antiviral mais importante no tratamento das infecções pelo vírus HSV-1. O ACV, como outros antivirais anti-herpéticos (valaciclovir, fanciclovir, penciclovir e ganciclovir, por exemplo) são análogos de guanosina (De Clercq 2004). Após sua entrada na célula, o ACV é seletivamente convertido para aciclo-guanosina monofosfato (aciclo-GMP) pela TK viral, que tem maior efetividade na fosforilação de nucleosídeos do que as quinases celulares. Posteriormente, a forma monofosfatada é difosforilada e trifosforilada pelas TK celulares. A forma trifosfatada é um inibidor competitivo da DNA polimerase viral (pol), uma enzima essencial para o ciclo replicativo viral (Dambrosi et al. 2010). O aciclovir tem, aproximadamente, 100X mais afinidade pelas TK virais do que pelas TK celulares (Wilson et al. 2009). Após ser trifosfatado, ele é capturado pela DNA polimerase viral e ligado à fita de DNA viral nascente, o que resulta na terminação de cadeia da fita de DNA pela ausência da 3'-OH (Coen 1996; De Clercq 2004) (Figura 1.6). O ACV tem efeito inibitório também contra outros herpesvírus, como o vírus *Varicela-zoster* e *Epstein-Barr* (De Clercq 2004). O ACV, valaciclovir e fanciclovir são eficazes no tratamento tanto da infecção genital primária quanto da infecção recorrente pelo HSV-1. O ACV intravenoso é utilizado rotineiramente na infecção por HSV-1 que pode causar doença progressiva e/ou com risco de morte. O valaciclovir e fanciclovir são úteis no controle de infecções por HSV em indivíduos com HIV/AIDS (Pellet & Roizman 2013).

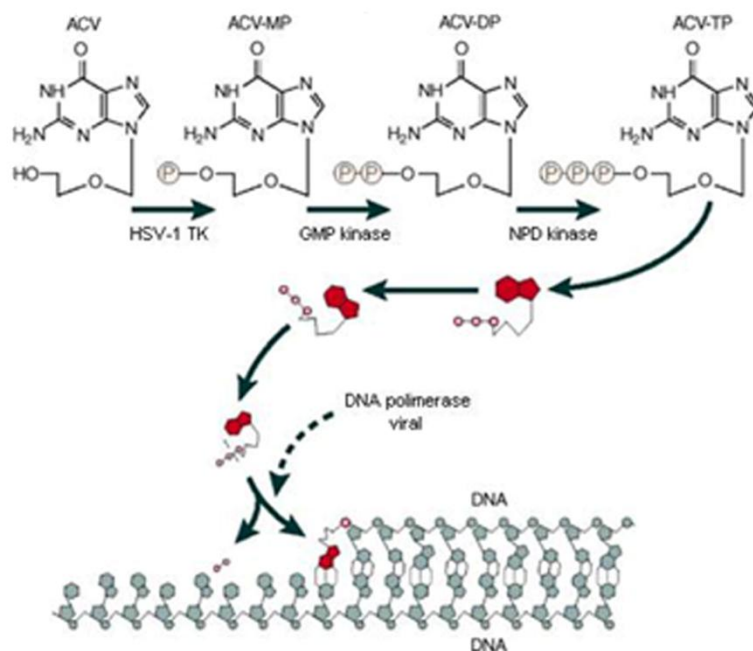


Figura 1.6 - Mecanismo de ação do aciclovir na replicação do HSV-1. Após o antiviral ser monofosfatado pela TK viral, ele é difosfatado e trifosfatado pelas quinases celulares e inserido na cadeia crescente de DNA viral pela DNA polimerase viral. Fonte: Modificado de De Clercq, 2004 (De Clercq 2004).

Outro antiviral utilizado contra a infecção pelo HSV-1 é o foscarnet, um ácido fosfonofórmico. O foscarnet é um inibidor não-competitivo direto da DNA polimerase viral que não requer fosforilação prévia pelas quinases virais (Dambrosi et al. 2010). Tem ação principalmente em cepas de HSV TK deficientes, que são resistentes ao aciclovir (De Clercq 2001).

Embora existam muitos medicamentos antivirais disponíveis, o emprego contínuo destes, acarreta a seleção de cepas resistentes. A resistência ao ACV pode ocorrer, principalmente, por deficiência ou alteração da TK viral (Gilbert et al. 2002), além de mutação na DNA polimerase viral (Wilson et al. 2009). Em pacientes imunocompetentes, a resistência do HSV-1 ao aciclovir não é um problema clinicamente importante. Estudos mostraram que 0,1% a 0,6% dos isolados do HSV-1 recuperados, tanto de indivíduos tratados quanto de não tratados, sofrem de um fenótipo de resistência ao ACV, que parece refletir na ocorrência natural de mutantes deficientes de TK em uma população viral (Gilbert et al. 2002). Cepas de HSV-1 resistentes ao aciclovir (como cepas TK deficientes) são encontradas, principalmente em pacientes

imunocomprometidos e esses isolados tem sido associado com doenças persistentes e/ou disseminadas (Coen 1996; Gilbert et al. 2002; Kimberlin et al. 1996). Nas poucas pesquisas clínicas reportadas, a taxa da resistência ao aciclovir tem variado de 4,3% a 14% entre todos os grupos imunocomprometidos (Christophers et al. 1998).

Em geral, os antivirais também apresentam toxicidade celular em maior ou menor grau, principalmente quando ocorre administração prolongada. A administração do aciclovir pode estar associada à anemia sem neutropenia, cefaléia, disfunção hepática, falência renal e neurotoxicidade (Ernst & Franey 1998; Johnson et al. 1994; Lyon et al. 2002). Além disso, o antiviral apresenta baixa solubilidade em água e baixa biodisponibilidade por via oral, o que determina um possível aproveitamento de menos de 10% da dose administrada oralmente e leva à necessidade de aplicação pela via sistêmica que é mais dispendiosa (De Clercq & Field 2006). O ganciclovir, como outros análogos nucleosídicos pode ser carcinogênico, causar neurotoxicidade e supressão da medula óssea (Liu et al. 2004a; Wutzler & Thust 2001). O foscarnet também apresenta toxicidade celular, principalmente por ser nefrotóxico. Sua bioavaliabilidade oral é baixa, sendo avaliável somente em formulações intravenosas (Wilson et al. 2009).

1.2. Encefalite herpética

1.2.1 Características da Encefalite herpética

Em alguns casos, principalmente em pacientes imunocomprometidos, o HSV-1 pode ser reativado e direcionado ao SNC, principalmente ao cérebro, causando assim um quadro de HSE (Conrady et al. 2010). A via mais comum para atingir o SNC ocorre a partir do nervo olfatório e a maioria dos casos de encefalite herpética ocorre por reativação viral (Whitley 2006). A HSE pelo HSV-1 tem uma predileção pelos lobos frontal e temporal, mas, ocasionalmente, afeta o tronco cerebral (Livorsi et al. 2010).

A HSE, causada pelos vírus HSV-1 e HSV-2 é a causa mais comum de encefalite nos países ocidentais, com incidência variando de 1-4 casos por milhão de habitantes ao ano (De Tiege et al. 2008). Um terço dos casos dessa encefalite viral ocorre em indivíduos acima de seis meses de idade e

adolescentes. Além disso, 50% dos casos ocorrem em adultos acima de 50 anos. Estima-se que 10% dos pacientes com HSE apresentem histórico de recidiva e que um terço dos casos são decorrentes de infecção primária (Whitley 2006).

Essa encefalite viral se apresenta como um processo de encefalite aguda associada ao desenvolvimento rápido e espontâneo de febre, nível reduzido de consciência, distúrbio comportamental, sintomas neurológicos focais e sinais como crise convulsiva ou déficit motor. A encefalite herpética pode causar também sinais meníngeos como rigidez cervical, cefaléia, vômito em jato e fotofobia (De Tiege et al. 2008; Kimberlin 2007; Kneen et al. 2010). Em pacientes imunocomprometidos, como pacientes com HIV, as reincidências são mais frequentes e mais extensas (Sancho-Shimizu et al. 2007), aumentando a morbidade da doença. Se não tratada, a HSE pode levar ao óbito em 70% dos casos, e, dos sobreviventes, apenas 2%-3% retornam à função neurológica normal (Baringer 2008; Kimberlin 2007). As sequelas neuronais mais comuns apresentadas são: afasia (dificuldade de formação e compreensão da linguagem), amnésia, mudanças comportamentais, crise convulsiva, além de dificuldades cognitivas, motoras e sensoriais (Armien et al. 2010; Kimberlin 2007). Estas sequelas podem ocorrer mesmo em pacientes tratados (Riera-Mestre et al. 2009).

A infecção causada pela HSE leva à lesões em decorrência da replicação do HSV-1 nos neurônios e células da glia, além da resposta inflamatória desenvolvida pelo hospedeiro (Lokensgard et al. 2002; Sellner et al. 2005). A HSE, na maior parte dos casos, resulta em lesões hemorrágicas e necróticas na região fronto-temporal (Conrady et al. 2010). A longo prazo, a HSE pode causar prejuízos que correspondem às lesões permanentes que afetam os núcleos amigdaloides, hipocampo, ínsula e giros orbital e cingulado (Armien et al. 2010). Para o HSV-1 conseguir se alojar, penetrar e multiplicar no SNC, o vírus deve chegar ao SNC e conseguir evadir a resposta imunológica local (Tan & Katze 2000).

A HSE ocorre em 35% dos indivíduos neonatos infectados pelo HSV-1, levando à lesão neurológica progressiva. Acredita-se que isso ocorra como resultado do acúmulo de danos causados por reativações frequentes do HSV-1 no cérebro (Simmons 2002).

1.2.2. Tratamento da Encefalite herpética

A idoxuridina foi o primeiro agente antiviral estudado clinicamente para a HSE, mas foi visto que ele era ineficiente e tóxico para o tratamento da infecção (James et al. 2009). A vidarabina se mostrou mais tolerável que a idoxuridina e reduziu a mortalidade por HSE para 54%, com 86% dos indivíduos sobreviventes sofrendo algum tipo de dano neurológico (Whitley 1986).

Se o diagnóstico para HSE for positivo, o paciente é tratado com o aciclovir a cada 8 horas, durante 14 dias (Arduino & Porter 2006; Kennedy 2005; Kimberlin 2007; Kneen et al. 2010). No caso de se tratar de pacientes imunossuprimidos, o tratamento pode se estender por até 21 dias (Chaudhuri & Kennedy 2002; Kennedy 2004). Mesmo com a utilização de terapia antiviral, ainda ocorre mortalidade em 19% dos pacientes e morbidade substancial. O tratamento com ACV pode causar insuficiência renal, diarreia, náusea, convulsões, alucinações, cefaléia, disfunção hepática e coma em 62% dos sobreviventes (Ernst & Franey 1998; Kimberlin 2007; Riera-Mestre et al. 2009). A severidade da imunossupressão e do uso prolongado deste antiviral pode ainda induzir resistência ao ACV (Gilbert et al. 2002). De fato, em indivíduos imunocompetentes a resistência ao ACV é de 0,7% e, em imunossuprimidos, a resistência é de 4 a 7% (Bacon et al. 2003).

Em caso de resistência ao aciclovir é utilizado o análogo de pirofosfato foscarnet (Bacon et al. 2003; Dambrosi et al. 2010; Gilbert et al. 2002) que tem pouca bioavaliabilidade e pode provocar ainda alta toxicidade renal, anemia sem neutropenia, náusea, vômito, cefaléia e distúrbios no SNC (Brown et al. 2002; Fatahzadeh & Schwartz 2007a; Steiner et al. 2007). A resistência e toxicidade encontrada nos atuais fármacos para o tratamento da encefalite herpética e alta mortalidade causada pela doença tornam imprescindível o desenvolvimento de novas terapias antivirais.

1.2.3. Modelos animais no estudo da encefalite herpética

Modelos experimentais de HSE são importantes para avaliar a doença e o uso de antivirais *in vivo*. Os animais mais utilizados para o estudo da infecção pelo HSV-1 *in vivo* são as cobaias, os coelhos e os camundongos. Para que a

infecção ocorra *in vivo*, após a inoculação do vírus infeccioso, deve ocorrer replicação do vírus na região periférica e posterior transporte retrógrado do vírus até os neurônios ganglionares, seguidos pelo estabelecimento da latência (Whitley & Roizman 2001).

Como todo modelo experimental de infecção, ocorrem diferenças entre os modelos animais utilizados na infecção do HSV-1. As cobaias são importantes modelos para infecções genitais do vírus HSV-2 e se reativam espontaneamente quando infectados pelo HSV-1. Já em coelhos, tanto o HSV-1 quanto o HSV-2 são capazes de se reativar espontaneamente. A reativação é bastante estudado no modelo de infecção ocular em coelhos, pois o vírus é facilmente detectado na secreção lacrimal desses animais (Whitley & Roizman 2001). A reativação espontânea em camundongos é bastante rara, geralmente o que ocorre é a produção de antígenos do HSV-1 sem produção de partículas infecciosas durante o estado de latência (Gebhardt & Halford 2005). Vários estudos em modelo experimental de infecção herpética em camundongos demonstraram que as diversas linhagens de camundongos diferem quanto à susceptibilidade ao vírus (Whitley & Roizman 2001).

Os modelos experimentais utilizados para estudar a infecção pelo vírus HSV-1, em geral, ocorrem por vias de inoculação comuns à infecção pelo HSV-1 em humanos, como inoculação da pele ou mucosas, mas nem sempre essas vias de inoculação mimetizam a patogênese viral em humanos. Vários são os fatores para que os animais desenvolvam encefalite herpética letal ou infecções assintomáticas, como idade, sexo, imunocompetência, via de infecção, imunização prévia com HSV-1, bem como isolado viral e linhagem animal (Dix et al. 1983; Enquist et al. 1998; Hatano 1989; Itoyama et al. 1991; Kastrukoff et al. 1987, 1988; Kristensson et al. 1983; Kristensson et al. 1979; Kristensson et al. 1978; Lopez 1975; Morrison & Knipe 1997; Sabin 1938; Slavin & Berry 1943; Townsend 1981a, 1981b, 1985; Townsend & Baringer 1979; Wakisaka et al. 2002; Whitley & Roizman 2001). A origem genética também pode ser um fator preponderante na encefalite herpética pelo vírus HSV-1 (Sancho-Shimizu et al. 2007).

Camundongos infectados pelo vírus e que apresentam HSE, geralmente apresentam sinais clínicos que incluem ataxia, perda de peso, postura

arqueada, dificuldade de locomoção, ceratoconjuntivite, pelo eriçado, tremores e convulsões (Kopp et al. 2009; Vilela et al. 2010) (Figura 1.7)

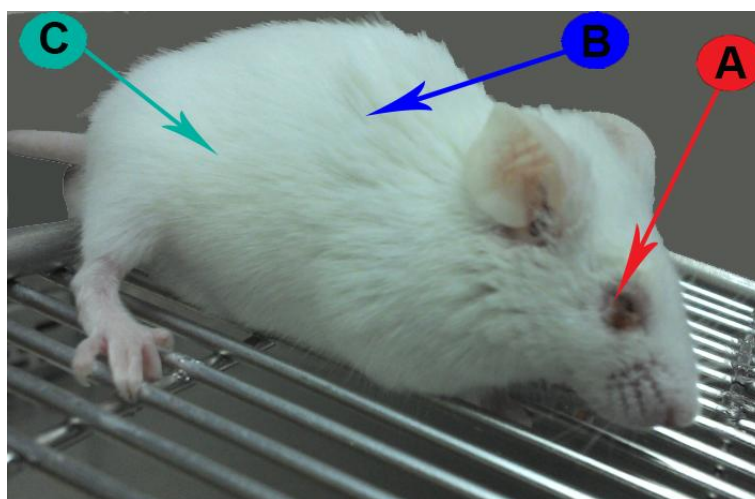


Figura 1.7 - Manifestações clínicas da encefalite herpética em camundongos BALB/c inoculados com a cepa HSV-1 EK. (A) Ceratoconjuntivite; (B) Pelo eriçado; (C) Costas arqueadas. Fonte: Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (Fiocruz-IOC).

Quando camundongos são infectados com HSV-1 pela via intranasal, animais suscetíveis como BALB/c (Drummond et al. 1994; Esiri 1982; McLean et al. 1993; Tomlinson & Esiri 1983), SJL/J, A/J e PL/J desenvolvem HSE (Kastrukoff et al. 2012). Além disso, o isolado viral de HSV-1 é importante para o aparecimento dos sinais clínicos da doença. Alguns isolados de HSV-1 como o isolado F (Itoyama et al. 1991; Kristensson et al. 1983; Kristensson et al. 1979; Kristensson et al. 1978), McKrae (Mott et al. 2011) ou isolado 2 (Kastrukoff et al. 2012) desenvolvem sinais de HSE, o que possibilita a análise da evolução da HSE *in vivo* ou o estudos de novos antivirais em potencial.

Dois linhagens de camundongos são bastante utilizadas no modelo de encefalite herpética causada pelo HSV-1, os camundongos BALB/c e C57BL/6. Os camundongos C57BL/6 são mais resistentes à infecção herpética pelo HSV-1 do que outras linhagens. Estudos anteriores demonstraram que animais C57BL/6 sobrevivem à inoculação intraperitoneal de 10^6 UFP do HSV-1, enquanto, após a inoculação com 10^4 UFP do HSV-1 ocorre a morte de animais da linhagem BALB/c (Lopez 1975). Foi verificado que linhagens de camundongos BALB/c, suscetíveis ao desenvolvimento de HSE, morrem após apresentarem sinais semelhantes à encefalite, o que sugere que a causa de

sua morte seja a disseminação viral pelo SNC. Nesse mesmo estudo, camundongos BALB/c e C57BL/6 não apresentaram diferença significativa em relação à replicação, disseminação e estabelecimento de latência do HSV-1, apesar dos animais BALB/c apresentarem maior suscetibilidade à infecção viral (Halford et al. 2004).

Em relação ao sexo dos animais, camundongos BALB/c machos são mais suscetíveis ao desenvolvimento de HSE em comparação às fêmeas da mesma idade e linhagem, mas esta diferença diminui drasticamente quando são deletadas determinadas sequências dos genes LATs (Jones et al. 2005). Já em relação à idade, animais mais jovens são mais suscetíveis à infecção do que animais adultos (Jones et al. 2005). A via de inoculação do vírus também influencia no desenrolar da doença, pois inoculações pelas narinas, patas ou intracerebral levam à ocorrência de aumento na mortalidade e das lesões quando comparadas com inoculações na região oral (Jones et al. 2005; Lewandowski et al. 2002).

A cinética da infecção por HSV-1 é bastante variável e depende dos parâmetros descritos anteriormente. Estudo anterior comparou a inoculação labial de 10^7 UFP/ml do HSV-1 em camundongos da linhagem BALB/c e ratos da espécie *Sigmodon hispidus* (Lewandowski 1997). A partir do 2º dia após a infecção, houve formação de lesões no local onde ocorreu o inóculo, mas nos camundongos as lesões eram maiores e persistiram por mais tempo do que nos ratos. Os títulos virais encontrados no cérebro desses animais apresentaram concentrações semelhantes (aproximadamente 600 UFP encontrados entre o 4º e o 6º dia após a infecção), mas foram encontradas concentrações virais muito maiores em camundongos quando avaliadas as concentrações virais presentes nos lábios e gânglios trigeminiais. A cinética da infecção também variou entre as espécies. No gânglio trigeminal, a replicação se iniciou no 2º dia após a infecção para as duas espécies. O pico da infecção no gânglio trigeminal foi encontrado no 5º dia após a infecção em camundongos (6000 UFP), mas em ratos o pico da infecção ocorreu no 4º dia após a infecção (70 UFP) declinando drasticamente no 6º dia após a infecção (Lewandowski 1997).

A inoculação pela via intracraniana e intracerebral em camundongos também é utilizada para o estudo da HSE, mas é extremamente invasiva,

estressante e dolorosa para o animal, além das técnicas de inoculação do vírus serem mais difíceis de serem executadas (Turner et al. 2011). Esses modelos experimentais produzem sinais observáveis da doença poucos dias após a infecção e provocam mais facilmente sinais da doença em animais resistentes como camundongos C57BL/6 (Vilela et al. 2009).

Os modelos de inoculação do HSV-1 via intranasal são modelos bastante úteis de HSE, pois são modelos bastante parecidos com a via de infecção hipotética para a entrada do vírus no SNC via tecidos olfatórios, até sua chegada ao gânglio trigeminal (Esiri 1982; Johnson & Valyi-Nagy 1998). Após a inoculação via intranasal, o vírus se replica no epitélio e nas mucosas do animal. Posteriormente ele alcança as terminações nervosas e é transportado pela via axonal retrógrada até os gânglios do camundongo. Nos gânglios, ocorrem novas etapas de replicação viral e, possivelmente, controle da infecção viral pela resposta imune, acarretando a latência. No caso da utilização de camundongos sensíveis, as partículas virais podem alcançar o cérebro e se multiplicar, levando à ocorrência da HSE (Lima et al. 2010; Mansur et al. 2005). Além disso, os modelos experimentais que utilizam a via intranasal têm sido empregados para avaliar a eficácia da vidarabina e aciclovir no tratamento da infecção pelo HSV-1 (Kern et al. 1982; Kern et al. 1986).

1.3. RNA de interferência

1.3.1. Silenciamento gênico

Trabalhos que relatavam a inibição da expressão gênica foram iniciados em 1978 através de estudos utilizando oligonucleotídeos antisense (ODN) (Stephenson & Zamecnik 1978; Zamecnik & Stephenson 1978). A partir de 1980, foram obtidas maior estabilidade no uso dos ODNs e a técnica de silenciamento gênico começou a ser melhor estudada (Gleave & Monia 2005). Ao mesmo tempo, na década de 80 se descobriu ativos de RNAs catalíticos, chamados de ribozimas (Guerrier-Takada et al. 1983; Kruger et al. 1982), demonstrando que a molécula de RNA, além de transferir a informação genética, pode possuir ação enzimática. As ribozimas possuem várias ações, dentre elas a quebra de ligações covalentes, o que poderia ser utilizado como uso terapêutico contra patógenos. Contudo, a utilização dessas

moléculas como terapia encontra vários problemas, como sua difícil entrega ao tecido/ célula alvo e baixa estabilidade (Aigner 2006a).

Em 1983 apareceram as primeiras evidências do silenciamento gênico pela ação de interferência por RNA (RNAi). Essas evidências apontavam para o silenciamento gênico do fungo *Aspergillus flavus* a partir da ação de RNAfd (Schmidt 2004). Em 1990, foi publicado um estudo que tinha como objetivo aumentar a expressão do gene *chs*, responsável pela produção de antocianinas (proteínas relacionadas com a pigmentação púrpura) em petúnias, a partir da inserção de cópias adicionais de homólogos deste gene. O resultado desse estudo foi totalmente inesperado, pois a expressão do gene endógeno, ao invés de aumentar, foi parcialmente ou totalmente bloqueado, dando origem a petúnias de coloração variada ou totalmente brancas. Tal fenômeno foi denominado na época de “*co-supressão*” (Napoli et al. 1990) (Figura 1.8). Esse trabalho é reconhecido como a primeira observação da ação do RNAi, apesar de van der Krol e colaboradores terem publicado resultados semelhantes na mesma época (van der Krol et al. 1990).

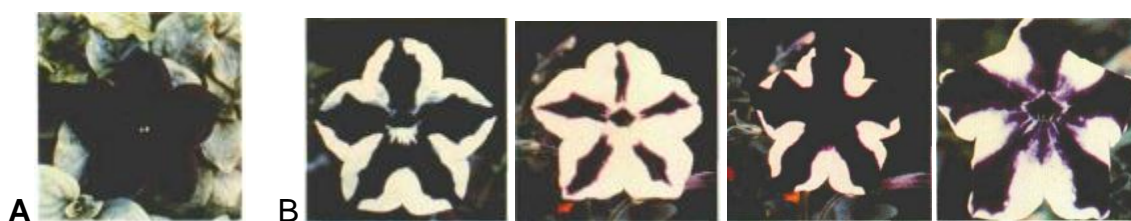


Figura 1.8: Estudo de co-supressão em petúnias. (A) Fenótipo parental de Petúnias; (B) Fenótipos variados após o fenômeno de “*co-supressão*”. Modificado de Napoli, 1990 (Napoli et al. 1990).

Posteriormente, novos estudos evidenciaram no fungo *Neurospora crassa* a ocorrência do mesmo fenômeno, no qual a inserção de cópias homólogas ao gene albino-1 (*al-1*), relacionado a produção de carotenóides, diminuiu a expressão do seu correspondente endógeno. Assim, a baixa produção de carotenóides levou à produção de colônias fúngicas brancas (ou amarelo pálidas) ao invés de colônias fúngicas alaranjadas, o que aconteceria se houvesse aumento da produção de carotenóides. Por ausência de hipóteses que explicassem o fenômeno, este foi denominado *quelling* (Cogoni et al. 1996;

Romano & Macino 1992). Ensaios adicionais demonstraram que o *quelling* era totalmente reversível (Cogoni et al. 1996).

O processo conhecido como *RNA interference* ou interferência mediada por RNA foi descrito pela primeira vez no nematódeo *Caenorhabditis elegans* em 1998 (Fire et al. 1998), quando se observou que a presença de apenas algumas poucas moléculas de RNAfd eram capazes de inibir a expressão de um determinado gene com sequência similar ao RNAfd de *C. elegans*. Os estudos do grupo responsável pela descoberta utilizou tipos de moléculas de RNAs diferentes (RNAs senso, RNAs antisenso e RNAfd), para tentar descobrir qual tinha maior ação de silenciamento gênico. Após vários experimentos, eles demonstraram que o RNAfd tinha uma ação supressora mais potente e específica em relação à administração das fitas isoladas. Assim, ficou claro a existência de um processo de regulação gênica mediado por RNA, até então não caracterizado. O estudo rendeu a Andrew Z. Fire e Craig Z. Mello, autores do estudo, o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 2006.

Posteriormente, descobriu-se que o RNAi não se restringe a um organismo específico, mas sim, embora inicialmente descrito, sob diferentes nomes (silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS), co-supressão), parece estar presente na maioria dos organismos eucariontes (Aigner 2006b). O RNAi foi reconhecido como um conservado mecanismo de PTGS, envolvido no sistema de defesa de certos organismos. Desta maneira, RNAs estranhos à célula seriam reconhecidos, identificados e inibidos (Agrawal et al. 2003).

1.3.2. Moléculas envolvidas no silenciamento por RNA

Atualmente existem diversas classes de RNAs compostos por poucos nucleotídeos, chamados de pequenos RNAs que não codificam informações gênicas, como: short hairpin RNA (shRNA) (Takahashi et al. 2009; Yao et al. 2009), micro RNA (miRNA) (Reischl & Zimmer 2009; Takahashi et al. 2009), piwi-interaction RNA (piRNA) (Choudhuri 2009) e small interfering RNA (siRNA), além de outras moléculas. Todas essas classes podem influenciar diferentes aspectos do funcionamento genômico em eucariotos, incluindo proliferação celular e apoptose (Brennecke et al. 2003; Xu et al. 2003), repressão e degradação do RNAm (Tomari & Zamore 2005), formação de heterocromatina (Lippman & Martienssen 2004), desenvolvimento e

manutenção de células germinativas (Forstemann et al. 2005; Klattenhoff & Theurkauf 2008; Lucchetta et al. 2009), tradução (Pillai et al. 2005) e transcrição (Taft et al. 2009).

Os shRNAs são frequentemente utilizados quando se deseja a regulação permanente de um RNAm específico (Manjunath et al. 2009). São compostos por duas sequências complementares de RNA com 19-22 pares de base ligadas por um pequeno loop de 4-11 nucleotídeos similares ao grampo de cabelo (hairpin) encontrado naturalmente no miRNA (Moore et al. 2010a). Essa estrutura é reconhecida pela proteína dicer, que tem ação de ribonuclease, ativando o shRNA. Portanto, o gene que codifica para shRNA entra no núcleo, o que aumenta a complexidade da entrega do RNAi na célula (Takahashi et al. 2009).

Os miRNAs são moléculas de RNA formadas por 19-24 pares de base, originados a partir de longas fitas de RNAfd (acima de 100 pares de bases) (Tomari & Zamore 2005). Até o momento mais de 28.000 miRNAs foram reconhecidos, sendo 1.884 miRNAs humanos (Kozomara & Griffiths-Jones 2014). Os miRNAs regulam 30% do genoma humano, desempenhando um papel importante ao regular diversos processos biológicos, tais como: proliferação celular, diferenciação celular, apoptose, oncogênese, metabolismo, angiogênese e inflamação. A desregulação da expressão do miRNA está associado a uma variedade de doenças humanas, incluindo neurodegeneração e autoimunidade (Kanwar et al. 2010; Sonntag 2010; Tufekci et al. 2011). Os miRNAs podem ser codificados por genes independentes, mas também podem ser processados a partir de uma variedade de diferentes RNAs, incluindo introns, 3'-UTR do RNAm, RNAs longos não codificados, elementos transponíveis, e repetições genômicas (Cai & Cullen 2007; Yoshimizu et al. 2008).

Os piRNAs foram identificados através de estudos utilizando a mosca *Drosophila* (Livak 1990) e possuem de 26-31 pares de base. A proteína Stellate dessa *Drosophila* não tem função biológica conhecida, mas determinadas mutações levam à superexpressão dessa proteína durante a espermatogênese, o que leva à redução da fertilidade do animal (Livak 1990). Posteriormente se descobriu que esses RNAs estão associados ao subgrupo PIWI da superfamília de proteínas Argonautas (Aravin et al. 2006; Girard et al.

2006). Como resultado surgiu uma nova família de pequenos RNAs conhecida como PIWI-RNAs (piRNAs) (Brennecke et al. 2007; Lin et al. 2007). Esses piRNAs foram definidos em células de mamíferos contendo cerca de 20-30 nucleotídeos, com precursores de RNA fita simples (Klattenhoff & Theurkauf 2008), sua função está associada principalmente com a regulação gênica responsável pelo desenvolvimento de células germinativas (Carmell et al. 2007). Os piRNAs podem ser originários de regiões repetitivas do genoma, tais como retrotransposons, ou regiões normalmente organizadas em heterocromatina e que normalmente são derivados da fita antisenso do RNAfd (Vagin et al. 2006).

Os siRNAs são as moléculas mais utilizadas em aplicações terapêuticas. São moléculas de RNAfd endógeno ou exógeno, contendo 21-25 nucleotídeos. São encontrados na defesa antiviral e transposons, regulando o RNAm e realizando sua degradação pós-transcricional. A descoberta do siRNA, bem como sua aplicação bem sucedida, fornece uma poderosa ferramenta para a desativação dos genes alvos (Czech & Hannon 2011). Em contrapartida, alguns vírus são capazes de produzir proteínas que impedem o silenciamento do RNA, o que explica a existência de algumas cepas altamente virulentas (Bivalkar-Mehla et al. 2011).

A medida que novos estudos são realizados, diminuem as fronteiras entre as diferentes classes de pequenos RNAs, principalmente entre os miRNAs e siRNAs. Esses dois grupos possuem aspectos de suas biogêneses semelhantes, e, em muitos casos, suas formas de ação e função se sobrepõem, mas algumas diferenças ainda persistem (Carthew & Sontheimer 2009). Dentre essas diferenças, se acreditava que os miRNAs e siRNAs teriam origens diferentes. Se sabe que os miRNAs tem origem, principalmente, endógena, sendo sintetizados a partir do genoma do próprio organismo como uma estratégia para que ocorra a regulação de genes endógenos (Tomari & Zamore 2005). Já os siRNAs seriam as formas exógenas, derivados de genomas virais, transposons e elementos genéticos móveis, servindo como uma estratégia de proteção do organismo a invasores (Mello & Conte 2004). Porém, estudos revelaram uma série de siRNAs de origem endógena (endo-siRNAs) com funções de regulação gênica características de miRNAs (Chung

et al. 2008; Ghildiyal et al. 2008; Kawamura et al. 2008; Okamura et al. 2008a; Okamura et al. 2008b; Tam et al. 2008; Watanabe et al. 2006).

1.3.3. Mecanismo de ação do siRNA

O silenciamento gênico causado pelo RNA de interferência ocorre por um mecanismo pós-transcricional: o gene é normalmente transcrito dentro da célula, mas não consegue ser traduzido, pois é degradado por RNase antes da tradução (Bivalkar-Mehla et al. 2011; Dykxhoorn et al. 2003; Zamore 2002).

O mecanismo de silenciamento (Figura 1.9) se inicia com a produção de moléculas de RNAfd. Após serem produzidas, essas moléculas são clivadas pela enzima DICER. Essa enzima é uma endoribonuclease da família RNase de classe III, que reconhece fitas duplas de RNA através de uma proteína reconhecedora de RNA chamada de TRBP (trans-activator RNA(tar)binding protein) (Chendrimada et al. 2005). A enzima DICER, após reconhecer o RNAfd, à partir da proteína TRBP, gera moléculas de siRNAs de 21-23 nucleotídeos, caracterizados por um grupo fosfato na extremidade 5' e dois nucleotídeos não pareados na extremidade 3'hidroxi-terminal (Elbashir et al. 2001).

Após a clivagem, o complexo DICER/TRBP irá se associar com outra classe de proteínas, denominadas Argonautas (Ago), também chamadas de *slicer*. Estas proteínas são as principais proteínas com atividade de clivagem envolvidas no processo de silenciamento mediado por RNA (Carmell et al. 2002; Liu et al. 2004b). As proteínas Argonautas são divididas em três subgrupos: subgrupo Piwi (relacionado à ação dos piRNAs), subgrupo Ago (relacionado à ação de miRNAs e siRNAs) e um terceiro subgrupo descrito somente para nematóides (Peters & Meister 2007; Yigit et al. 2006). Em humanos já foram identificadas quatro proteínas argonautas do subgrupo Ago (nomeadas Ago1 até Ago4) (Sasaki et al. 2003), entretanto somente a Ago2 apresenta atividade de clivagem, sendo a proteína utilizada no mecanismo do silenciamento gênico dos siRNAs (Liu et al. 2004b; Meister & Tuschl 2004).

O trímero DICER/TRBP/Ago2 reconhece as estruturas de siRNAs. Junto ao siRNA esse trímero forma o complexo de silenciamento mediado por RNA (RNA-induced silencing complex) ou complexo RISC (Hammond et al. 2000). A proteína TRBP é a responsável pelo reconhecimento das fitas. Em *Drosophila*

melanogaster, a proteína correspondente a TRBP, denominada R2D2 (Liu et al. 2003), reconhece o siRNA através da diferença de estabilidade termodinâmica de suas extremidades, ligando-se à extremidade 5' mais estável (Tomari et al. 2004). Após a etapa de reconhecimento, a fita antisense (fita guia) do siRNA é acoplada ao complexo e a fita senso (fita passageira) é descartada pela ação da proteína Ago2. Após ser descartada, a fita senso do siRNA é degradada. Assim, o complexo RISC se torna ativo para atuar na clivagem do RNAm (MacRae et al. 2008).

Com o complexo RISC formado, a fita guia do siRNA direciona o complexo RISC para o RNAm alvo específico, complementar à sequência de siRNA (Leuschner et al. 2006). A ligação do siRNA ao RNAm alvo leva à clivagem do RNAm pela proteína Ago2 (Matranga et al. 2005; Rand et al. 2005). A proteína Ago2 realiza ligações fosfodiéster entre os nucleotídeos alvo e as bases 10 e 11 da fita guia do siRNA (contados a partir da extremidade 5') (Elbashir et al. 2001), que, em seguida, cliva o RNAm alvo, gerando grupos 3'-hidroxila e 5'-fosfato (Martinez & Tuschl 2004).

Após a primeira clivagem, a fita guia permanece intacta, o que permite o silenciamento de pelo menos nove sequências de RNAm antes da fita guia deixar o complexo (Hutvagner & Zamore 2002). O complexo RISC é liberado para clivar novos alvos após dissociação da fita guia (Rana 2007). A fita guia passa então a ser degradada por exonucleases celulares. O fragmento 5' (contendo CAP – sete-metil-guanosina trifosfato) é degradado pelo exossomo (Orban & Izaurralde 2005) e/ou uma exoribonuclease com atividade 3'-5' (Glazov et al. 2003), enquanto o fragmento 3' (contendo cauda poli-A) é processado por uma exoribonuclease com atividade 5'-3' (Souret et al. 2004). A degradação da fita guia do siRNA é importante, pois se intacto, o siRNA poderia ser traduzido e gerar proteínas truncadas e, possivelmente, tóxicas ao organismo (Rana 2007).

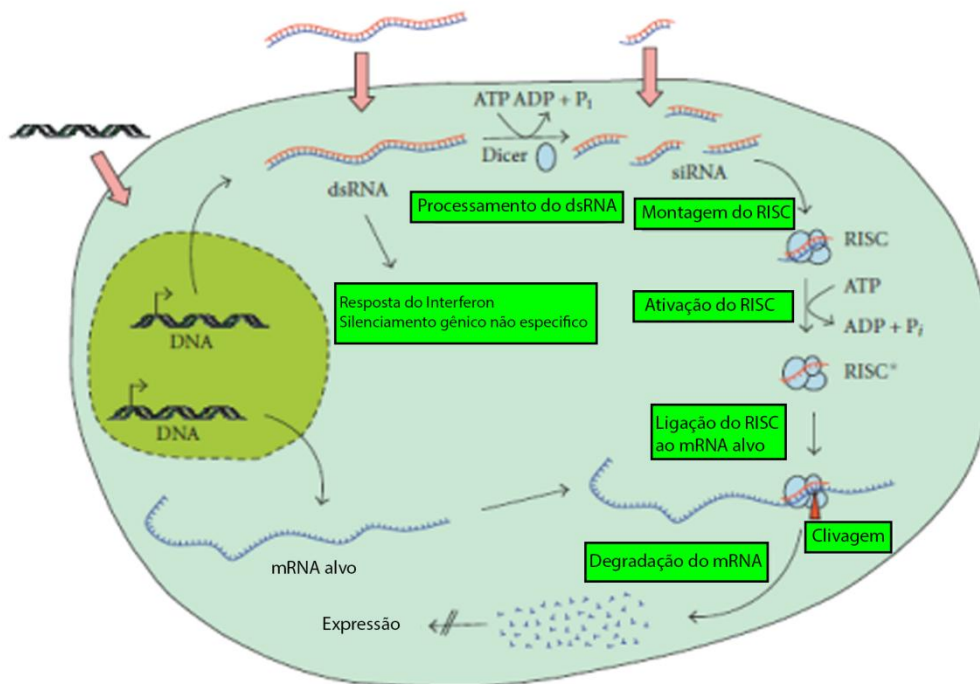


Figura 1.9 - Mecanismo de ação do RNAi. Modificado de Aigner *et al.*, 2006 (Aigner 2006b)

1.3.4. Limitações no uso do siRNA

O siRNA tem sido bastante útil no estudo da expressão genética devido à ação de sequências específicas desta molécula no silenciamento dos genes *in vivo* e *in vitro* (Zimmermann *et al.* 2006). Além disso, a utilização terapêutica do siRNA vem sendo bastante estudada para inibição da replicação de vários patógenos. No entanto, várias limitações em níveis extracelular e intracelular são encontradas para a utilização do siRNA, tais como: especificidade das sequências, estabilidade das sequências, efeito off- target e entrega dos siRNA no tecido alvo (Tokatlian & Segura 2010).

A especificidade das sequências de siRNA é bastante importante no desenho de uma sequência da molécula de siRNA. Mesmo seguindo as regras recomendadas para a construção das sequências, o silenciamento efetivo do gene alvo não é assegurado. Para ocorrer uma boa eficácia no silenciamento gênico, vários fatores são observados além da escolha da sequência alvo, tais como: estrutura e meia vida do RNAm alvo, tipo de célula/tecido ao qual o siRNA deverá penetrar e atuar (Kim *et al.* 2005; Siolas *et al.* 2005), além do tipo

de polimerase utilizada para reconhecer e amplificar as sequências de siRNAs (Sioud & Leirdal 2004).

As sequências de siRNA, como a maioria das sequências de moléculas de RNA, são pouco estáveis e facilmente degradadas tanto na matriz extracelular como na intracelular. Trabalhos *in vitro* demonstraram que o siRNA possui meia vida bastante curta, durando poucos minutos à poucas horas. Para que o siRNA se torne estável *in vitro* ou *in vivo* são necessárias modificações químicas na sua estrutura (Akhtar & Benter 2007; Reischl & Zimmer 2009), estratégias de encapsulamento lipídicos ou utilização de vetores virais que atuam protegendo as moléculas de siRNA da degradação pela resposta imune do hospedeiro (Tokatlian & Segura 2010).

Os efeitos off- target ocorrem quando genes, que não os genes alvo, apresentam um silenciamento gênico relacionado à ação do siRNA (Sledz & Williams 2005). Esse silenciamento gênico pode causar efeitos indesejados ao hospedeiro, que incluem: inflamação (incluindo a resposta do interferon), toxicidade celular, saturação da via do RNAm endógeno e outros efeitos indesejados sobre o gene alvo (Aigner 2006b). Diversos estudos demonstram que modificações químicas da fita guia do siRNA atuam aumentando a especificidade do RNAm ao genes alvos, reduzindo assim os efeitos off-target (Rao et al. 2009).

O escape da ação de substâncias anti-siRNAs pode ser necessário para os siRNAs utilizados no estudo. Estudos recentes têm demonstrado que patógenos virais podem contra-atacar o sistema de defesa antiviral realizado pelo RNAi ao codificar proteínas ou moléculas de RNA que funcionam como supressores do silenciamento da via de RNAi. Essas proteínas ou moléculas de RNA inibem diferentes etapas e componentes da via de RNAi, permitindo a replicação viral com sucesso (Bivalkar-Mehla et al. 2011). Esse mecanismo de supressão já foi encontrado nos seguintes vírus: *HIV* (Bennasser et al. 2005; Qian et al. 2009), *Influenza* (de Vries et al. 2009), *HCV* (Ji et al. 2008; Wang et al. 2006), *Vaccinia* (Li et al. 2004) e *Ebola* (Haasnoot et al. 2007a).

1.3.5. Entrega do siRNA no tecido alvo

Uma das limitações mais importantes do uso do siRNA é a sua entrega na célula/tecido alvo. A internalização do siRNA pelas células é dificultada pois

essas moléculas possuem um esqueleto fosfodiéster de carga negativa, igual à carga da membrana plasmática celular, o que leva à repulsão entre essas moléculas e membrana plasmática celular (Mello et al. 2013). Além disso, essas moléculas possuem meia vida curta e são altamente instáveis, dificultando seu transporte eficaz até o tecido alvo eficazmente (Santel et al. 2006). Várias técnicas são utilizadas para que ocorra a entrega dessas moléculas ao tecido alvo, as técnicas baseadas em vetores virais e as que utilizam vetores não virais (Hajeri & Singh 2009).

Os vetores virais são bastante eficazes ao transportar o siRNA até o tecido alvo devido à característica do vírus em transportar material genético. Por outro lado, a utilização de vetores virais também apresenta limitações, tais como: capacidade de carga limitada, dificuldade para o material genético se replicar em larga escala, potencial oncogênico e efeitos imunogênicos que impedem sua administração repetida (Donahue & Clark 1992; Donahue et al. 1992; Kim et al. 2004). Por razões de segurança, as estratégias baseadas na entrega por um vetor viral, até o momento, são limitadas para usos clínicos (Aigner 2006b). Os vetores virais podem incluir o uso de *Adenovírus* (Hosono et al. 2004), vírus associados à *Adenovírus* (AAV) (Heister et al. 2002), *Baculovírus* (Lu et al. 2006), *Retrovírus* (Barquinero et al. 2004), *Lentivírus* (Rubinson et al. 2003) e *Herpesvírus* (Sabbioni et al. 2007).

Os métodos não virais utilizam nanopartículas de carga positiva que neutralizam a carga negativa característica dos ácidos nucleicos em geral, incluindo siRNAs, facilitando sua penetração em membranas celulares de carga tipicamente negativa. Existe uma enorme gama de nanopartículas que podem ser acopladas aos siRNAs, sendo sua escolha dependente de vários fatores como o tamanho das partículas e principalmente do modelo experimental escolhido (*in vitro* ou *in vivo*). Podem ser utilizados, polímeros catiônicos, tais como PEG (polietilenoglicol) (Merkel et al. 2009), lipídios catiônicos (Kim & Kim 2009), lipossomas neutros (Yagi et al. 2009), peptídeos (Kumar et al. 2007), dentre outros.

A entrega por vetores lipídicos demonstram características favoráveis, como biocompatibilidade e a facilidade da produção em larga escala. Os vetores lipídicos são utilizados para entregar o siRNA para tratamento de doenças como câncer e distúrbios metabólicos aonde os sítios-alvo não são

facilmente afetados. Isso pode ser realizado por injeções intravenosas (via mais utilizada por apresentar rápida distribuição de partículas para os sítios teciduais), intraperitoniais ou subcutâneas (Wu & McMillan 2009).

Esses agregados também se acumulam em órgãos como pulmões e o fígado que inibem sua distribuição para outros tecidos. Mas, estratégias foram desenvolvidas para ultrapassar esse problema. Isso inclui o uso de PEG para esconder a carga positiva de superfície bem como o uso de lipídeos neutros para distribuir as moléculas de siRNA sistematicamente (Wu & McMillan 2009).

A internalização pode ser feita ainda através de processos como: eletroporação (entrega local, mas pode ser sistêmico dependendo do tamanho do organismo alvo) (Moore et al. 2010b), injeção hidrodinâmica (atinge o fígado, rins, coração e pulmão) (Bradley et al. 2005), imersão (*soaking*) (normalmente sua entrega é sistêmica) (Yang et al. 2012), alimentação/oral (entrega sistêmica em organismos com RNAi transitivo e epitélio do sistema digestivo) (Aouadi et al. 2009; Timmons & Fire 1998), injeção intraocular (atinge os olhos/local de inoculação) (Kleinman et al. 2008), gel (atinge a vagina/entrega local) (Palliser et al. 2006) e spray (atinge o pulmão e o cérebro) (Bitko et al. 2005; Perez et al. 2012). Os vetores plasmidiais constituem também uma opção de entrega, apesar de trabalhoso, permitem um efeito não transitório dos siRNAs, que serão expressos continuamente (Hajeri & Singh 2009; Peng et al. 2007).

A entrega da molécula de siRNA depende do tecido alvo. O silenciamento gênico pelo siRNA de infecções que acometem o SNC apresenta grande dificuldade devido, principalmente, à proteção do SNC pela barreira hematoencefálica (Pardridge 2007). Várias tentativas foram empregadas para que ocorra a entrega eficiente do siRNA ao SNC, mas geralmente essas técnicas não garantem uma entrega eficiente, sendo necessário para isso a injeção do siRNA pela via intracraniana e via intracerebral (Lasek & Azouaou 2010; Schlachetzki et al. 2004). Essas técnicas são bastante invasivas, causando dor ao animal.

Uma estratégia que tem aumentado a eficiência do silenciamento no SNC é a utilização de siRNAs complexados com o peptídeo RVG-9R, derivado do capsídeo de superfície do *Vírus da Raiva* (Kumar et al. 2007). A inoculação do RVG-9R complexado com moléculas de siRNA ocorre de maneira menos

invasiva, pela via intravenosa, diminuindo o estresse e a dor que a inoculação da molécula poderia causar ao animal. Além disso, a utilização da proteína RVG-9R demonstrou ótimos resultados e vem sendo cada vez mais utilizada no silenciamento de genes do SNC (Kim et al. 2010; Kumar et al. 2007).

1.3.6. Utilização do RNA de interferência

O uso de RNAi tem se mostrado uma poderosa ferramenta para análise da identificação e função gênica, para a regulação gênica em plantas, além de se mostrar uma nova alternativa para o desenvolvimento de terapias contra diversas doenças (Shrey et al. 2009). Além disso, o RNAi age apenas regulando a expressão do gene alvo, não havendo eliminação do gene.

A regulação gênica proporcionada pelo RNAi é bastante importante no estudo de funções gênicas que necessitam de técnicas que regulem a expressão de genes específicos. A utilização de camundongos nocaute é bastante efetiva para o estudo da função gênica, mas apresenta desvantagens, tais como: dificuldade na observação do efeito da eliminação do gene em células/tecidos específicos e da interação genômica. Além disso, o uso de camundongos nocaute é bastante caro e trabalhoso. A regulação pelo RNAi não apresenta essas desvantagens e vem surgindo como uma alternativa relativamente pouco trabalhosa e eficiente para analisar as funções gênicas (Sledz & Williams 2005).

Nematóides como *Caenorhabditis elegans* e insetos, principalmente *D. melanogaster* tem sido utilizados para investigar os aspectos moleculares envolvidos nos processos do siRNA e do miRNA. Isto se deve, principalmente, ao fato de que foram nesses organismos que o mecanismo de interferência foi descrito primeiro, os tornando modelos experimentais importantes, além de serem práticos de se trabalhar. Os siRNAs também são utilizados para silenciar genes de interesse nessas espécies, como no estudo de genes envolvidos na retroposição de *D. melanogaster* (Tchurikov & Kretova 2007) e no silenciamento da variante PK-A que gera paralisia no começo da vida adulta de *C. elegans* (Murray et al. 2008).

O silenciamento gênico pelo siRNA também pode ser aplicado no campo da imunologia, ao tentar elucidar os mecanismos envolvidos no sistema imune (Shrey et al. 2009). No sistema imune inato, o silenciamento do TNF α ,

associado ao evento de apoptose de células neuronais, tem ajudado a elucidar aspectos relacionados à desordens no sistema nervoso (Kim et al. 2010). Já no sistema imune adaptativo, a diminuição da expressão dos genes PI8INK4C e P27KIPI (inibidores de cinase dependentes de ciclina) demonstraram a importância de sua ação na linfopoiese de linfócitos B (Wang et al. 2010). A repressão do gene GATA3 influencia na diferenciação dos linfócitos T CD4+ (Skapenko et al. 2004). Além disso, estudos de silenciamento com siRNAs tem ajudado na elucidação de aspectos voltados a doenças auto-imunes (Pruijn 2006).

Em plantas, o silenciamento dos genes por siRNA é utilizado para silenciar tanto genes endógenos específicos quanto genes exógenos provenientes de patógenos invasores à planta (Mansoor et al. 2006). O silenciamento do gene CaMXMT1, que está envolvido na via biosintética da cafeína, encontrado em plantas do café (*Coffea* spp.), por exemplo, pode reduzir a produção da cafeína, levando ao desenvolvimento de plantas que produzem café descafeinado (Ogita et al. 2004). Outros estudos mostraram que o silenciamento dos genes ghSAD-1 e ghFAD2-1, envolvidos na biossíntese de ácidos graxos em sementes de algodão, levam ao aumento de ácidos graxos e à produção de sementes que se mostram mais oleaginosas e de interesse comercial (Liu et al. 2002). Outros estudos mostraram o desenvolvimento de batatas mais resistentes à estocagem (resultante da inibição do gene polifenil oxidase responsável pelo escurecimento enzimático) (Wesley et al. 2001) e aumento de carotenóides em tomates (Davuluri et al. 2005). Além disso, a regulação gênica pela via de RNAi levou ao desenvolvimento de plantas resistentes à infecções virais. Em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) se observou redução do acúmulo de partículas virais de ACMV (*Vírus African cassava mosaic*) a partir do silenciamento do gene associado à replicação viral (Vanitharani et al. 2003), além de inibição da infecção viral por PMMoV (*Vírus do mosqueado do pimentão*) e TEV (*Vírus Tobacco etch*) (Tenllado et al. 2003).

Uma das utilizações mais importantes do siRNA é no desenvolvimento de terapias contra doenças. Dessa forma, o siRNA pode ser uma ferramenta útil ao identificar diretamente genes responsáveis pelas doenças, os tornando alvos importantes para o desenvolvimento de fármacos ou atuando como a

própria terapia ao silenciar genes importantes para o desenvolvimento da doença ou do patógeno. O siRNA pode atuar, por exemplo, ao identificar genes relacionados ao desenvolvimento do câncer. Já foi demonstrado, pelo silenciamento gênico do gene AML1/MTG8 envolvido na Leucemia Mielóide Aguda que o produto deste gene é responsável por favorecer o desenvolvimento da leucemia (Heidenreich et al. 2003). O siRNA também já foi desenvolvido como molécula terapêutica para o tratamento da degeneração neovascular relacionada à idade, onde moléculas de siRNA (Sirna-027) foram utilizadas para combater a doença através do silenciamento de um receptor de fator de crescimento-1 associado à doença (Kaiser et al. 2010).

A aplicação da tecnologia de silenciamento por siRNAs para inibir a replicação viral, talvez seja um dos maiores e mais importantes campos de ação desta tecnologia (Haasnoot et al. 2007b). Os siRNAs podem ser utilizados para inibir diferentes estágios do ciclo de replicação viral (Figura 1.10), tendo como alvos RNAs virais e RNAs celulares envolvidos no processo de replicação (Colbere-Garapin et al. 2005).

A técnica de inibição da replicação viral utilizando siRNA já foi descrita inibindo a replicação viral do *Vírus Respiratório Sincicial (RSV)* (Bitko et al. 2005; DeVincenzo et al. 2010), *Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV)* (Coburn & Cullen 2002; Jacque et al. 2002; Lee et al. 2002; Novina et al. 2002; Qin et al. 2003), *Vírus da Hepatite A (HAV)* (Kusov et al. 2005), *Vírus da Hepatite B (HBV)* (McCaffrey et al. 2003; Shlomai & Shaul 2003; Weinberg & Arbutnot 2010), *Vírus da Hepatite C (HCV)* (Khaliq et al. 2010; Kronke et al. 2004; Randall et al. 2003; Takigawa et al. 2004; Yokota et al. 2003), *Vírus da Hepatite E* (Huang et al. 2009), *Vírus Marburg* (Ursic-Bedoya et al. 2013), *Vírus da Dengue* (Idrees et al. 2013), *SARS-coronavírus* (Akerstrom et al. 2007; He et al. 2003; Li et al. 2005; Wu et al. 2005), *Metapneumovírus (MPV)* (Ferreira et al. 2007), *Coxsackievírus B3 (CBV-3)* (Schubert et al. 2007), *Coxsackievírus B4 (CVB4)* (Tan et al. 2010), *Enterovírus 71* (Wu et al. 2009), *Vírus Influenza* (Ge et al. 2004; Ge et al. 2003; Seth et al. 2010; Zhiqiang et al. 2010), *Rhabdovírus* (Gupta et al. 2012) e *Vírus Ebola* (Geisbert et al. 2010) *in vitro* e *in vivo*. O tratamento por siRNA já foi estudado também em infecções experimentais em camundongos murinos para o tratamento de encefalites virais, como a encefalite causada pelo *Vírus do Oeste do Nilo* (Bai et al. 2005)

e pelo *Vírus da Encefalite Japonesa* (Murakami et al. 2005), demonstrando também sua eficácia no tratamento de encefalites virais.

Estes exemplos sugerem que sequências específicas de siRNA podem ser utilizadas como potentes ferramentas na inibição da replicação viral, no tratamento de encefalites causadas por infecções virais e que é possível direcionar o RNAi para degradar o RNAm celular interferindo na interação das proteínas virais ou em etapas essenciais para sua replicação. O estabelecimento do RNAi como um agente na terapia antiviral poderá se tornar uma nova e útil ferramenta utilizada no controle de muitas infecções de origem viral.

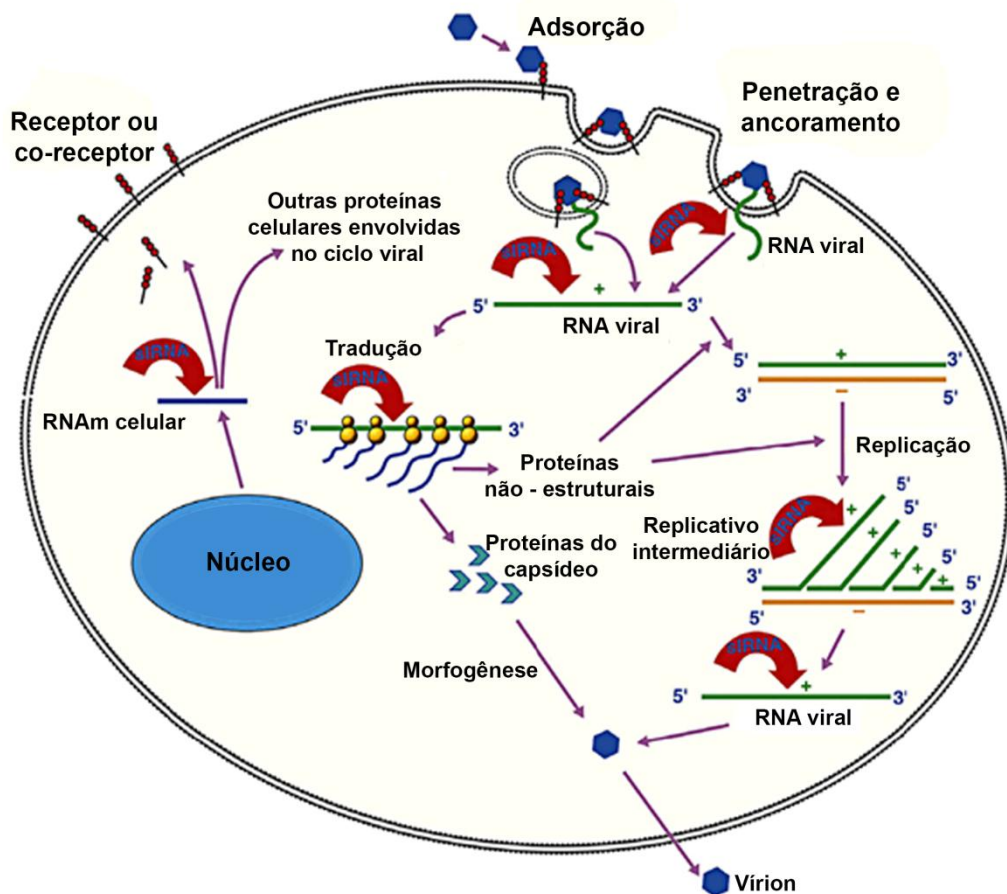


Figura 1.10 - Possíveis alvos do ciclo de replicação viral para o silenciamento gênico pelo siRNA. Fonte: Modificado de Colbere-Garapin, 2005 (Colbere-Garapin et al. 2005)

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A infecção pelo HSV-1 é importante causa de morbidade e mortalidade mundial. A encefalite herpética (HSE), que é considerada uma das manifestações clínicas mais graves da infecção pelo HSV-1, pode levar o indivíduo à morte, principalmente se não tratado. Mesmo se tratado, o indivíduo pode desenvolver várias sequelas relacionadas à doença, tornando a HSE uma manifestação clínica extremamente grave da infecção pelo HSV-1. A ocorrência de HSE se torna mais preocupante em grupos de comportamento sexual de risco. Esses indivíduos possuem alta prevalência de infecções causadas por HSV-1, principalmente em razão do aumento da transmissão sexual, que tem levado à substituição de infecções causadas pelo HSV-2 por infecções causadas pelo HSV-1 como causa mais comum de infecções herpéticas por transmissão sexual. Um possível fator para o aumento das infecções causadas por HSV-1 pela transmissão por via sexual são as mudanças no comportamento sexual, ocorrendo aumento do contato oral-genital. Os grupos de comportamento sexual de risco possuem também risco aumentado de adquirir coinfeção com HIV. A imunossupressão causada pela infecção com HIV leva ao aumento da replicação do HSV-1, aumento de recorrências associadas ao vírus, aumento da gravidade da HSE e possíveis sequelas relacionadas à manifestação clínica. Além disso, não existem tratamentos disponíveis ou vacinas para HSE que consigam, até o momento, controlar totalmente a replicação viral, diminuindo a patogênese causada pela doença (Brockman & Knipe 2008; Huang et al. 2004).

A íntima associação do HSV-1 com a célula hospedeira torna a utilização de terapias antivirais altamente tóxicas, pois além de inibir a replicação viral, ela pode causar danos à célula do hospedeiro. Por isso, a produção de terapias antivirais, além de levar em conta a inibição da replicação viral deve levar em conta os danos causados ao hospedeiro. A necessidade de impedir a replicação e diminuir, ou até mesmo anular, os danos causados pelos vírus no organismo é evidente. Contudo, é também imprescindível que o tratamento seja realizado sem causar efeitos indesejáveis ao hospedeiro (Huang et al. 2004).

Uma das opções à utilização de antivirais e vacinas para o tratamento das infecções virais é a utilização da via de RNAi, principalmente o uso de moléculas de siRNA. Essas moléculas são bastante úteis, pois inibem a

replicação viral, sem a ocorrência de efeitos colaterais ou toxicidade celular/sistêmica. Além disso, o siRNA já foi utilizado como terapia em várias infecções virais, tanto *in vitro* como *in vivo*, demonstrando sua eficácia no combate à diversas infecções causadas por vírus e sua utilidade como alternativa aos fármacos antivirais existentes (Akerstrom et al. 2007; Bai et al. 2005; Berg et al. 2001; DeVincenzo et al. 2010; Ferreira et al. 2007; Gupta et al. 2012; Huang et al. 2009; Idrees et al. 2013; Khaliq et al. 2010; Kusov et al. 2005; Murakami et al. 2005; Qin et al. 2003; Schubert et al. 2007; Tan et al. 2010; Ursic-Bedoya et al. 2013; Weinberg & Arbutnot 2010; Wu et al. 2009; Zhiqiang et al. 2010). Em relação à infecção pelo HSV-1, vários trabalhos demonstraram a eficácia da utilização de sequências de siRNA anti-HSV-1, sendo capaz de inibir em até 99% a replicação do vírus (Perse et al. 2014; Wheeler 2014; Yang et al. 2013; Zhang et al. 2008; Zhe et al. 2008).

Atualmente, o tratamento para a HSE tem demonstrado dificuldades, como a utilização de medicamentos antivirais que apresentam toxicidade e que podem proporcionar vários efeitos colaterais metabólicos, ocorrer sequelas mesmo após o tratamento, além de ocorrer casos de resistência ao vírus HSV-1, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. A presença dessas dificuldades faz da procura por novas alternativas para o tratamento da doença uma constante urgência.

Tendo em vista a associação entre HSV e HIV, o aumento da transmissão sexual do HSV-1 e a necessidade de novas terapias alternativas para a HSE que não apresentem toxicidade ou efeitos colaterais, esta tese de doutorado se destinou a investigar o perfil epidemiológico da infecção pelo HSV-1 no grupo de comportamento de risco HSH e a avaliar a utilização do siRNA específico para o HSV-1 (siRNA anti-HSV-1) como tratamento da HSE em camundongos BALB/c infectados via intranasal com HSV-1.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar o perfil epidemiológico de HSV-1 no grupo de comportamento sexual de risco de homens que fazem sexo com homem (HSH) e avaliar a atividade antiviral do RNA de interferência no tratamento da encefalite herpética em camundongos BALB/c infectados experimentalmente.

3.2. Objetivos específicos

1. Investigar o perfil epidemiológico da infecção por HSV-1 no grupo de comportamento sexual de risco HSH.
2. Estabelecer o modelo experimental de infecção de HSV-1 EK pela via intranasal em camundongos BALB/c.
3. Avaliar a atividade antiviral do RNA de interferência em modelo de infecção encefálica herpética utilizando camundongos BALB/C.
 - ✓ Avaliar a cinética do tratamento da HSE com siRNA anti-HSV-1 em camundongos BALB/c;
 - ✓ Verificar a influencia do número de doses de siRNA anti-HSV-1 inoculados em camundongos BALB/c no tratamento da encefalite herpética;
 - ✓ Comparar a eficácia do tratamento utilizando siRNA anti-HSV-1 com o tratamento utilizando aciclovir em modelo de HSE em camundongos BALB/c infectados experimentalmente com HSV-1.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos nesta tese serão apresentados sobre a forma de manuscritos publicados ou submetidos à publicação em revistas indexadas. Os manuscritos estão listados à seguir na ordem em que as publicações serão discutidas.

O estudo do perfil epidemiológico do grupo de risco de homens que fazem sexo com homens foi previamente aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul com o protocolo 1948 (anexo A) e a utilização de camundongos BALB/C em modelo experimental de infecção encefálica herpética foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) - FIOCRUZ com o protocolo de número LW-28/12 (anexo B).

4.1. Artigo 1 - Epidemiological evaluation of herpes simplex virus in men who have sex with men in Mato Grosso do Sul, Brazil.

Os resultados apresentados neste manuscrito são referentes ao objetivo específico 1:

- Investigar o perfil epidemiológico da infecção por HSV-1 no grupo de comportamento sexual de risco HSH.

Situação do manuscrito: Publicado na revista Sexually transmitted infections

Referência: da Silva Ados S, Lima LR, Perse Ada S, Castro LS, Rezende GR, Pires FR, Puga MA, Bandeira LM, Tanaka TS, Motta-Castro AR, de Paula VS 2015. Epidemiological evaluation of herpes simplex virus in men who have sex with men in Mato Grosso do Sul, Brazil. Sexually transmitted infections, 91, 182

LETTER

Epidemiological evaluation of herpes simplex virus in men who have sex with men in Mato Grosso do Sul, Brazil

Herpes simplex virus types 1 and 2 (HSV-1 and HSV-2) are highly prevalent worldwide.¹ HSV-1 is widespread in the general population, while HSV-2 is usually more prevalent among risk behaviour groups such as men who have sex with men (MSM).² This epidemiological profile has been changing in the last years with regards to changes in sexual practices such as orogenital or oroanal practices.³ For these reasons, the association of MSM groups with HSV sexual transmission has been rising.

This study evaluated the epidemiological profile of HSV infection among MSM from Mato Grosso do Sul, Brazil. For this purpose, serological testing was performed to evaluate anti-HSV-1/HSV-2 IgG and IgM (Symbiosys diagnostica, Brazil) of 283 MSM participants. Besides that, the association between HSV serological infection and risk factors was measured.

The seroprevalence of HSV in the MSM population was found to be 85.2% and no individual was positive for anti-HSV-1/HSV-2 IgM. The risk factor evaluation demonstrated association of anti-HSV IgG with age above 20 years ($p < 0.001$), low family income ($p = 0.009$) and low education level ($p = 0.009$). The use of illicit drug ($p = 0.025$) and cannabis ($p = 0.028$) were also associated with HSV. This association, in fact, is the first associating cannabis use with HSV prevalence and might be related with the behaviour

of sharing the drug and smoking the same cigarette.

Association of HSV and sexual risk behaviour was found among MSM who declared they were sexual workers ($p < 0.001$). Besides that, MSM who related sexual practices with a partner in the last week ($p = 0.019$), multiple sexual partners in the last week ($p = 0.03$) and anal sexual practice ($p = 0.027$) emerged as strong risk factors for HSV infection. Furthermore, 97% of MSM infected with HIV were HSV positive ($p = 0.027$). The HSV infection seems to be a relevant risk factor for acquiring HIV. The reason might be related to genital and anorectal ulceration or mucosal disruption due to HSV infections which might facilitate the acquisition and transmission of HIV at least twofold.⁴

Our results demonstrate the importance of implementing programmes for HSV infection prevention, in particular targeting risk behaviour groups such as MSM. Moreover, higher HSV infection might facilitate HIV infection turning this co-infection into a risk factor for HIV acquisition and transmission. Finally, we highlight the need for conducting periodic surveys of the MSM group.

Alexandre dos Santos da Silva,¹
Lyana Rodrigues Pinto Lima,¹
Amanda da Silva Perse,¹ Lisie Souza Castro,²
Grazielli Rocha de Rezende,²
Fernanda Rodas Pires,²
Marco Antonio Moreira Puga,²
Larissa Melo Bandeira,²
Tayana Serpa Ortiz Tanaka,²
Ana Rita Coimbra Motta-Castro,^{2,3}
Vanessa Salete de Paula¹

¹FIOCRUZ, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil

²Federal University of Mato Grosso do Sul—UFMS, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Setor Hemonúcleo Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

³FIOCRUZ-MS; Rua Gabriel Abrão, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

Correspondence to Dr Vanessa Salete de Paula, Institution: Instituto Oswaldo Cruz—FIOCRUZ, Pav. Helio e Peggy Pereira, Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ 21360-040, Brazil; vdepaula@ioc.fiocruz.br

Acknowledgements This work was supported by Fundação Oswaldo Cruz—IOC.

Contributors AdSdS and VSdP collaborated in the writing of this manuscript. LSC, GRdR, FRP, TSOT, MAMP, LMB and ARCM-C were involved in the design and conducting of the survey in Mato Grosso do Sul, Brazil. The serological testing was performed by da Silva, LRPL and APdS. Besides that, da Silva analysed the data and interpreted the results.

Funding Fundação Oswaldo Cruz—IOC.

Competing interests None.

Ethics approval UFMS research ethics committee.

Provenance and peer review Not commissioned; internally peer reviewed.



CrossMark

To cite da Silva Ados S, Lima L RP, Perse A da S, et al. *Sex Transm Infect* 2015;**91**:182.

Received 20 June 2014

Revised 4 August 2014

Accepted 3 September 2014

Published Online First 24 September 2014

Sex Transm Infect 2015;**91**:182.

doi:10.1136/sextrans-2014-051739

REFERENCES

- 1 Baringer JR. Herpes simplex infections of the nervous system. *Neural Clin* 2008;**26**:657–74, viii.
- 2 Looker KJ, Garnett GP, Schmid GP. An estimate of the global prevalence and incidence of herpes simplex virus type 2 infection. *Bull World Health Organ* 2008;**86**:805–12, A.
- 3 Pena KC, Adelson ME, Mordechai E, et al. Genital herpes simplex virus type 1 in women: detection in cervicovaginal specimens from gynecological practices in the United States. *J Clin Microbiol* 2010;**48**:150–3.
- 4 Hill C, McKinney E, Lowndes CM, et al. Epidemiology of herpes simplex virus types 2 and 1 amongst men who have sex with men attending sexual health clinics in England and Wales: implications for HIV prevention and management. *Euro Surveill* 2009;**14**:34–9.

4.2. Artigo 2 - Intranasal challenge of BALB/c mice with HSV-1 EK strain: A experimental model for evaluation of antiviral drugs efficacy against Herpes simplex virus type I encephalitis.

Os resultados apresentados neste manuscrito são referentes ao objetivo específico 2:

- Avaliar o modelo experimental de infecção de HSV-1 EK pela via intranasal em camundongos BALB/c.

Situação do manuscrito: artigo submetido

Title: Intranasal challenge of BALB/c mice with HSV-1 EK strain: A experimental model for evaluation of antiviral drugs efficacy against Herpes simplex virus type I encephalitis

Author's name: Alexandre dos Santos da Silva¹, Jéssica Vasques Raposo¹, Marco Antônio Silva Campos², Guilherme Pimenta Zolini², Vanessa Salete de Paula*¹ and Marcelo Alves Pinto¹

Intitutional affiliations:

¹Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ, Pav. Helio e Peggy Pereira; Brazil Avenue, 4365; Manguinhos; Rio de Janeiro, RJ, Brazil; Zip code: 21360-040.

² Centro de pesquisas René Rachou /Fiocruz-MG; Augusto de Lima Avenue, 1715; Barro Preto; Belo Horizonte, MG, Brazil; Zip code: 30190-002

Word count: 2385 words

Keywords: Herpes simplex virus 1; Experimental model; Intranasal challenge; BALB/c

Abstract

¹ **Corresponding author:**

Vanessa Salete de Paula

Institution: Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ; Pav. Helio e Peggy Pereira; Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Zip code: 21360-040

Telephone number: 55 21 25621876 E-mail: vdepaula@ioc.fiocruz.br

The aim of this study was to evaluate a new experimental model of herpetic encephalitis (HSE) on intranasal challenge of BALB/c mice with HSV-1 EK strain. Mice were inoculated with different dilutions of HSV-1 EK (10^1 to 10^9) and HSE infection was evaluated through clinical signs, IFN- γ and HSV-1 replication. Animals infected with HSV-1 EK showed HSE clinical signs, death, higher IFN- γ concentration and HSV-1 replication in brain and trigeminal ganglia. These findings demonstrated that intranasal challenge with HSV-1 EK can induce HSE and could be useful to study HSE neuropathogenesis and antiviral drugs.

Introduction

Herpes simplex virus type 1 is a member of *Herpesviridae* family with a prevalence of 70%-80% in adults worldwide (Dalkvist et al. 1995; Miller et al. 1998; Stock et al. 2001). The main method of transmission occurs by direct exposition of lesioned skin, mucous membranes or secretions of a person with asymptomatic (Sciubba 2003) or recurrent infection (Kleymann 2003; Nadelman & Newcomer 2000; Sciubba 2003). After the primary exposition, virus particles move centripetally to the neuronal cell body of trigeminal ganglia (TG) by retrograde axoplasmic flow, where the virus enter into a latent state (Miller et al. 1998). The virus can be reactivated with a consequent loss of latent state by factors as stress, fatigue, heat, cold, UV radiation and immunosuppression (Whitley et al. 1998). The symptomatology of the infection varies from an asymptomatic infection to vesicular lesions, edema, gingivostomatitis, keratoconjunctivitis and herpetic encephalitis (HSE) (Fatahzadeh & Schwartz 2007a).

HSE is considered the most common cause of encephalitis in occidental countries, with an annual incidence of 1-4 cases/million of inhabitants and death of 70% of patients untreated (De Tiege et al. 2008; Kimberlin 2007). The acute encephalitis caused by HSE is responsible for clinical signs as fever, behavioral disturbance, focal

neurologic signs, reduced level of consciousness, seizures and motor deficit. Besides that, HSE could cause cervical rigidity, headache, vomiting, photophobia and meningeal signs (De Tiege et al. 2008; Kimberlin 2007; Kneen et al. 2010). The mortality of HSE is approximately of 70% with only 2%-3% of survivors returning to normal neurological function (Baringer 2008; Kimberlin 2007). Even with acyclovir (ACV) treatment, mortality and morbidity are substantial. The acyclovir treatment can cause afasia, amnesia, behavioral changes, seizures, renal impairment, diarrhea, nausea and coma in 62% of survivors (Ernst & Franey 1998; Kimberlin 2007; Riera-Mestre et al. 2009). HSV-1 resistance with the use of ACV is of 0,7% in immunocompetent persons and 4%-7% in immunosuppressed persons (Bacon et al. 2003; Gilbert et al. 2002). Foscarnet is utilized in case of acyclovir resistance (Dambrosi et al. 2010), but presents high renal toxicity, anemia without neutropenia, nausea, vomit, headache and disturbance on central nervous system (CNS) (Brown et al. 2002; Fatahzadeh & Schwartz 2007a; Steiner et al. 2007).

Experimental models of HSE are important to evaluate the disease and the use of antivirals *in vivo*. Mice infected with HSV-1 can develop asymptomatic or lethal encephalitis, depending of several factors as age, immunocompetence, route of infection, previous immunization with HSV-1, as well as on virus and mouse strain (Dix et al. 1983; Enquist et al. 1998; Itoyama et al. 1991; Kastrukoff et al. 2012; Kristensson et al. 1983; Kristensson et al. 1979; Kristensson et al. 1978; Lopez 1975; Townsend 1981a; Wakisaka et al. 2002). Several studies demonstrated that BALB/c is susceptible to HSV-1 infection when administrated via intranasal (Drummond et al. 1994; Esiri 1982; McLean et al. 1993; Tomlinson & Esiri 1983), SJL/J, A/J, and PL/J develop HSE (Kastrukoff et al. 2012). Some strains like HSV-1 strain 2 (Kastrukoff et al. 2012), strain F (Itoyama et al. 1991; Kristensson et al. 1983; Kristensson et al. 1979;

Kristensson et al. 1978) or McKrae (Mott et al. 2011) develop HSE signs and is very important to evaluate HSE disease *in vivo* or potential new antivirals.

The need for new studies related to HSE disease and for alternatives to the actual antivirals utilized on HSE turns indispensable the development of new experimental models of HSE. This study evaluated HSE in a experimental model of intranasal challenge with the use of HSV-1 EK, a new strain of HSV-1 isolated from a Brazilian patient and the first strain of HSV-1 from Brazil that cause HSE in an BALB/c mice via intranasal.

Methods

Ethical aspects

All animal studies were performed at Fundação Oswaldo Cruz – IOC and had been approved by Ethical committee of animal use (CEUA) – Fiocruz with protocol number LW-28/12.

Cell lines and virus

Vero CCL-81 cells (African green monkey *Cercopithecus aethiops* kidney cells) were cultured in Medium 199 (Sigma), with Fetal bovine serum 2% (FBS - Cultilab), 0,1µM of HEPES buffer (Sigma) and 2,5 µg/mL of Gentamycin (Schering). The cultures were maintained at 37°C with 5% CO₂.

Strain HSV-1 EK was isolated from a patient with HSV-1 vesicles. This sample were isolated in the Virus Laboratory of Federal University of Minas Gerais (UFMG) by Dr. Erna Geessien Kroonnos. The strains were maintained in Medium 199 with FBS 2% and multiplied in vero cells culture. 48h post-inoculation the cells were lysed by

freezing and thawing. Cell culture with HSV-1 EK was centrifuged at 4000x g by 20min at 4°C and viral titer was dosed by plaque assay method (Kuo et al. 2001).

Animals

Male BALB/c mice with 3-4 week of age were obtained from Laboratory Animals Breeding Center (Cecal/ FIOCRUZ) and were subjected to an acclimation period prior to use. Mice were kept in cages with wood-shavings as bedding, at a density of four to six mice per cage. Mouse chow and water were available *ad libitum* and all animals were kept under artificial 12:12 hours light and darkness schedule and. Room temperature was 25°C and relative humidity 65%.

HSE evaluation

To reproduce and evaluate HSE infection, BALB/c mice were divided in seven groups with four animals each one. Before the infection, the animals were anesthetized with ketamine i.p. (60 mg/kg). The negative control group (C- group) was inoculated with 20 µl of PBS via intranasal and another group was infected via intranasal with 20 µl containing 10^7 PFU of HSV-1 KOS strain (Kos group), a strain that do not cause HSE in intranasal challenge. The other groups were inoculated with 20 µl of HSV-1 EK antigen via intranasal with the concentrations of: 10^1 PFU (10^1 group), 10^3 PFU (10^3 group), 10^5 PFU (10^5 group), 10^7 PFU (10^7 group) and 10^9 PFU (10^9 group) (De Clercq & Luczak 1976).

Infection evaluation

BALB/c mice survival curves were estimated using the Kaplan-Meyer method and compared by log-rank test. Mice were observed daily by two independent observers until day 14 post-inoculation (p.i.). The mortality and the sum of clinical scores ranging

based on severity were evaluated. HSE clinical signs as weight loss (>20%), ruffled fur, tremors, keratoconjunctivitis, loss of postural reflex, loss of strength, hunched posture, circling and ataxia were scored as 1 to 3 varying according sign severity. The median lethal dose (LD₅₀) is calculated by Reed & Muench method.

Before death or euthanasia, brain and TG of BALB/c mice were collected to evaluate HSV-1 replication on these organs. HSV-1 DNA was extracted from animals organs using a QIAamp DNA kit (QIAGEN) as per the manufacturer's instructions. Virus replication was evaluated by cell culture and RT-PCR quantification with amplification of target gene UL-39 of HSV-1 (primers: 5'-CCAACTGCACCATGATCATCGA-3' e 5'-GATGTTTGTACCGCAACGAA-3') (Zhe et al. 2008).

IFN- γ evaluation

To assess IFN- γ mean concentration of animals with HSE, mice serums of the groups of BALB/c mice uninfected (C- group) or infected (10¹ - 10⁹ group) with HSV-1 EK were collected. The evaluation was performed with the use of Murine IFN- γ ELISA development kit (Preprotech) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Data was analyzed by Student *t* test with Graphpad prism 6 software. P<0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Clinical signs and mortality evaluation

In order to evaluate the occurrence of HSE on BALB/c mice infected with HSV-1 EK via intranasal, clinical signs were assessed daily until day 15p.i. All mice groups

inoculated via intranasal with HSV-1 EK (10^1 - 10^9 PFU) showed HSE clinical signals (Fig. 1). Group C- and group Kos do not showed any HSE clinical signs.

The infection with HSV-1 EK provided decreased weight gain only in animals infected with 10^9 PFU of HSV-1 EK when compared to C- group ($p=0.003$) and Kos group ($p<0.0001$) (Fig.1A). The overall clinical score demonstrated increase of HSE clinical signs in 10^5 group ($p=0.0086$), 10^7 group ($p=0.0053$) and 10^9 group ($p<0.0001$) when compared to C- group (Fig.1B).

All mice infected with HSV-1 KOS strain (Kos group) and mice inoculated with PBS (C- group) survived, 75% of animals from 10^1 group and 10^3 group survived, 50% of animals from 10^5 group survived, 25% of animals from 10^7 group survived and no animals from 10^9 group survived from infection. Besides that, animals from 10^5 group presented median survival of 12.5 days, 10^7 group presented median survival of 7 days and 10^9 group presented median survival of 5 days. It was found statistically significance between survival of C- group and 10^7 group ($p=0.0455$) and between C- group and 10^9 group ($p=0.0082$) (Fig.1C). The LD₅₀ calculated for HSE in BALB/c mice was of $10^{6.68}$ PFU/mL.

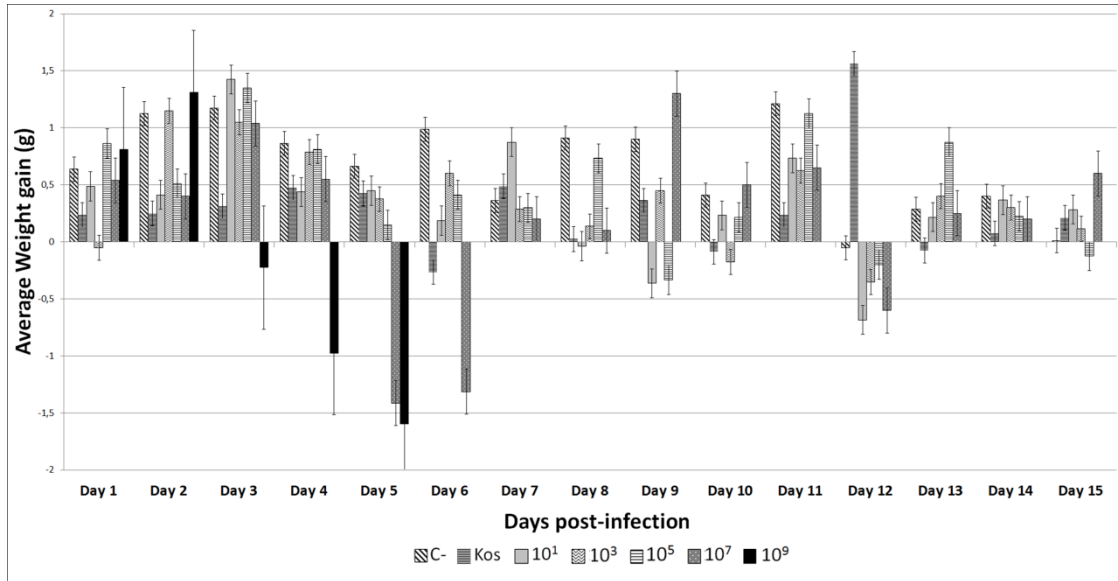
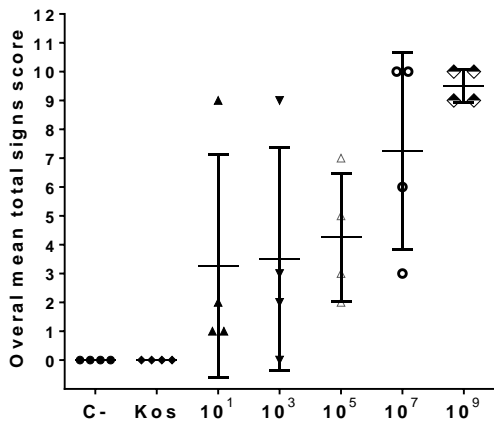
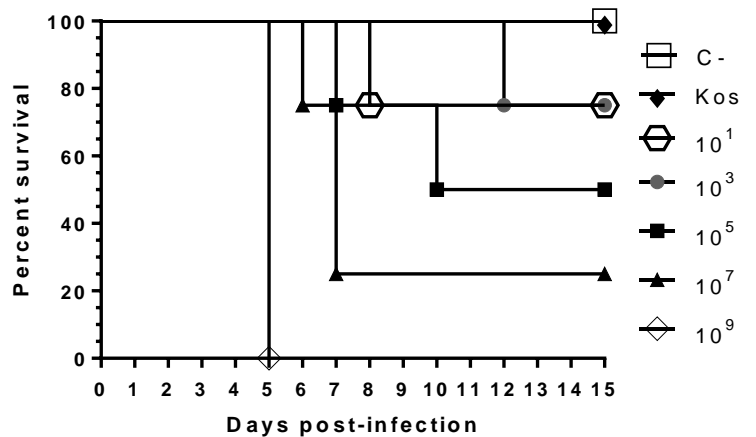
A**B****C**

Fig. 1 Clinical signs and mortality evaluation. (A) Average weight gain of animals inoculated with 20 μ l of PBS via intranasal (C- group), animals infected via intranasal with 20 μ l containing 10^9 PFU of HSV-1 KOS strain (Kos group) and animals inoculated with 20 μ l of HSV-1 EK antigen via intranasal with 10^1 PFU (10^1 group), 10^3 PFU (10^3 group), 10^5 PFU (10^5 group), 10^7 PFU (10^7 group) and 10^9 PFU (10^9 group). Data are expressed as mean \pm s.d.; (B) Overall mean total clinical signs score of C- (●), Kos (◆), 10^1 (▲), 10^3 (▼), 10^5 (▽), 10^7 (○) and 10^9 (◇) group. Lines represent median values Each clinical signs were scored as 1-3 according to severity and the sum of

clinical signs is represented on the graph; (C) Median survival of C- (\square), Kos (\blacklozenge), 10^1 (\hexagon), 10^3 (\bullet), 10^5 (\blacksquare), 10^7 (\triangle) and 10^9 (\diamond) group.

IFN- γ evaluation

IFN- γ mean concentration was performed to assess if animals infected with HSV-1 EK and with HSE clinical signs presented an increase in IFN- γ . The mean concentration of IFN- γ was of 12.28 pg/ml in animals uninfected with HSV-1 EK, 26.38 pg/ml in animals infected with HSV-1 EK without HSE (Healthy animals) and 60.57 pg/ml in animals infected with HSV-1 EK with HSE (HSE animals). There is a significant difference between animals uninfected and animals without HSE ($p=0.0381$) and between animals uninfected and animals with HSE ($p=0.0271$), however there is no significant difference between animals without HSE and animals with HSE ($p=0.0894$) (Fig.2).

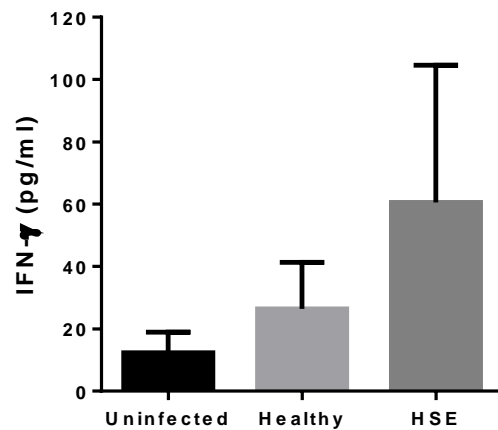


Fig. 2 Evaluation of IFN- γ mean concentration in uninfected animals (Uninfected), animals infected with HSV-1 EK without HSE clinical signs (Healthy) and animals infected with HSV-1 EK with HSE clinical signs (HSE). Data are expressed as mean \pm s.d.

HSV-1 quantification

The quantification of HSV-1 was performed by cell culture and RT-PCR in TG and brain. All animals infected with HSV-1 EK (10^1 - 10^9 groups) and with HSE clinical signs, showed HSV-1 viral particles on TG and Brain, with viral titer varying from 10^3 to 10^7 PFU/mL in culture cells (which demonstrate viral replication) and 10^3 to 10^9 copies/ml in RT-PCR.

Cell culture of Kos group showed higher concentration of HSV-1 particles in TG and a significant difference when compared to 10^1 ($p=0.0002$), 10^3 ($p=0.022$), 10^5 ($p=0.025$), 10^7 ($p=0.0002$) and 10^9 ($p=0.0002$) groups. TG of Kos group showed higher concentration and was statistically significant when was evaluated in RT-PCR and was compared to 10^1 ($p=0.0002$), 10^3 ($p<0.0001$) and 10^5 ($p=0.01$) groups. When the quantification in brain was evaluated by cell culture the groups 10^1 ($p=0.03$), 10^3 ($p=0.003$), 10^7 ($p=0.002$) and 10^9 ($p=0.0005$) presented a significant difference and higher concentration of HSV-1 particles when compared to Kos group. Besides that, the evaluation by RT-PCR showed a significant difference and higher concentration of HSV-1 particles between the groups 10^1 ($p=0.0002$), 10^3 ($p<0.0001$), 10^5 ($p<0.0001$), 10^7 ($p<0.0001$) and 10^9 ($p<0.0001$) when compared to Kos group (Fig.3).

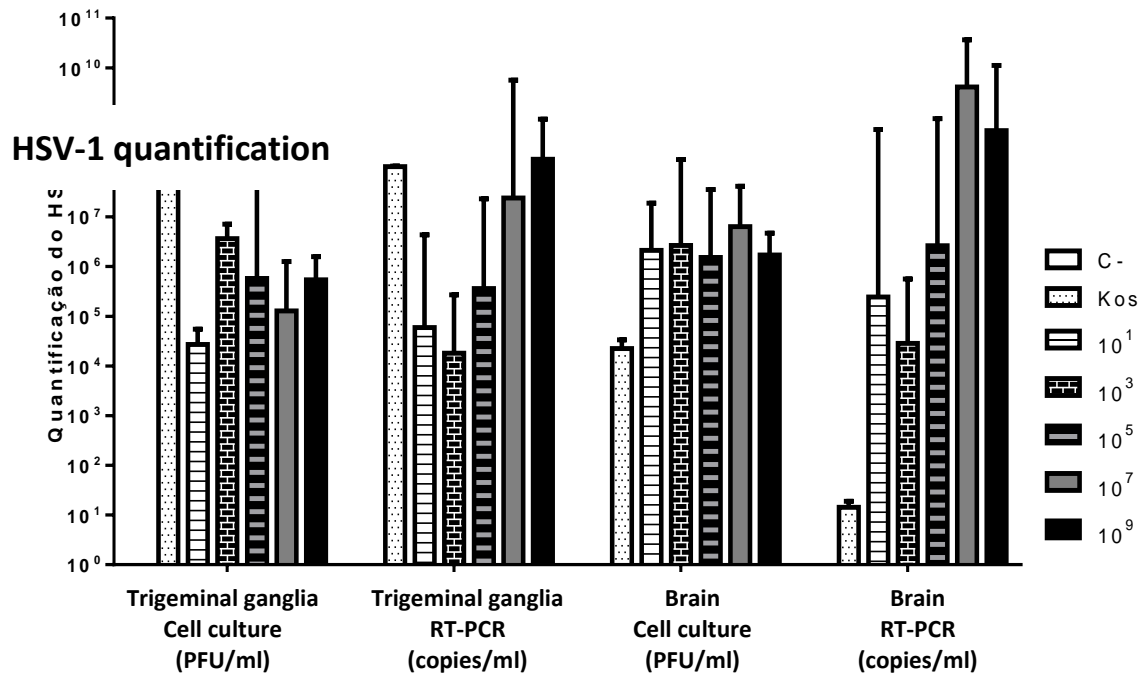


Fig.3 HSV-1 titer found in TG and brain of BALB/c mice measured by Vero cell culture (PFU/ml) and RT-PCR (copies/ml). Data are expressed as mean \pm s.d.

Discussion

The development of new experimental models of HSE *in vivo* is necessarily to evaluate HSE disease and development of new antivirals against HSE. The majority of experimental models of HSE use the intracerebral inoculation of HSV-1 which is more painful, stressfull and the inoculation can be difficult to perform (Turner et al. 2011). HSV-1 intranasal inoculation is considered to be excellent as models for human HSE because they mimic the hypothesized route of infection, where it is believed that the virus enters the CNS via olfactory pathway until he arrives on TG (Esiri 1982; Johnson & Valyi-Nagy 1998). Besides that, intranasal infection has been utilized to assess vidarabine and acyclovir efficacy in HSV treatment (Kern et al. 1982; Kern et al. 1986). Thus in this work we evaluated a new HSE experimental model of intranasal challenge

of BALB/c mice with HSV-1 EK, a new strain of HSV-1 isolated from a Brazilian patient.

It is known that the normal body weight and absence of clinical signs excludes conditions associated with brain degeneration and cognitive function loss which could be found in a HSE condition (Gallagher & Rapp 1997). In this study, we demonstrated that intranasal inoculation of HSV-1 EK could cause HSE clinical signs in mice inoculated with 10^1 to 10^9 PFU, decrease weight gain in groups inoculated with a concentration above 10^5 PFU and could cause significant mortality, especially in animals inoculated with 10^9 PFU of virus which showed 100% of mortality.

When IFN- γ mean concentration was evaluated, animals with HSE clinical signs demonstrated increased concentration of IFN- γ when compared with animals infected with the virus but without HSE clinical signs and animals uninfected. Previous studies demonstrated that IFN- γ can increase in animals and humans with HSE (Sancho-Shimizu et al. 2007; Sheridan & Beck 2008).

The quantification of HSV replication by real time PCR demonstrated that animals with HSE clinical signs showed high viral titer of HSV-1 EK on TG and Brain. In general, viral replication in brain, as happened on animals infected with HSV-1 EK, is associated to HSE (Kastrukoff et al. 2012; Vilela et al. 2008). Besides that, the infection with HSV-1 EK demonstrated significant difference and higher concentration in brains of mice evaluated by cell culture from groups 10^1 , 10^3 , 10^7 and 10^9 and brains of mice evaluated by RT-PCR from all groups (10^1 - 10^9). However, TG of Kos group showed higher concentration of virus particles when evaluated by cell culture and RT-PCR than animals infected with HSV-1 EK. These results demonstrated that animals infected with HSV-1 EK have a significant increase in HSV-1 EK particles and virus replication in brains but not in TG when compared to animals infected with HSV-1 Kos

infection. This might have occurred because HSV-1 EK had more replication in brain causing HSE and the replication of HSV-1 KOS was highest in TG. Together these data demonstrated that HSV-1 EK could produce HSE in BALB/c mice.

In conclusion, these findings demonstrated that intranasal challenge of BALB/C with HSV-1 EK strain can induce HSE. This experimental model seems very useful and this method of inoculation is less painful to animals than inoculation via intracerebral or via intracranial of HSV-1. These findings shows that HSV-1 EK inoculated via intranasal can be used to produce HSE and the disease depend on the dose and the strain used in the experimental infection. This model could be used to evaluate HSE immunological response, HSE neuropathogenesis, kinetics of HSE infection and to study the utilization of new antivirals against HSE *in vivo*.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Erna Geessien Kroonnos from Federal University of Minas Gerais (UFMG) for providing the strain HSV-1 EK. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Edital Universal 14/2011), Programa Estratégico de Pesquisa em Saúde VI (PAPES)/FIOCRUZ/CNPq (Brazil, to MAC); INCTV/CNPq/FAPEMIG; Brazil, to MAC. and Oswaldo Cruz Foundation–IOC.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Bacon TH, Levin MJ, Leary JJ, Sarisky RT, Sutton D (2003). Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. *Clin Microbiol Rev* 16: 114-28.
- Baringer JR (2008). Herpes simplex infections of the nervous system. *Neurol Clin* 26: 657-74, viii.
- Brown TJ, McCrary M, Tyring SK (2002). Antiviral agents: Non-antiretroviral [correction of Nonantiviral] drugs. *J Am Acad Dermatol* 47: 581-99.
- Dalkvist J, Wahlin TB, Bartsch E, Forsbeck M (1995). Herpes simplex and mood: a prospective study. *Psychosom Med* 57: 127-37.
- Dambrosi S, Martin M, Yim K, Miles B, Canas J, Sergerie Y, Boivin G (2010). Neurovirulence and latency of drug-resistant clinical herpes simplex viruses in animal models. *J Med Virol* 82: 1000-6.
- De Clercq E, Luczak M (1976). Intranasal challenge of mice with herpes simplex virus: an experimental model for evaluation of the efficacy of antiviral drugs. *J Infect Dis* 133 Suppl: A226-36.
- De Tiege X, Rozenberg F, Heron B (2008). The spectrum of herpes simplex encephalitis in children. *Eur J Paediatr Neurol* 12: 72-81.
- Dix RD, McKendall RR, Baringer JR (1983). Comparative neurovirulence of herpes simplex virus type 1 strains after peripheral or intracerebral inoculation of BALB/c mice. *Infect Immun* 40: 103-12.
- Drummond CW, Eglin RP, Esiri MM (1994). Herpes simplex virus encephalitis in a mouse model: PCR evidence for CNS latency following acute infection. *J Neurol Sci* 127: 159-63.
- Enquist LW, Husak PJ, Banfield BW, Smith GA (1998). Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Adv Virus Res* 51: 237-347.
- Ernst ME, Franey RJ (1998). Acyclovir- and ganciclovir-induced neurotoxicity. *Ann Pharmacother* 32: 111-3.
- Esiri MM (1982). Herpes simplex encephalitis. An immunohistological study of the distribution of viral antigen within the brain. *J Neurol Sci* 54: 209-26.
- Fatahzadeh M, Schwartz RA (2007). Human herpes simplex labialis. *Clin Exp Dermatol* 32: 625-30.

Gallagher M, Rapp PR (1997). The use of animal models to study the effects of aging on cognition. *Annu Rev Psychol* 48: 339-70.

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

Itoyama Y, Sekizawa T, Openshaw H, Kogure K, Goto I (1991). Early loss of astrocytes in herpes simplex virus-induced central nervous system demyelination. *Ann Neurol* 29: 285-92.

Johnson M, Valyi-Nagy T (1998). Expanding the clinicopathologic spectrum of herpes simplex encephalitis. *Hum Pathol* 29: 207-10.

Kastrukoff LF, Lau AS, Thomas EE (2012). The effect of mouse strain on herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection of the central nervous system (CNS). *Herpesviridae* 3: 4.

Kern ER, Richards JT, Glasgow LA, Overall JC, Jr., de Miranda P (1982). Optimal treatment of herpes simplex virus encephalitis in mice with oral acyclovir. *Am J Med* 73: 125-31.

Kern ER, Richards JT, Overall JC, Jr. (1986). Acyclovir treatment of disseminated herpes simplex virus type 2 infection in weanling mice: alteration of mortality and pathogenesis. *Antiviral Res* 6: 189-95.

Kimberlin DW (2007). Management of HSV encephalitis in adults and neonates: diagnosis, prognosis and treatment. *Herpes* 14: 11-6.

Kleymann G (2003). Novel agents and strategies to treat herpes simplex virus infections. *Expert Opin Investig Drugs* 12: 165-83.

Kneen R, Jakka S, Mithyantha R, Riordan A, Solomon T (2010). The management of infants and children treated with aciclovir for suspected viral encephalitis. *Arch Dis Child* 95: 100-6.

Kristensson K, Svennerholm B, Lycke E (1983). Herpes simplex virus-induced demyelination. Effects of reinfection and challenge with neuroantigens. *J Neurol Sci* 60: 247-52.

Kristensson K, Svennerholm B, Persson L, Vahlne A, Lycke E (1979). Latent herpes simplex virus trigeminal ganglionic infection in mice and demyelination in the central nervous system. *J Neurol Sci* 43: 253-63.

Kristensson K, Vahlne A, Persson LA, Lycke E (1978). Neural spread of herpes simplex virus types 1 and 2 in mice after corneal or subcutaneous (footpad) inoculation. *J Neurol Sci* 35: 331-40.

Kuo YC, Chen CC, Tsai WJ, Ho YH (2001). Regulation of herpes simplex virus type 1 replication in Vero cells by *Psychotria serpens*: relationship to gene expression, DNA replication, and protein synthesis. *Antiviral Res* 51: 95-109.

Lopez C (1975). Genetics of natural resistance to herpesvirus infections in mice. *Nature* 258: 152-3.

McLean JH, Shipley MT, Bernstein DI, Corbett D (1993). Selective lesions of neural pathways following viral inoculation of the olfactory bulb. *Exp Neurol* 122: 209-22.

Miller CS, Danaher RJ, Jacob RJ (1998). Molecular aspects of herpes simplex virus I latency, reactivation, and recurrence. *Crit Rev Oral Biol Med* 9: 541-62.

Mott KR, Gate D, Zandian M, Allen SJ, Rajasagi NK, van Rooijen N, Chen S, Arditi M, Rouse BT, Flavell RA, Town T, Ghiasi H (2011). Macrophage IL-12p70 signaling prevents HSV-1-induced CNS autoimmunity triggered by autoaggressive CD4+ Tregs. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52: 2321-33.

Nadelman CM, Newcomer VD (2000). Herpes simplex virus infections. New treatment approaches make early diagnosis even more important. *Postgrad Med* 107: 189-95, 199-200.

Riera-Mestre A, Gubieras L, Martinez-Yelamos S, Cabellos C, Fernandez-Viladrich P (2009). Adult herpes simplex encephalitis: fifteen years' experience. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 27: 143-7.

Sancho-Shimizu V, Zhang SY, Abel L, Tardieu M, Rozenberg F, Jouanguy E, Casanova JL (2007). Genetic susceptibility to herpes simplex virus 1 encephalitis in mice and humans. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 7: 495-505.

Sciubba JJ (2003). Herpes simplex and aphthous ulcerations: presentation, diagnosis and management--an update. *Gen Dent* 51: 510-6.

Sheridan PA, Beck MA (2008). The immune response to herpes simplex virus encephalitis in mice is modulated by dietary vitamin E. *J Nutr* 138: 130-7.

Steiner I, Kennedy PG, Pachner AR (2007). The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster. *Lancet Neurol* 6: 1015-28.

Stock C, Guillen-Grima F, de Mendoza JH, Marin-Fernandez B, Aguinaga-Ontoso I, Kramer A (2001). Risk factors of herpes simplex type 1 (HSV-1)

infection and lifestyle factors associated with HSV-1 manifestations. *Eur J Epidemiol* 17: 885-90.

Tomlinson AH, Esiri MM (1983). Herpes simplex encephalitis. Immunohistological demonstration of spread of virus via olfactory pathways in mice. *J Neurol Sci* 60: 473-84.

Townsend JJ (1981). The demyelinating effect of corneal HSV infections in normal and nude (athymic) mice. *J Neurol Sci* 50: 435-41.

Turner PV, Brabb T, Pekow C, Vasbinder MA (2011). Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 50: 600-13.

Vilela MC, Mansur DS, Lacerda-Queiroz N, Rodrigues DH, Arantes RM, Kroon EG, Campos MA, Teixeira MM, Teixeira AL (2008). Traffic of leukocytes in the central nervous system is associated with chemokine up-regulation in a severe model of herpes simplex encephalitis: an intravital microscopy study. *Neurosci Lett* 445: 18-22.

Wakisaka H, Hato N, Honda N, Takahashi H, Kisaki H, Murakami S, Gyo K, Mominoki K, Kobayashi N, Matsuda S (2002). Demyelination associated with HSV-1-induced facial paralysis. *Exp Neurol* 178: 68-79.

Whitley RJ, Kimberlin DW, Roizman B (1998). Herpes simplex viruses. *Clin Infect Dis* 26: 541-53; quiz 554-5.

Zhe R, Mei-Ying Z, Kitazato K, Kobayash N, Qin-Chang Z, Pei-Zhuo Z, Zhi-Rong Y, Yi-Fei W (2008). Effect of siRNA on HSV-1 plaque formation and relative expression levels of UL39 mRNA. *Arch Virol* 153: 1401-6.

4.3. Artigo 3 - Effects of RNA interference therapy against Herpes simplex virus type I encephalitis

Os resultados apresentados neste manuscrito são referentes ao objetivo específico 3, 4 e 5:

- Avaliar a cinética do tratamento da HSE com siRNA anti-HSV-1 em camundongos BALB/c;
- Verificar a influencia do número de doses de siRNA anti-HSV-1 inoculados em camundongos BALB/c no tratamento da encefalite herpética;
- Comparar a eficácia do tratamento utilizando siRNA anti-HSV-1 com o tratamento utilizando aciclovir em modelo de HSE em em camundongos BALB/c infectados experimentalmente com HSV-1.

Situação do manuscrito: Aceito para publicação na revista Antiviral therapy

Title: Effects of RNA interference therapy against Herpes simplex virus type I encephalitis

Author's name: Alexandre S. da Silva^{1,*}, Jéssica V. Raposo¹, Tiago C. Pereira², Marcelo A. Pinto¹ and Vanessa S. de Paula¹

Intitutional affiliations:

¹Oswaldo Cruz Institute/ Oswaldo Cruz Foundation; Laboratory of Viral Technology Development; Av. Brasil, 4365, Manguinhos; Rio de Janeiro, RJ, Brazil; Zip code: 21360-040.

²University of São Paulo - Ribeirão Preto/USP-Ribeirão Preto; Department of Biology, Faculty of Philosophy, Sciences and Languages of Ribeirão Preto; Av. Bandeirantes, 3900, Monte Alegre; Ribeirão Preto - SP. Zip code 14040-901.

Running head: Effects of RNA interference therapy against HSE

*** Corresponding author:**

Alexandre S. da Silva/Vanessa S. de Paula

Institution: Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ; Pav. Helio e Peggy Pereira; Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Zip code: 21360-040

Telephone number: 55 21 25621900

E-mail: alesantosbio@yahoo.com.br or vdepaula@ioc.fiocruz.br

ABSTRACT

BACKGROUND: Herpetic encephalitis (HSE) is caused mainly by herpes simplex virus 1 (HSV-1) with an annual incidence of 1-4 cases/million inhabitants. Currently, HSE treatment faces difficulties such as the use of antivirals with elevated toxicity, metabolic side effects and HSV-1 resistance. An alternative to antivirals is the use of small interfering RNA (siRNA) as a viral replication inhibitor. In this work, siRNA targeting UL-39 region was evaluated for HSE treatment *in vivo*. **METHODS:** BALB/c mice were inoculated with HSV-1 and treated with siRNA. The treatment was evaluated through kinetics of HSV-1 replication inhibition, number of siRNA doses administered and treatment with siRNA plus acyclovir. All groups were evaluated for signs of HSE, mortality and HSV-1 replication inhibition. **RESULTS:** The treated group of the kinetic experiment demonstrated a reduction of HSE signs and an HSV-1 replication inhibition of 43.6%-99.9% in the brain and 53%-98% in trigeminal ganglia (TG). Animals treated with one or two doses of siRNA had a prolonged survival time, reduced clinical signs of HSE and HSV-1 replication inhibition of 67.7% in brains and 85.7% in TG of animals treated with two doses of siRNA. Also, animals treated with siRNA plus acyclovir demonstrated reduced signs of HSE and mortality, as well as HSV-1 replication inhibition in the brain (83.2%) and TG (74.5%). **CONCLUSIONS:** These findings demonstrated that siRNA was capable of reducing HSE clinical signs, prolonging survival time and inhibiting HSV-1 replication in mice. Thus, siRNA can be a potential alternative to the standard HSE treatment especially to reduce the clinical signs and extend survival time *in vivo*.

Keywords: HSV-1; Herpetic encephalitis; RNA interference; siRNA.

1. Introduction

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is a member of the *Herpesviridae* family with a prevalence of above 70% in the world population [1, 2] and symptomatology varying from an asymptomatic infection to vesicular lesions, gingivostomatitis, keratoconjunctivitis and Herpetic encephalitis (HSE) [3].

HSE is the most common cause of encephalitis in occidental countries, with an annual incidence of 1-4 cases/million inhabitants [4]. HSE is associated with development of meningeal signs, cervical rigidity, photophobia, reduced level of consciousness, behavioral disturbances and/or focal neurologic signs such as seizures or motor deficits [4-6]. Without treatment, HSE results in the death of approximately 70% of infected patients and only 2%-3% of survivors return to present normal neurological functions [4, 7]. HSE treatment begins with acyclovir [4, 6, 8, 9], but nevertheless the mortality and morbidity are substantial and sequelae such as aphasia, amnesia, behavioral changes and seizures are common in 62% of survivors [4, 10]. Moreover, acyclovir treatment may cause renal and hepatic impairment, diarrhea, seizures, hallucinations and coma [11-13]. The occurrence of HSV-1 resistance is 0.7% in immunocompetent and 4%-7% of immunosuppressed persons [14, 15]. In cases of acyclovir resistance the antiviral foscarnet is used [16], which presents high renal toxicity, anemia without neutropenia, nausea, vomit, headaches and disturbances in the CNS [3, 17, 18]. This resistance and toxicity combined with the high mortality caused by HSE renders the development of new anti-herpetic therapy indispensable.

The RNA interference process (RNAi) was unveiled in the last decade and consequently has been increasingly used to study gene functions. The RNAi mechanism of action occurs by processing of long double-stranded RNAs into short duplexes of 21-

25 nucleotides called small interfering RNAs (siRNAs). These siRNAs intermediate the degradation of messenger RNAs (mRNA) which hinder protein synthesis [19, 20].

RNAi can be used as an antiviral therapy with virus mRNA silencing and consequent inhibition of viral replication [21-26]. RNAi has also been evaluated on experimental infections in mice for the treatment of viral encephalitis caused by the *West Nile virus* [27] and *Japanese encephalitis virus* [28], and it demonstrated efficacy in treating viral encephalitis. These examples suggest that specific sequences of siRNA can be used to inhibit viral replication and treat viral encephalitis.

Currently, antiviral treatment of HSE presents toxicity, several side effects and antiviral resistance, thus making the search for new alternatives essential. Recent works have demonstrated the inhibition of HSV-1 replication *in vitro* with the use of siRNA [29, 30]. To investigate whether siRNA can be used *in vivo* to inhibit HSV-1 replication and HSE clinical signs, we evaluated the effects of siRNA in an HSE experimental model of BALB/c mice.

2. Methods

2.1 Ethical aspects

All animal studies were conducted at the Oswaldo Cruz Foundation–IOC and were approved by the Ethical committee of animal use (CEUA)–Fiocruz under protocol number LW-28/12.

2.2 Cell lines and virus

African green monkey *Cercopithecus aethiops* kidney cells (Vero cells, ATCC CCL81) were cultured in Medium 199 (Sigma), with fetal bovine serum 2% (FBS-Cultilab), 0.1 μ M of HEPES buffer (Sigma) and 2.5 μ g/mL of Gentamycin (Schering). The cultures were maintained at 37°C with 5% CO₂.

10⁶ PFU of strain HSV-1-EK was allowed to multiply in Vero cell culture and maintained in Medium 199 with FBS 2% (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 25 µg/µL Penicillin-Streptomycin (GIBCO®/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10 mM HEPES buffer (Sigma, St. Louis, MO, USA), 1g/L NAHCO₃ (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 2 mM L-glutamine (GIBCO®/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Then at 48h post-inoculation the cells were lysed by 3 cycles of freezing and thawing, centrifuged at 4000xg for 20min at 4°C. The supernatant was collected and the viral titer was dosed by the plaque assay method [31].

2.3 BALB/c mice infection with HSV-1 EK

Three to four-week old male BALB/c mice were obtained from the Laboratory Animal Breeding Center (Cecal) and were subjected to an acclimation period prior to use. Room temperature was 25°C and relative humidity was 65%. Mice were kept under an artificial 12:12 hour light/dark regime. Mouse chow and water were available *ad libitum*. To reproduce HSE infection, mice were anesthetized with ketamine i.p. (60 mg/kg) and infected with 20 µl of PBS containing 10⁹ PFU of HSV-1 EK via intranasal [32] or only with 20 µl of PBS (control group).

2.4 siRNA sequence and RVG-9R

The siRNA sequence was designed to be specific against gene UL-39 (responsible for coding the large subunit of the ribonucleotide reductase enzyme) of HSV-1 with sense sequence 5'-CUGCACCAUGAUCAUCGACdTdT-3' and antisense sequence 5'-GUCGAUGAUCAUGGUGCAGdTdT-3' [30].

siRNA was complexed with RVG-9R (peptide derived from *Rhabdovirus* glycoprotein and recognized by acetylcholine receptors of CNS) in a 1:10 ratio and dissolved in 5% glucose [33] to allow the crossing of the brain-blood-barrier.

RVG-9R was evaluated alone to determine if this peptide could inhibit HSV-1 replication. Mice were divided into three groups: RVc (inoculated with PBS via intranasal), RVut (infected with 10^9 PFU of HSV-1 EK via intranasal) and RVt (infected with 10^9 PFU of HSV-1 EK via intranasal and inoculated with RVG-9R via intracaudal 30 minutes after infection). The animals that survived were euthanized on day 12 post infection (p.i.).

2.5 HSV-1 Kinetics following siRNA treatment

To evaluate HSV-1 replication inhibition by siRNA:RVG-9R anti-HSV-1, the mice were divided into control group (Kc), untreated group (Kut) and treated group (Kt). The Kc group (n=7) was inoculated via intranasal with PBS, Kut group (n=14) was inoculated via intranasal with 10^9 PFU of HSV-1 EK and Kt group (n=14) was inoculated via intranasal with 10^9 PFU of HSV-1 EK and treated with 50 μ g of siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 in 100 μ l of PBS via intracaudal [27] 30 minutes after infection. One mouse from the Kc group, two mice from Kut group and two mice from Kt group were euthanized daily until day 7p.i.

2.6 Dose evaluation of siRNA treatment

After the HSV-1 Kinetic experiment, two separated experiments were performed to evaluate the effect of one and two doses of siRNA:RVG-9R anti-HSV-1.

To evaluate the treatment with one dose of siRNA:RVG-9R anti-HSV-1, mice were split in 3 groups: control group (Tc), untreated group (Tut) and treated group (Tt). Tc group (n=7) was inoculated via intranasal with PBS, Tut group (n=10) was inoculated via intranasal with 10^9 PFU of HSV-1 EK and Tt group (n=10) was inoculated via intranasal with 10^9 PFU of HSV-1 EK and was treated with 50 μ g of siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 in 100 μ l of PBS via intracaudal 30 minutes after infection. The animals that survived were euthanized on day 12p.i.

The second experiment with two doses was performed with control group (2Tc), untreated group (2Tut) and treated group (2Tt) with 8 animals per group. The 2Tc group and 2Tut group were inoculated as the groups Tc and Tut respectively and the 2Tt group was inoculated via intranasal with 10^9 PFU of HSV-1 EK and was treated with 50 μ g of siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 in 100 μ l of PBS via intracaudal 30 minutes after infection and on day 3p.i. The animals that survived were euthanized on day 12p.i.

2.7 Utilization of siRNA combined with acyclovir

To assess the possibility of using siRNA:RVG-9R combined with acyclovir in HSE treatment, the mice were divided into 5 groups: Cc group (inoculated via intranasal with PBS), CUt group (inoculated via intranasal with 10^9 PFU of HSV-1 EK), CRt group (inoculated via intranasal with 10^9 PFU of HSV-1 EK and treated with 50 μ g of siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 in 100 μ l of PBS via intracaudal 30 minutes after infection), CAAt group (inoculated via intranasal with 10^9 PFU of HSV-1 EK and treated with 50 mg/kg of acyclovir via intraperitoneal on day 1p.i. and CRt+At group (inoculated via intranasal with 10^9 PFU of HSV-1 EK and treated with 50 μ g of siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 in 100 μ l of PBS via intracaudal 30 minutes after infection and with 50 mg/kg of acyclovir via intraperitoneal on day 1p.i.). All groups were composed of 7 mice and the animals that survived were euthanized on day 12p.i.

2.8 Evaluation of clinical signs

Survival curves were estimated using the Kaplan-Meyer method and compared by the log-rank test. Mice were observed daily and the sum of clinical scores based on severity were documented. Clinical signs with score 1 represent the beginning of HSE, while score 2 represents a more advanced stage of the disease. The scores varying from 1-3 represent the clinical signs which may vary from animal to animal with HSE infection (score 1 is the least severe and score 3 is the most severe clinical sign

evaluated). The clinical signs evaluated were weight loss between 20%-30% (score 1), ruffled fur (score 1 to 3), tremors (score 1 to 3), keratoconjunctivitis (score 2), loss of postural reflex (score 1 to 3), loss of strength (score 2), hunched posture (score 2), circling (score 2) and ataxia (score 1 to 3). Mice were sacrificed if they presented three or more of the HSE clinical signs evaluated.

2.9 Evaluation of viral replication inhibition

Whole mice brain and TG were collected after death or euthanasia and HSV-1 DNA was extracted using a QIAamp DNA kit as per the manufacturer's instructions. Virus replication was evaluated by relative real-time PCR quantification amplification with $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method of target gene UL-39 of HSV-1 (primers: 5'-CCAACTGCACCATGATCATCGA-3' and 5'-GATGTTTGTCCACCGCAACGAA-3') [30] with the GAPDH as endogenous control.

2.10 Statistical analysis

Data was analyzed by Student *t* test with Graphpad prism 6 software. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

3. Results

3.1 RVG-9R evaluation

To evaluate if RVG-9R alone could be responsible for HSV-1 replication inhibition we utilized BALB/c mice infected and inoculated or not inoculated with RVG-9R via intracaudal. The animals inoculated with RVG-9R did not demonstrate any differences in the reduction of HSE clinical signs ($p=0.7059$) (Figure 1A), mortality ($p=0.217$) (Figure 1B). HSV-1 replication inhibition was not found in the brain and TG when RVG-9R was inoculated alone without siRNA anti-HSV-1.

3.2 HSV-1 kinetics in mice treated with siRNA

In order to determine whether siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 can be used to inhibit HSV-1 replication, clinical signs and HSV-1 replication inhibition were assessed daily until day 7p.i. The treatment with siRNA provided increased cumulative weight gain after infection ($p=0.0436$) (Figure 2A) when compared to untreated animals. Additionally, the overall clinical score demonstrated a reduction of the HSE clinical signs ($p=0.0419$) (Figure 2B). Only three animals from the treated group (Kt) presented HSE clinical signs (weight loss and ruffled fur).

To evaluate HSV-1 replication inhibition, brains and TG were collected from euthanized animals, extracted and the viral replication inhibition was assessed daily (Figure 2C).

Viral replication inhibition in the brain began on day 2p.i. (66%), continued on day 3p.i. (43.6%), then on day 4p.i. there was an absence of HSV-1 replication inhibition. On day 5p.i. the inhibition was 99.6% with a decrease on day 6p.i. (96.6%) and then an increase on day 7p.i. (99.9%). Unlike the brains of the mice, HSV-1 replication inhibition in TG began on day 1p.i. (68.2%) with an increase on day 2p.i. (92.4%) and a decrease on day 3 p.i. (53%). Day 4p.i. was the only day that did not present any virus replication inhibition. On day 5p.i. the inhibition was 98% and continues to decline until day 7p.i. (79.9%).

In order to be certain of these results, this experiment was repeated twice with the same number of mice and it produced the same results. These results demonstrate that siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 can reduce clinical signs of HSE and can be used to inhibit HSV-1 replication in BALB/c mice in this experimental HSE mouse model.

3.3 Dose evaluation of siRNA treatment

Following the HSV-1 kinetics evaluation of siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 efficacy, mice were treated with one or two doses of siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 to evaluate the median survival and if the quantity of siRNA:RVG-9R doses is important to inhibit HSV-1 replication. Two separate experiments were carried out for this evaluation. The first experiment consisted of animals treated on the day of infection and for the second experiment the animals were treated on the day of infection plus a booster 3 days post-infection.

Mice treated with one dose of siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 (Tt group) died between 7-10 days p.i. and presented a median survival of 9 days while the untreated group (Tut) died between 6-8 days p.i. and presented a median survival of 7.5 days (Figure 3A). Also, Tt and Tut group presented a 40% survival rate. Mice treated with two doses of siRNA:RVG-9R (2Tt group) presented a 25% survival rate, a median survival of 7.5 days and death between 6-9 days p.i., while the untreated group (2Tut) presented median survival of 7 days and death between 6-8 days p.i. (Figure 3B) with no survivors from the HSE infection. There was no reduction in mortality between the Tt and Tut groups ($p=0.549$) and between the 2Tt and 2Tut groups ($p=0.6553$).

The cumulative weight gain after infection was not statistically significant in animals from Tt group ($p=0.649$) (Figure 3C), but was statistically significant ($p=0.0012$) in mice from 2Tt group compared to untreated animals (Tut group and 2Tut group respectively) (Figure 3D). The reduction of HSE clinical signs was significant in the Tt group ($p=0.0226$) and in the 2Tt group ($p=0.0459$) (Figure 3E and 3F respectively).

HSV-1 replication inhibition was evaluated in brains and TG of mice infected with one and two doses of siRNA:RVG-9R anti-HSV-1. The results demonstrated

HSV-1 replication inhibition in brains (40.5%) and TG (70%) of animals treated once and HSV-1 replication inhibition in brains (67.7%) and TG (85.7%) of animals treated twice (Figure 4). When compared, the animals treated with two doses of siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 presented higher percentage of HSV-1 replication inhibition in brain and TG compared to just one dose demonstrating the efficacy of multiple doses of siRNA inoculation.

3.4 Utilization of siRNA combined with acyclovir

After evaluating siRNA:RVG-9R as an HSV-1 replication inhibitor, we assessed whether siRNA:RVG-9R combined with acyclovir could reduce the clinical signs of HSE, reduce mortality and inhibit HSV-1 replication.

All animals from the untreated group (CUt) died on day 6p.i., while the animals treated with siRNA:RVG-9R (CRt) died between days 7-8p.i. with a median survival of 10 days and the group treated with acyclovir (CAt) died between days 6-9p.i. and presented a median survival of 6 days. All mice treated with siRNA:RVG-9R and acyclovir (CRt+At group) survived the infection. The other groups presented survival rates of 28.6% (CUt group), 50% (CRt group) and 33.3% (CAt group). Reduction of mortality was not significant between the CUt and CRt groups ($p=0.1485$), CUt and CAt groups ($p=0.5076$) or CRt and CAt groups ($p=0.4569$) but was statistically significant between the CRt+At group when compared with CUt group ($p=0.0072$), CRt group ($p=0.0359$) and CAt group ($p=0.0113$) (Figure 5A).

The cumulative weight gain after infection was not statistically significant in untreated animals (CUt group) when compared with animals treated with siRNA:RVG-9R (CRt group) ($p=0.5952$), acyclovir (CAt group) ($p=0.8793$) or with siRNA:RVG-9R combined with acyclovir (CRt+At) ($p=0.6902$). Also, the weight gain was not statistically significant in the CRt group compared with CAt group ($p=0.3837$) or the

CRT+At group compared with CAAt group ($p=0.2299$) but was statistically significant in the CRT+At group compared with CRt group ($p=0.0182$) (Figure 5B). Furthermore, only the CRt group ($p=0.0343$) and CRT+At group ($p=0.0298$) presented a reduction of HSE clinical signs when compared with the CUt group (Figure 5C).

The HSV-1 replication inhibition was evaluated in the brain and TG of all treated groups. Brains from CRt, CAAt and CRT+At presented HSV-1 replication inhibition of 40%, 67% and 83.2% respectively. Also, HSV-1 replication inhibition in TG was 84.8% in the CRt group, 71.5% in CAAt group and 74.5% in CRT+At group (Figure 5D).

4. Discussion

The present study utilized siRNA specific to the HSV-1 UL-39 gene inoculated into BALB/c mice infected with HSV-1 and evaluated the effects of the siRNA therapy on HSE. This study provides evidence that siRNA therapy can have beneficial effects such as a reduction of HSE clinical signs, increased survival time and inhibition of virus replication.

Initially, the evaluation of HSV-1 replication inhibition when RVG-9R was administered without siRNA anti-HSV-1 demonstrated that RVG-9R alone was unable to inhibit HSV-1 replication. This result demonstrates that HSV-1 replication inhibition caused by siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 occurs only with siRNA anti-HSV-1.

The evaluation of HSE clinical signs and virus replication inhibition in the kinetic experiment demonstrated an increase in weight for the animals treated with siRNA:RVG-9R anti-HSV-1. Expressive weight loss is an important consequence of HSE in mice and a weight gain as observed in this work is important to aid recovery from the disease [34]. Also, the Kt group presented a reduction in HSE clinical signs and only three animals presented clinical signs.

In the kinetic experiment, HSV-1 replication inhibition began on day 1p.i. in TG, unlike in the brain which presented viral replication inhibition beginning only on day 2p.i. This difference on the beginning of HSV-1 replication in brain and TG can be explained since HSV-1 arrives at TG 24 hours after HSV-1 infection. After entry and replication in TG, HSV-1 spreads to other parts of the CNS [35]. This fact demonstrates that the action of siRNA:RVG-9R in the brain in HSE only occurs after the infection in TG. On day 4p.i. HSV-1 replication inhibition was not detected in the brain and TG. This absence of inhibition has been explained by studies using a different experimental model of HSE. These studies used HSV-1 infection in C57BL/6 mice that demonstrated an elevation of VP16 (a protein involved in virus multiplication and initiation of immediate early genes of HSV-1) [36] after infection with a low expression on day 4p.i. and peak of expression on day 5p.i., decreasing until day 8p.i. [37]. Moreover, the absence of HSV-1 replication inhibition could have occurred because HSV-1 was not actively expressing VP16 on day 4p.i. and was not actively replicating. Consecutively siRNA was not able to silence HSV-1 mRNA.

Overall, percentage of virus replication inhibition varied from 43.6% to 99.9% in brains and from 53% to 98% in TG. The kinetic experiment demonstrated that viral replication inhibition varies from day-to-day and that the most efficient inhibition occurred especially on days 5-7p.i. in brains and TG. The high inhibition found on days 5-7p.i. is in accordance with *Kumar et al.* [33] who reported siRNA:RVG-9R inhibition until day 9p.i. in mice infected with *Japanese encephalitis virus*. The HSV-1 replication inhibition found in the kinetic experiment demonstrated that siRNA:RVG-9R could be used to inhibit HSV-1 replication in the brain and TG when inoculated early in HSE infection.

After the kinetic experiment we evaluated animals treated with one or two doses of siRNA:RVG-9R anti-HSV-1. The choice of inoculating the second dose of siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 on day 3p.i. was based on the day when there was an absence of virus replication inhibition (day 4p.i.). This inoculation was made on day 3p.i. so that siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 via intravascular could be transported to the SNC by day 4p.i. enabling the silencing of UL-39 mRNA through this siRNA booster treatment.

Tt and 2Tt mice survived longer than Tut and 2Tut mice. Additionally, Tt mice presented a median survival of 1 day longer than 2Tt and began to die on day 7p.i. while 2Tt group began to die on day 6p.i. The animals of 2Tt group presented a survival of 25% but this result demonstrated no statistical significance. These results demonstrated that a second dose of siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 does not extend median survival of BALB/c mice when compared to animals treated with only one dose of siRNA:RVG-9R anti-HSV-1.

Clinical signs of group treated with one and two doses experiments and weight loss from group treated with two doses presented statistical significance. This data together with HSE clinical signs data from the kinetic experiment demonstrated the advantage of siRNA therapy against HSE. Mice treated with one or two doses of siRNA:RVG-9R demonstrated fewer HSE clinical signs compared to untreated animals. All groups of the dose evaluation experiment had the same age and same viral inoculum (assessed by back titration), but nevertheless the groups Tut and 2Tut showed different results (Figure 3). This could be caused by other factors than BALB/c mice background such as the immune and inflammatory responses of the hosts [38].

The higher HSV-1 replication inhibition in brains (67.7%) and TG (85.7%) of animals treated twice demonstrated the additional effect of siRNA administration. The

second dose of siRNA therapy has been applied in various other works which have demonstrated that siRNA could easily be degraded in serum and consequently lose its efficacy [33, 39, 40]. Consequently, multiple doses of siRNA are recommended for antiviral therapy. To bypass this obstacle, we used RVG-9R associated with siRNA. RVG-9R protects siRNA from serum degradation for a few days, enabling the siRNA to cross the blood-brain barrier and reach the brain. RVG-9R alone does not overcome the necessity of multiple doses of siRNA because it does not extend siRNA half-life for more than several days [33], but it was extremely efficient in HSE therapy and HSV-1 replication inhibition.

In addition to siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 evaluation as antiviral treatment, the antiviral treatment using siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 combined with acyclovir was evaluated. Several works have demonstrated that the reduction of HSV-1 replication in brains was associated with better recuperation and decrease of mortality [41-44]. These studies are in accordance with our study which demonstrated an HSV-1 replication inhibition of 83.2% in the brain and 74.5% in TG when siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 was combined with acyclovir. This higher HSV-1 replication inhibition in the brain was capable of reducing HSE signs and to prevent the mortality of BALB/c mice infected with HSV-1. This demonstrates that siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 combined with acyclovir is more efficient than siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 alone or acyclovir alone in the treatment of HSE.

In conclusion, our results demonstrated that siRNA could be used *in vivo* to inhibit virus replication and reduce clinical signs of HSE disease. Moreover, this work demonstrated that siRNA treatment was able to increase mice survival time and prevent mortality. Despite decades of research on HSE, there is still no treatment that is effective to prevent the signs of this disease while presenting no side effects or

resistance. However, these results together suggest that early suppression of viral replication with the use of siRNA:RVG-9R alone or especially combined with acyclovir could be useful to prevent the clinical signs of HSE disease, HSV-1 replication and mortality.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Erna Geessien Kroonnos from Federal University of Minas Gerais (UFMG) and Dr. Marco Antônio Silva Campos of the René Rachou Research Center/Fiocruz-MG for providing the HSV-1 EK strain. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Edital Universal 14/2011) and Oswaldo Cruz Foundation–IOC.

Disclosure statement

The authors have nothing to disclose and no conflicts of interest to report.

REFERENCES

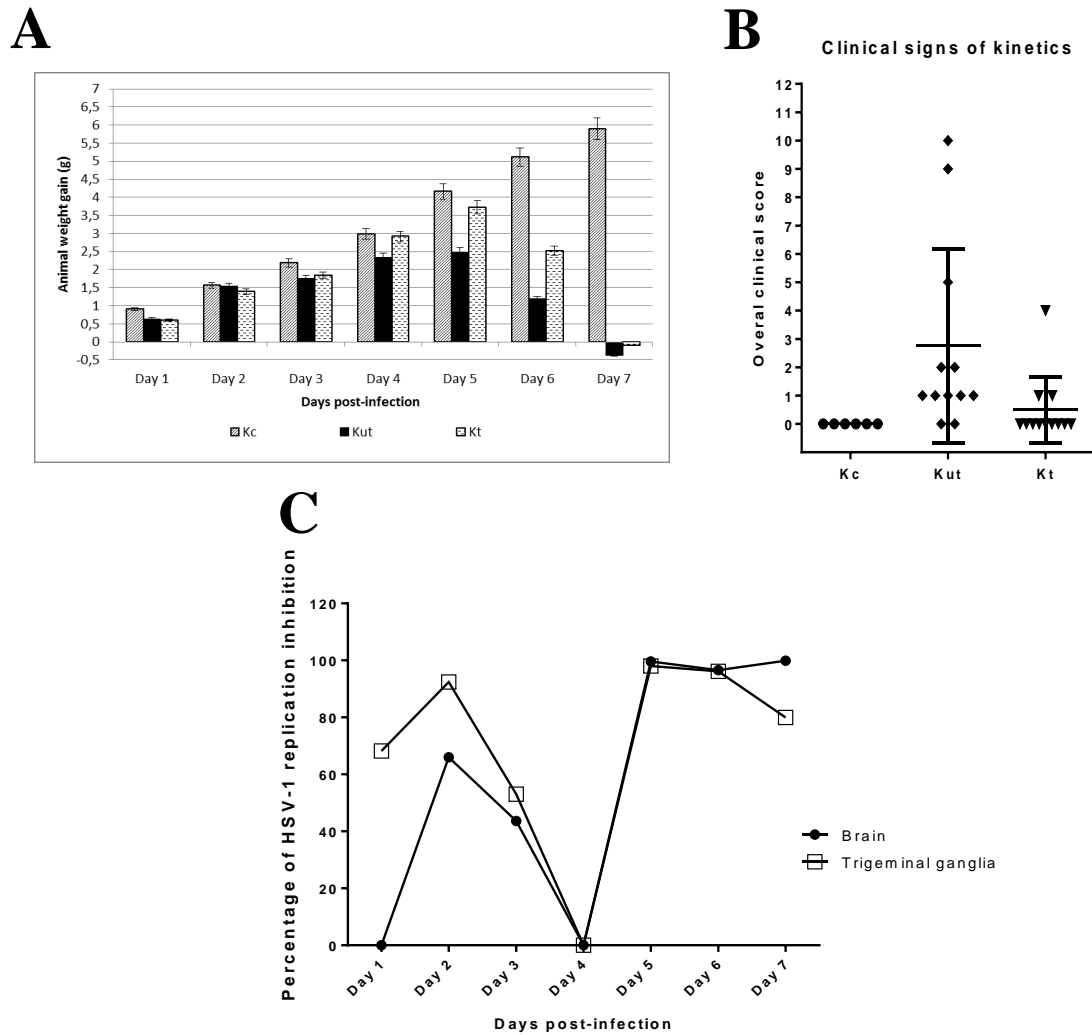
1. Stahl JP, Mailles A, Dacheux L, Morand P. Epidemiology of viral encephalitis in 2011. *Med Mal Infect* 2011; **41**:453-464.
2. Fatahzadeh M, Schwartz RA. Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J Am Acad Dermatol* 2007; **57**:737-763; quiz 764-736.
3. Fatahzadeh M, Schwartz RA. Human herpes simplex labialis. *Clin Exp Dermatol* 2007; **32**:625-630.
4. Kimberlin DW. Management of HSV encephalitis in adults and neonates: diagnosis, prognosis and treatment. *Herpes* 2007; **14**:11-16.
5. De Tiege X, Rozenberg F, Heron B. The spectrum of herpes simplex encephalitis in children. *Eur J Paediatr Neurol* 2008; **12**:72-81.
6. Kneen R, Jakka S, Mithyantha R, Riordan A, Solomon T. The management of infants and children treated with aciclovir for suspected viral encephalitis. *Arch Dis Child* 2010; **95**:100-106.

7. Baringer JR. Herpes simplex infections of the nervous system. *Neurol Clin* 2008; **26**:657-674, viii.
8. Arduino PG, Porter SR. Oral and perioral herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection: review of its management. *Oral Dis* 2006; **12**:254-270.
9. Kennedy PG. Viral encephalitis. *J Neurol* 2005; **252**:268-272.
10. Riera-Mestre A, Gubieras L, Martinez-Yelamos S, Cabellos C, Fernandez-Viladrich P. Adult herpes simplex encephalitis: fifteen years' experience. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; **27**:143-147.
11. Ernst ME, Franey RJ. Acyclovir- and ganciclovir-induced neurotoxicity. *Ann Pharmacother* 1998; **32**:111-113.
12. Johnson GL, Limon L, Trikha G, Wall H. Acute renal failure and neurotoxicity following oral acyclovir. *Ann Pharmacother* 1994; **28**:460-463.
13. Wilson SS, Fakioglu E, Herold BC. Novel approaches in fighting herpes simplex virus infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; **7**:559-568.
14. Gilbert C, Bestman-Smith J, Boivin G. Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. *Drug Resist Updat* 2002; **5**:88-114.
15. Bacon TH, Levin MJ, Leary JJ, Sarisky RT, Sutton D. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. *Clin Microbiol Rev* 2003; **16**:114-128.
16. Dambrosi S, Martin M, Yim K, *et al.* Neurovirulence and latency of drug-resistant clinical herpes simplex viruses in animal models. *J Med Virol* 2010; **82**:1000-1006.
17. Steiner I, Kennedy PG, Pachner AR. The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster. *Lancet Neurol* 2007; **6**:1015-1028.
18. Brown TJ, McCrary M, Tyring SK. Antiviral agents: Non-antiretroviral [correction of Nonantiviral] drugs. *J Am Acad Dermatol* 2002; **47**:581-599.
19. Hannon GJ, Rossi JJ. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 2004; **431**:371-378.
20. Mello CC, Conte D, Jr. Revealing the world of RNA interference. *Nature* 2004; **431**:338-342.
21. Alvarez R, Elbashir S, Borland T, *et al.* RNA interference-mediated silencing of the respiratory syncytial virus nucleocapsid defines a potent antiviral strategy. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**:3952-3962.

22. Kusov YY, Gosert R, Gauss-Muller V. Replication and in vivo repair of the hepatitis A virus genome lacking the poly(A) tail. *J Gen Virol* 2005; **86**:1363-1368.
23. Crowther C, Mowa MB, Ely A, Arbuthnot PB. Inhibition of hepatitis B virus replication in vivo using helper-dependent adenovirus vectors to deliver antiviral RNAi expression cassettes. *Antivir Ther* 2013.
24. Idrees S, Ashfaq UA, Khaliq S. RNAi: antiviral therapy against dengue virus. *Asian Pac J Trop Biomed* 2013; **3**:232-236.
25. Gupta PK, Sonwane AA, Singh NK, *et al.* Intracerebral delivery of small interfering RNAs (siRNAs) using adenoviral vector protects mice against lethal peripheral rabies challenge. *Virus Res* 2012; **163**:11-18.
26. Geisbert TW, Lee AC, Robbins M, *et al.* Postexposure protection of non-human primates against a lethal Ebola virus challenge with RNA interference: a proof-of-concept study. *Lancet* 2010; **375**:1896-1905.
27. Bai F, Wang T, Pal U, Bao F, Gould LH, Fikrig E. Use of RNA interference to prevent lethal murine west nile virus infection. *J Infect Dis* 2005; **191**:1148-1154.
28. Murakami M, Ota T, Nukuzuma S, Takegami T. Inhibitory effect of RNAi on Japanese encephalitis virus replication in vitro and in vivo. *Microbiol Immunol* 2005; **49**:1047-1056.
29. Perse AS, Freitas JL, de Paula VS. RNA interference inhibits herpes simplex virus type 1 isolated from saliva samples and mucocutaneous lesions. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2014.
30. Zhe R, Mei-Ying Z, Kitazato K, *et al.* Effect of siRNA on HSV-1 plaque formation and relative expression levels of UL39 mRNA. *Arch Virol* 2008; **153**:1401-1406.
31. Kuo YC, Chen CC, Tsai WJ, Ho YH. Regulation of herpes simplex virus type 1 replication in Vero cells by *Psychotria serpens*: relationship to gene expression, DNA replication, and protein synthesis. *Antiviral Res* 2001; **51**:95-109.
32. De Clercq E, Luczak M. Intranasal challenge of mice with herpes simplex virus: an experimental model for evaluation of the efficacy of antiviral drugs. *J Infect Dis* 1976; **133 Suppl**:A226-236.

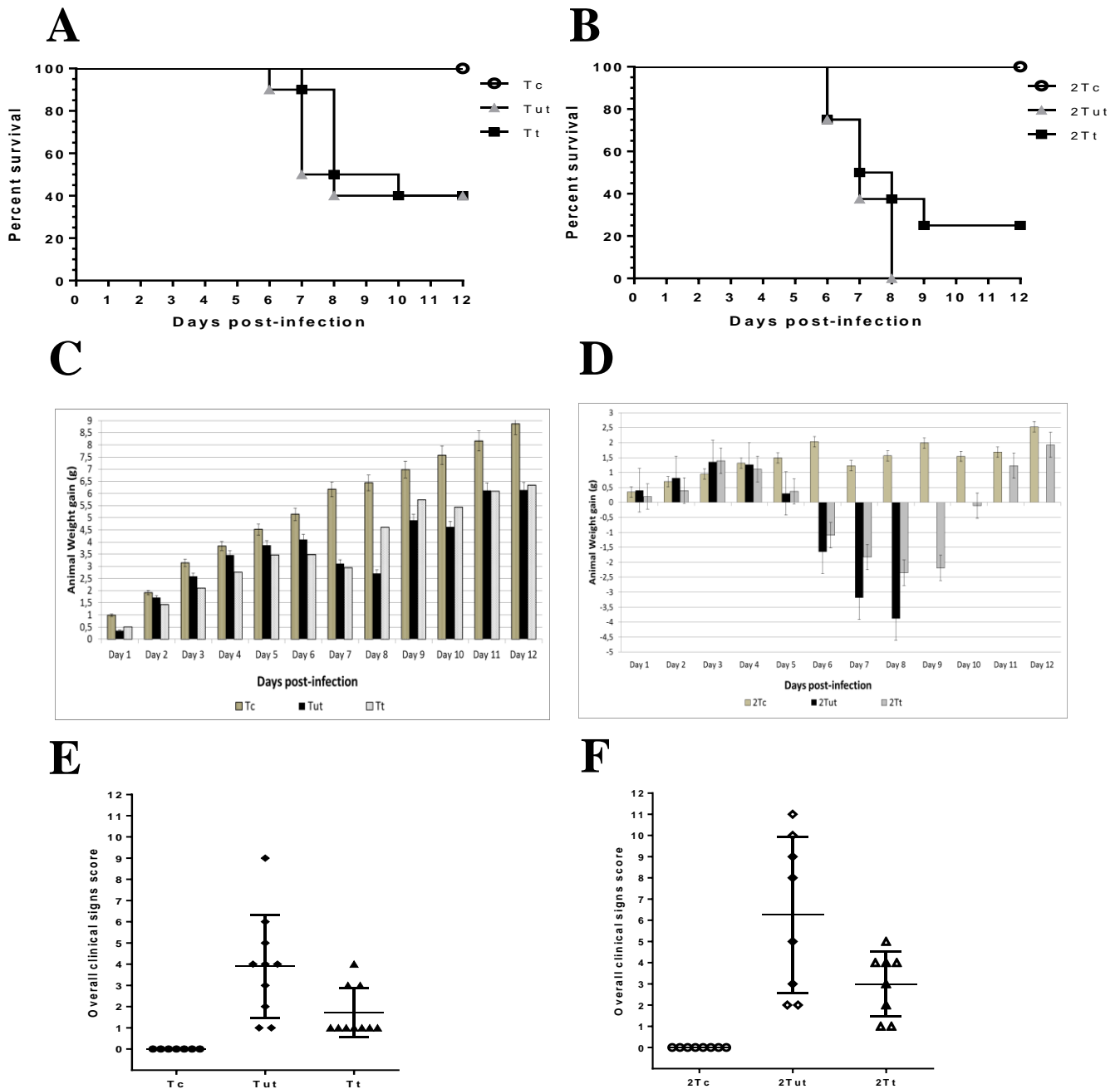
33. Kumar P, Wu H, McBride JL, *et al.* Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* 2007; **448**:39-43.
34. DeLano RM, Mallery SR. Stress-related modulation of central nervous system immunity in a murine model of herpes simplex encephalitis. *J Neuroimmunol* 1998; **89**:51-58.
35. Shimeld C, Efstathiou S, Hill T. Tracking the spread of a lacZ-tagged herpes simplex virus type 1 between the eye and the nervous system of the mouse: comparison of primary and recurrent infection. *J Virol* 2001; **75**:5252-5262.
36. Mossman KL, Sherburne R, Lavery C, Duncan J, Smiley JR. Evidence that herpes simplex virus VP16 is required for viral egress downstream of the initial envelopment event. *J Virol* 2000; **74**:6287-6299.
37. Lima GK, Zolini GP, Mansur DS, *et al.* Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR9 expressed in trigeminal ganglia are critical to viral control during herpes simplex virus 1 infection. *Am J Pathol* 2010; **177**:2433-2445.
38. Sellner J, Dvorak F, Zhou Y, *et al.* Acute and long-term alteration of chemokine mRNA expression after anti-viral and anti-inflammatory treatment in herpes simplex virus encephalitis. *Neurosci Lett* 2005; **374**:197-202.
39. Davidson BL, McCray PB, Jr. Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nat Rev Genet* 2011; **12**:329-340.
40. Dykxhoorn DM, Lieberman J. Knocking down disease with siRNAs. *Cell* 2006; **126**:231-235.
41. Esiri MM. Herpes simplex encephalitis. An immunohistological study of the distribution of viral antigen within the brain. *J Neurol Sci* 1982; **54**:209-226.
42. Kramer AH. Viral encephalitis in the ICU. *Crit Care Clin* 2013; **29**:621-649.
43. Kennedy PG, Steiner I. Recent issues in herpes simplex encephalitis. *J Neurovirol* 2013; **19**:346-350.
44. Nicoll JA, Love S, Kinrade E. Distribution of herpes simplex virus DNA in the brains of human long-term survivors of encephalitis. *Neurosci Lett* 1993; **157**:215-218.

Figure 2. Effects of siRNA:RVG-9R administration daily.



Effects of siRNA:RVG-9R administration until day 7p.i. (A) Average weight gain of kinetics control group (Kc), untreated group (Kut) and treated group (Kt). Data are expressed as mean±s.d; (B) Overall clinical signs score of Kc (●), Kut (◆) and Kt (▲) groups. Each clinical sign was scored from 1 to 3 according to severity and the sum of clinical signs is represented on the graph. Lines represent median value; (C) Percentage of HSV-1 replication inhibition in brain (●) and trigeminal ganglia (□) of BALB/c mice infected with HSV-1 via intranasal and treated with siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 via intracaudal.

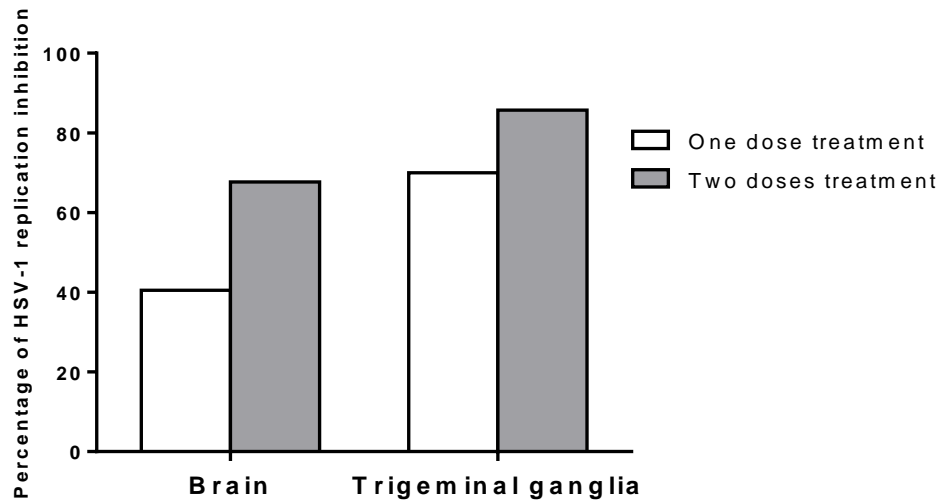
Figure 3. Effects of siRNA administration on BALB/c mice infected with HSV-1 EK via intranasal and treated with one or two doses of siRNA:RVG-9R anti-HSV-1.



Effects of siRNA administration on BALB/c mice infected with HSV-1 EK via intranasal and treated with one dose (a,c and e) or two doses (b,d and f) of siRNA:RVG-9R anti-HSV-1. (A) Median survival of BALB/c mice treated with one dose of siRNA:RVG-9R anti-HSV-1; control group (Tc;○) were inoculated with PBS, untreated group (Tut;▲) were challenged with HSV-1 EK and treated group (Tt;■) were

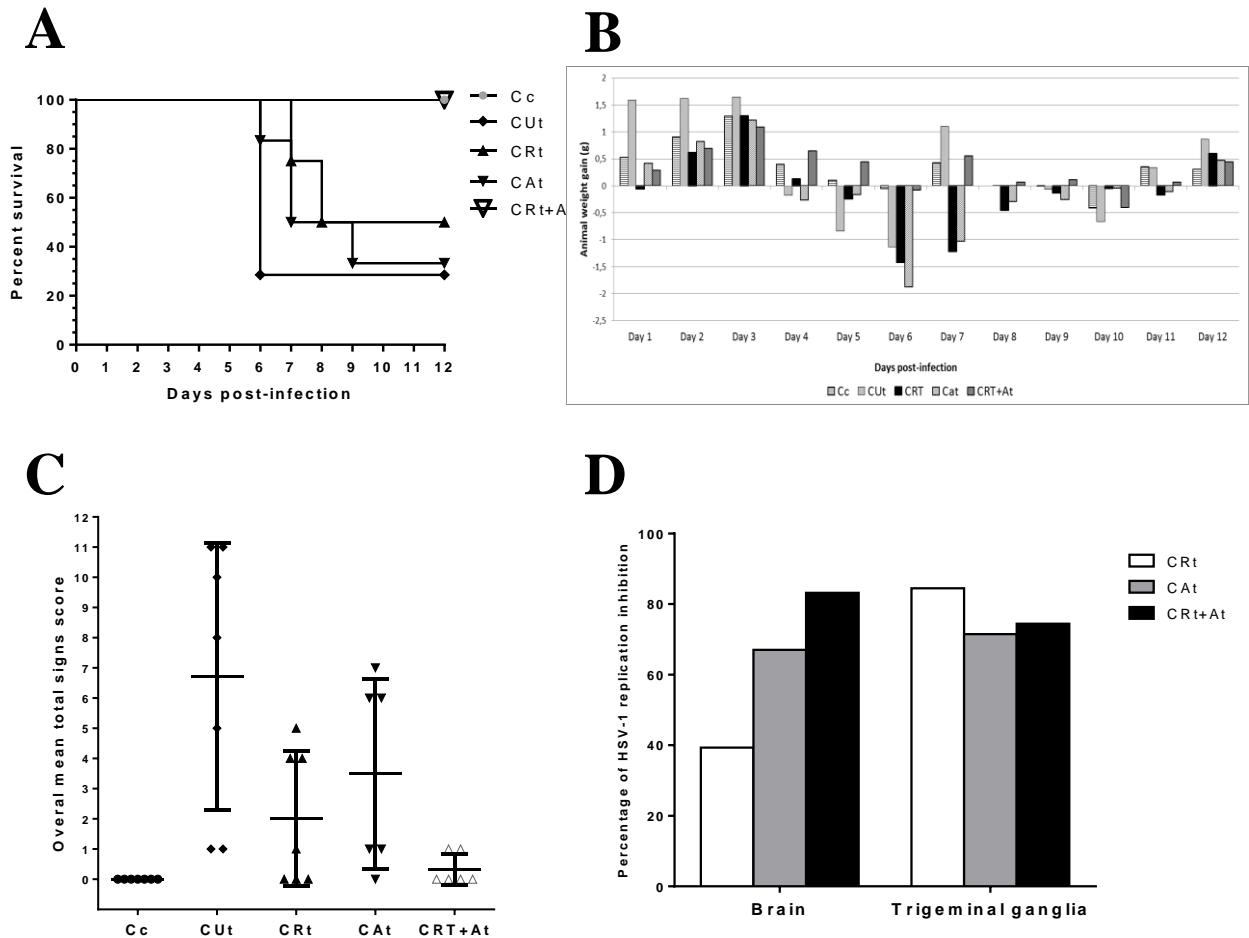
challenged with HSV-1 EK and treated one time with siRNA:RVG-9R anti-HSV-1. (B) Median survival of BALB/c mice treated with 2 doses of siRNA:RVG-9R anti-HSV-1; control group (2Tc;○) were inoculated with PBS, untreated group (2Tut;▲) were challenged with HSV-1 EK and treated group (2Tt;■) were challenged with HSV-1 EK and treated two times with siRNA:RVG-9R anti-HSV-1; (C) Average weight gain of Tc, Tut and Tt. Data are expressed as mean±s.d; (D) Average weight gain of 2Tc, 2Tut and 2Tt. Data are expressed as mean±s.d; (E) Overall mean total clinical signs score of Tc (●), Tut (◆) and Tt (▲) groups. Each clinical sign was scored from 1 to 3 according to severity and the sum of clinical signs is represented on the graph. Lines represent median value; (F) Overall mean total clinical signs score of 2Tc (○), 2Tut (◇) and 2Tt (Δ) groups. Each clinical sign was scored from 1 to 3 according to severity and the sum of clinical signs is represented on the graph. Lines represent median value.

Figure 4. Percentage of HSV-1 replication inhibition of BALB/c mice treated with siRNA:RVG-9R anti-HSV-1



Percentage of HSV-1 replication inhibition of BALB/c mice treated with siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 in brain and trigeminal ganglia on the day of death or on day 12p.i. when survival animals were euthanized. The graphs represent the approximate percentage of virus replication inhibition of animals treated with one dose (Tt; n=10) or two doses (2Tt; n=8) of siRNA:RVG-9R when compared with untreated animals with one dose (Tut; n=10) or two doses (2Tut; n=8). Lower values of viral DNA load in the brain were 8.84×10^4 copies/ml (Tt), 3.72×10^5 (Tut), 6.39×10^4 copies/ml (2Tt), 5.98×10^6 copies/ml (2Tut) and the higher values were 1.13×10^{11} copies/ml (Tt), 7.74×10^{10} (Tut), 9.26×10^8 copies/ml (2Tt), 7.62×10^8 copies/ml (2Tut). Lower values of viral DNA load in TG were 1.05×10^5 copies/ml (Tt), 3.72×10^5 (Tut), 2.92×10^4 copies/ml (2Tt), 3.11×10^4 copies/ml (2Tut) and the higher values were 1.65×10^9 copies/ml (Tt), 2.83×10^8 (Tut), 6.22×10^8 copies/ml (2Tt), 5.05×10^8 copies/ml (2Tut).

Figure 5. Effects of different HSE treatments on BALB/c mice.



Effects of different antiviral treatments of Herpetic encephalitis. (A) Median survival of group inoculated with PBS via intranasal (●;Cc), group infected with 10^9 PFU of HSV-1 EK via intranasal (◆; CUt), group infected with 10^9 PFU of HSV-1 EK and treated with siRNA:RVG-9R (▲;CRt), group infected with 10^9 PFU of HSV-1 EK and treated with acyclovir (▼;CAAt), group infected with 10^9 PFU of HSV-1 EK and treated with siRNA:RVG-9R + acyclovir (▽;CRt+At); (B) Average weight gain of Cc, CUt, CRt, CAAt and CRt+At groups. Data are expressed as mean±s.d.; (C) Overall mean total clinical signs score of Cc (●), CUt (◆), CRt (▲), CAAt (▼) and CRt+At (▽) groups. Lines represent median values. Each clinical sign was scored from 1 to 3 according to severity and the sum of clinical signs is represented on the graph. Lines represent median value; (D) Percentage of HSV-1 replication inhibition of BALB/c mice brain

and trigeminal ganglia on the day of death or on day 12p.i. when survival animals were euthanized. All groups were composed of 7 mice. The graphs represent the approximate percentage of virus replication inhibition of treated animals (groups CRt, CAAt, CRt+At) when compared with untreated animals (group CUt). Lower values of viral DNA load in brain were 1.33×10^5 copies/ml (CRt), 3.08×10^3 (CAAt), 5.90×10^3 copies/ml (CRt+At), 3.46×10^6 copies/ml (CUt) and the higher values were 4.23×10^7 copies/ml (CRt), 6.00×10^6 (CAAt), 3.11×10^4 copies/ml (CRt+At), 2.41×10^7 copies/ml (CUt). Lower values of viral DNA load in TG were 2.00×10^3 copies/ml (CRt), 4.45×10^3 (CAAt), 1.92×10^4 copies/ml (CRt+At), 3.19×10^3 copies/ml (CUt) and the higher values were 6.67×10^3 copies/ml (CRt), 2.23×10^4 (CAAt), 2.00×10^4 copies/ml (CRt+At), 6.20×10^4 copies/ml (CUt).

5. DISCUSSÃO

5.1. Perfil epidemiológico do grupo de comportamento de risco de Homens que fazem sexo com Homens

Um grande problema nas infecções por HSV é a sua prevalência em grupos de comportamento de risco. O estudo do perfil epidemiológico Da infecção por HSV encontrado nas populações de HSH foi maior do que o encontrado em outros trabalhos. A população do grupo HSH de Campo Grande, Mato Grosso do Sul apresentou soroprevalência (presença de anti-HSV-1/2 IgG) de 85,2%. Soroprevalência maior do que a encontrada em grupos HSH no Rio de Janeiro (45,7%) (Rodrigues et al. 2009) e em outros países (16% a 25,8%) (Bohl et al. 2011; Xu et al. 2010; Yin et al. 2012). A coinfeção entre HSV-1/HSV-2 também é bastante importante, principalmente ao se avaliar a mudança de perfil epidemiológico entre HSV-1 e HSV-2. Sauerbrei e colaboradores demonstraram uma taxa de coinfeção entre HSV-1/HSV-2 de 77% (Sauerbrei et al. 2011).

A presença de anticorpos anti-HSV1/2 IgM pode indicar infecção aguda (recente) pelo vírus ou reativação sintomática ou assintomática da infecção (Sauerbrei et al. 2000). No entanto, no estudo com o grupo de HSH de Campo Grande não foi detectada a presença de anti-HSV-1/2 IgM na população HSH. Essa ausência era esperada, pois a infecção em grupos de comportamento sexual de risco, em geral, é adquirida na infância, se estendendo até o começo da vida adulta (Jin et al. 2006; Looker & Garnett 2005; Looker et al. 2008; Lupi 2011). Como tal, indivíduos avaliados no grupo HSH tendem a apresentar soropositividade para IgG e não para IgM, demonstrando que eles não entraram em contato com a doença recentemente e não apresentam infecção recorrente.

A avaliação dos fatores de risco do grupo HSH demonstrou associação entre a presença de anti-HSV-1/2 IgG com indivíduos que possuem 20 anos de idade ou mais, renda familiar de até cinco salários mínimos e nível educacional até o ensino médio. Essa associação se encontra de acordo com muitos trabalhos que demonstraram a associação de infecção por HSV-1 com o aumento da idade, baixa renda familiar e baixo nível educacional (Jin et al. 2006; Lupi 2011). O aumento da soroprevalência em associação com a idade

acima de 20 anos ocorre pelo longo tempo em que um indivíduo não infectado fica exposto à transmissão do vírus por indivíduos infectados com HSV. A associação com a baixa renda está relacionada diretamente com o nível educacional. Baixo nível educacional leva à falta de conhecimentos sobre as infecções causadas pelo HSV-1 e prevenção de infecções sexualmente transmissíveis.

Foi encontrada associação entre a infecção causada pelo HSV e uso de drogas, além do uso de cannabis como tipo de droga mais utilizada pelos participantes. Até o momento, não houve estudos demonstrando a associação entre cannabis e a infecção causada pelo HSV, sendo este o primeiro relato dessa associação. Mas essa associação já foi encontrada em outras infecções virais, como por HIV (Ghosn et al. 2014), HPV (Phelan et al. 2009) e HCV (Martinez-Raga et al. 2001). A associação com a cannabis pode estar relacionada com o comportamento de compartilhar o cigarro, podendo ocorrer transmissão através de saliva ou secreções de vesículas contendo o vírus. A transmissão pelo compartilhamento de cigarros de cannabis foi demonstrada por Zwenger em 2009, como possível método de transmissão do HPV oral (Zwenger 2009).

Em relação ao comportamento sexual de risco, ocorreu associação entre a infecção pelo HSV e indivíduos do grupo HSH que declararam serem profissionais do sexo, o que é corroborado por outros estudos (Yin et al. 2012). Esse resultado já era esperado, pois os trabalhadores do sexo têm maiores chances de entrar em contato com um indivíduo com recorrência da doença que apresenta vesículas, saliva ou secreções contendo o vírus. A presença de parceiros sexuais e múltiplos parceiros sexuais na última semana antes da entrevista demonstrou ser um forte fator de risco para a infecção por HSV. O número de parceiros sexuais também influencia na exposição ao vírus, levando ao aumento de sua transmissão. Também foi encontrada associação entre sexo anal e a infecção por HSV, o que está de acordo com outros trabalhos que relataram forte associação entre o aumento das práticas sexuais oro-anais e oro-genitais e infecções causadas pelo HSV (Jin et al. 2006; Prestage et al. 2005).

Foi encontrado um alto nível de associação entre HIV e HSV no grupo HSH. Entre os participantes do grupo HSH, 33 tiveram resultado positivo para

HIV e, dentro desse grupo, 32 (97%) indivíduos também apresentaram resultado positivo para HSV, o que está de acordo com outros trabalhos que relataram prevalência acima de 70% entre indivíduos co-infectados com HIV e HSV (Moss et al. 2007; Whitley et al. 1998). No Brasil, um estudo demonstrou prevalência de 83,5% de HSV-1 em pacientes portadores de HIV (Lupi 2011).

A imunossupressão pelo HIV é importante quando associada à infecção pelo HSV, pois leva à depressão da resposta imune específica para o HSV, o que é chamado de imunossinergia negativa (Hoots et al. 2011; Rubbo et al. 2011). Essa depressão da resposta imune específica para o HSV facilita sua replicação e transmissão (Rubbo et al. 2011), além de afetar a evolução da infecção causada pelo HSV, resultando em reativações mais frequentes e mais graves da infecção herpética (Freeman et al. 2006; Sancho-Shimizu et al. 2007), como ceratoconjuntivite ou encefalite herpética. A reativação também possibilita o aumento da concentração do HIV-1 em vesículas orais, ulceração genital e anorretal ou ruptura da mucosa genital ou oral em infecções causadas pelo HSV, facilitando a entrada do HIV (Schacker et al. 1998; Schacker et al. 2002). Além disso, a coinfeção HIV/HSV ainda facilita em 2 a 3 vezes a taxa de aquisição e transmissão do HIV (Douglas & Berman 2009; Freeman et al. 2006; Hill et al. 2009; Orroth et al. 2006; Wald & Link 2002). Esses fatores demonstram que a associação entre o HIV e HSV é um fator de risco relevante para o aumento da gravidade da infecção por HSV e aquisição de HIV, tanto em mulheres quanto em homens heterossexuais ou homossexuais.

A alta prevalência de anticorpos anti-HSV-1/HSV-2 reforça a necessidade da educação de grupos que apresentam comportamento sexual de risco sobre práticas sexuais mais seguras e sobre as infecções por HSV-1 e coinfeção entre HIV/HSV-1. Esses resultados demonstram a importância de serem implementados programas integrados para a prevenção de infecções por HSV, em particular, tendo como alvo grupos de comportamento sexual de risco como HSH, que estão frequentemente em risco de serem infectados com o HSV. Além disso, há a necessidade de se conduzir exames periódicos e sorológicos dos grupos de comportamento sexual de risco, além da necessidade de futuras vacinas e terapias para a diminuição dessas infecções. Por fim, a alta taxa de infecção do HSV encontrada no grupo HSH pode facilitar a infecção por HIV, tornando essa coinfeção um fator de risco para a

aquisição, transmissão do HIV ou a ocorrência de manifestações clínicas mais graves pela infecção por HSV-1, como a HSE. O que torna cada vez mais necessária a procura de terapias antivirais eficientes para o tratamento da infecção por HSV-1 e, principalmente, para evitar as formas mais graves da doença como a ceratoconjuntivite e a encefalite herpética.

5.2. Avaliação do modelo experimental de infecção pela via intranasal de camundongos BALB/c com HSV-1 EK

O desenvolvimento de novos modelos experimentais de HSE é necessário para avaliar a infecção pelo HSV-1 e para o desenvolvimento de novos antivirais anti-HSV-1. Um modelo interessante para a avaliação da HSE é o modelo experimental de inoculação do HSV-1 cepa EK pela via intranasal em camundongos BALB/c, pois mimetiza sinais clínicos da HSE parecidos com os sinais encontrados em infecções herpéticas em humanos.

Inicialmente, em modelo de HSE em camundongos BALB/c, foram avaliadas a diminuição do peso corporal dos animais e aumento dos sinais clínicos da HSE. Como todo modelo experimental, os sinais clínicos são importantes para a avaliação da doença, além da mortalidade ou distribuição e concentração do patógeno no hospedeiro. A ocorrência de diminuição do peso corporal e aparecimento de sinais clínicos (como pelo eriçado, ataxia, andar em círculos, ceratoconjuntivite, além de outros sinais clínicos) estão associados à degeneração cerebral e perda da função cognitiva que levam à HSE em camundongos infectados com HSV-1 (Gallagher & Rapp 1997).

Nesse estudo foi demonstrado que a inoculação pela via intranasal do HSV-1 EK causa sinais clínicos de HSE em camundongos BALB/c inoculados com concentrações variando de 10^1 a 10^9 UFP/ml do HSV-1 EK, diminuição do peso corporal em animais inoculados com o título viral acima de 10^5 UFP/ml do vírus HSV-1 EK e significativa mortalidade, especialmente em animais inoculados com 10^9 UFP/ml do vírus HSV-1 EK, que apresentaram 100% de mortalidade após a infecção.

Na avaliação desse modelo experimental, foi observado um aumento de 4,93 vezes da concentração de IFN- γ em camundongos que apresentaram sinais de HSE quando comparados com animais infectados com o vírus sem sinais de HSE e animais não infectados, o que demonstra a ocorrência de

infecção viral e está de acordo com outros trabalhos que demonstraram aumento de IFN- γ em animais e humanos com HSE (Sancho-Shimizu et al. 2007; Sheridan & Beck 2008).

Além disso, a quantificação do HSV-1 cepa KOS (grupo Kos) e HSV-1 cepa EK (grupos 10^1 - 10^9) foi realizada por cultura de células Vero e RT-PCR no gânglio trigeminal e cérebro. Foi encontrado um aumento do título viral no cérebro e no gânglio trigeminal de 1 a 8 logs acima da dose inoculada em todos os animais com sinais clínicos de HSE. Esse aumento no título viral acima da dose inoculada demonstra que ocorreu replicação viral nos dois órgãos. Em geral, a replicação viral no cérebro (como ocorreu em animais infectados com HSV-1 EK) está associada à HSE (Kastrukoff et al. 2012; Vilela et al. 2008).

A infecção com HSV-1 EK demonstrou diferença significativa no aumento da concentração viral pela análise da cultura de células Vero (células de rim do macaco verde Africano *Cercopithecus aethiops*), quando comparados os cérebros do grupo Kos e os cérebros dos camundongos dos grupos 10^1 , 10^3 , 10^7 e 10^9 , além de aumento da concentração viral entre os cérebros do grupo Kos e de todos os grupos infectados com HSV-1 EK (10^1 - 10^9) quando avaliados por RT-PCR. Já o gânglio trigeminal, apresentou resultados diferentes do que os resultados encontrados no cérebro. A avaliação dos gânglios trigeminais do grupo Kos demonstrou, em cultura de células Vero, maior concentração de partículas infecciosas de HSV-1 KOS quando comparado com os gânglios trigeminais de todos os grupos infectados com HSV-1 EK (10^1 - 10^9), além de apresentar maior título viral do que o encontrado nos gânglios trigeminais dos grupos 10^1 - 10^5 pela análise a partir da técnica de RT-PCR. Esses resultados demonstraram que ocorreu aumento significativo da concentração viral de HSV-1 EK no cérebro de animais infectados com essa cepa viral quando comparados com o cérebro de animais infectados com HSV-1 KOS, mas esse aumento significativo não foi encontrado no gânglio trigeminal de animais infectados com HSV-1 EK. Essa diferença entre a concentração de HSV-1 EK no cérebro e no gânglio trigeminal quando comparados com a infecção por HSV-1 KOS pode ter ocorrido, pois o HSV-1 EK, possivelmente, teve maior taxa de replicação no cérebro (o que leva à maior destruição tecidual e, conseqüentemente, causa a HSE) e o HSV-1 KOS

teve maior taxa de replicação no gânglio trigeminal, o que leva a crer que a infecção está começando a entrar na fase latente. Esses resultados demonstram que, possivelmente, a HSE produzida pelo HSV-1 EK tem relação com a alta concentração da cepa viral HSV-1 EK no cérebro de camundongos BALB/c.

Em conjunto, os resultados encontrados demonstram que a via intranasal de inoculação da cepa viral HSV-1 EK foi capaz de produzir infecção pelo vírus e de causar HSE em camundongos BALB/c. Esse modelo experimental mostrou ser útil para a indução de HSE, uma vez que esse método de inoculação do HSV-1 é menos estressante e doloroso aos animais do que outros métodos, como inoculação intracerebral ou intracranial utilizados na literatura (Turner et al. 2011). A produção de HSE pela via de inoculação intranasal do HSV-1 foi demonstrado em poucas cepas virais e ainda não foi esclarecido o mecanismo que possibilita a HSE em cepas inoculadas pela via intranasal. Ainda existem muitas lacunas no estudo da HSE, o que torna esse modelo experimental uma ferramenta eficaz para a avaliação da resposta imunológica, neuropatogênese e cinética da HSE. Uma vez estabelecido o modelo de infecção experimental para a produção da HSE, os camundongos BALB/c foram utilizados para avaliar o tratamento com antivirais no controle da HSE *in vivo*.

5.3. Avaliação do RNA de interferência como agente antiviral na HSE

O HSV-1 é um importante causador de infecções virais neurotrópicas, causando infecções que podem persistir por toda a vida no estado de latência (Miller et al. 1998). A infecção pelo HSV-1 pode ser assintomática ou causar variadas manifestações clínicas, podendo ocorrer lesões vesiculares, herpes labial, gengivoestomatite, ceratoconjuntivite, herpes neonatal, herpes genital e HSE

Parte dos estudos para avaliar novas terapias para o tratamento da HSE se baseiam na resposta imune à infecção pelo HSV-1, pois os fatores virais e do hospedeiro que determinam a infecção viral são complexos e a resposta imune parece ter um papel importante nos fatores do hospedeiro e infecção viral (Kennedy 2005). A imunoterapia da HSE foi estudada com a utilização de glicocorticoides (Sergerie et al. 2007), receptores Toll-like (Boivin et al. 2008)

e interleucina-6 (Dvorak et al. 2004). A utilização de imunoterapias para o tratamento de outras manifestações clínicas da infecção pelo HSV-1 já foram avaliadas, como a imunoterapia da ceratite herpética pelo uso do fator de crescimento neuronal (Lambiase et al. 2008). Além disso, terapias alternativas, como o uso de extratos da planta *Gallesia gorazema* (Silva Junior Ade et al. 2013) ou polissacarídeos derivados de fungo (Cardozo et al. 2013) estão sendo estudados como terapia antiviral para o controle da infecção por HSV-1 (incluindo a HSE). Levando esses fatores em conta, torna-se necessário o desenvolvimento de novas terapias antivirais para o tratamento da HSE. A utilização de moléculas de siRNA, por exemplo, vem sendo estudada como terapia alternativa para prevenir e controlar infecções virais, como a infecção causada pelo HSV-1 (Perse et al. 2014; Wheeler 2014; Yang et al. 2013; Zhang et al. 2008; Zhe et al. 2008).

A utilização do siRNA em camundongos não provoca efeito colateral nesses animais (Singh et al. 2014), não sendo demonstrado, até o momento, nenhuma toxicidade ou resistência à esse tipo de tratamento. Isso ocorre pois o siRNA é uma sequência nucleotídica que atua diretamente no RNAm viral evitando a ocorrência da resistência encontrada em outros antivirais. Nesse estudo, foi utilizada a molécula de siRNA anti-HSV-1 específica ao gene UL-39 do HSV-1. Esse gene é responsável pela codificação da ribonucleotídeo redutase, enzima importante para a replicação viral. O siRNA foi inoculado via intracaudal em camundongos BALB/c infectados com HSV-1 pela via intranasal. Após a inoculação do siRNA, foram avaliados os efeitos da terapia com siRNA anti-HSV-1 na HSE. Esse estudo mostra evidências importantes de que a utilização do siRNA no tratamento da HSE possui efeitos benéficos, como diminuição dos sinais clínicos da HSE, aumento da sobrevivência e inibição da replicação viral.

Inicialmente, foi avaliado se a molécula RVG-9R (molécula derivada da glicoproteína do *Rhabdovirus*, utilizada para aumentar a eficácia da inibição da replicação viral no SNC pelo siRNA) poderia inibir a replicação do HSV-1 sem sua conjugação com a molécula siRNA anti-HSV-1. A molécula RVG-9R conjugada com siRNA já foi utilizada por outros autores para suprimir a expressão de encefalopatias espongiiformes causadas por Príons (Pulford et al. 2010) e inibir a replicação do *Vírus da Encefalite Japonesa* (Kumar et al. 2007).

No presente estudo, foi demonstrado que o RVG-9R isolado não consegue inibir a replicação do HSV-1, o que leva a crer que a inibição da replicação viral causada pelo siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 ocorre apenas pelo mecanismo de silenciamento do siRNA anti-HSV-1.

Após a avaliação do RVG-9R, foi avaliada a cinética da inibição da replicação viral diariamente até o 7^o dia após a infecção. O tratamento com siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 levou à diminuição da perda de peso dos animais tratados quando comparados com os animais não tratados. Em animais não tratados, mas que manifestaram HSE, ocorreu uma expressiva perda de peso causada pela diminuição de mobilidade e consequente diminuição da alimentação (DeLano & Mallery 1998). Esse fato não ocorreu nos animais tratados, o que evidencia que o tratamento com siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 foi importante para a recuperação da HSE. Outro fator que corrobora com a atuação eficaz do tratamento é a diminuição dos sinais clínicos da HSE nos grupos tratados. De fato, somente 3 entre 14 animais do grupo tratado apresentaram sinais clínicos da doença e, dentre os sinais clínicos demonstrados, foram encontrados apenas pelo ericado e perda de peso, os primeiros sinais encontrados no modelo experimental de HSE, ou seja, provavelmente o siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 foi capaz de controlar a HSE logo no início da replicação ativa do vírus, levando ao bloqueio da evolução da HSE. Esses resultados iniciais demonstraram que o tratamento com siRNA diminuiu os sinais clínicos da doença até o 7^o dia após a infecção.

Ainda no experimento da cinética da infecção, foi avaliada a inibição da replicação viral no cérebro e no gânglio trigeminal, onde geralmente, ocorre a latência e replicação inicial no SNC dos camundongos BALB/c. A inibição da replicação viral ocorreu no cérebro somente a partir do 2^o dia após a infecção, onde ocorreu inibição da replicação do HSV-1 de 66%, diferente da inibição da replicação viral encontrada no gânglio trigeminal, que se iniciou no 1^o dia após a infecção e apresentou inibição da replicação viral de 68,9%. Essa diferença encontrada no início da inibição da replicação viral entre o cérebro e o gânglio trigeminal já era esperada, pois o vírus é direcionado até o gânglio trigeminal para depois se direcionar ao cérebro e começar a infectar células da glia e neurônios encontrados nesse órgão. De fato, estudos anteriores demonstraram

que depois que ocorre penetração e replicação do vírus no gânglio trigeminal, ele se direciona e replica em outros locais do SNC (Shimeld et al. 2001).

No gânglio trigeminal, no 2º dia após a infecção, ocorreu aumento na inibição da replicação viral, chegando a 92,39%. Mas no 3º dia após a infecção, ocorreu diminuição da inibição da replicação viral, com a inibição de 43,62% no cérebro e de 53,02% no gânglio trigeminal. Esses dados de inibição da replicação viral estão de acordo com o trabalho de *Kumar* e colaboradores (Kumar et al. 2007) que demonstrou que o siRNA combinado com RVG-9R tem boa eficácia entre o 1º e o 3º dia após a infecção, ocorrendo um pico na inibição da replicação viral no 2º dia após a infecção. No 4º dia após a infecção, os órgãos não apresentaram inibição da replicação viral. Essa ausência de inibição pode ser explicada por estudos com um modelo experimental de HSE que utilizou camundongos C57BL/6. Quando infectados pelo vírus HSV-1, esses camundongos apresentaram níveis elevados da proteína VP16 (proteína envolvida na replicação viral e regulação dos genes α) (Mossman et al. 2000), diminuindo sua expressão no 4º dia após a infecção, ocorrendo pico da expressão no 5º dia após a infecção e posterior diminuição até o 8º dia após a infecção (Lima et al. 2010). A diminuição da expressão no 4º dia após a infecção leva à diminuição da replicação viral e diminuição das moléculas de RNAm do vírus, o que diminui também a quantidade de alvos para o silenciamento causado pelo siRNA.

A inibição da replicação viral foi mais eficiente entre os dias 5-7 após a infecção, tanto no cérebro quanto no gânglio trigeminal. Entre os dias 5-7 após a infecção houve inibição acima de 99,5% no cérebro e, no gânglio trigeminal, houve inibição da replicação viral variando entre 79,94% (5º dia após a infecção) a 98,03% (7º dia após a infecção). A alta inibição encontrada entre os dias 5-7 após a infecção já havia sido relatada anteriormente em um estudo de *Kumar* e colaboradores (Kumar et al. 2007), que encontrou inibição da replicação viral pela inoculação do siRNA:RVG-9R ocorrendo até o 9º dia após a infecção com o *Vírus da encefalite japonesa*. A inibição da replicação viral no experimento da cinética do HSV-1 varia diariamente, ocorrendo maior eficiência no cérebro, especialmente no 7º dia após a infecção (inibição da replicação viral de 99,91%). A menor eficácia encontrada no gânglio trigeminal pode ter relação com a latência do HSV-1, pois o vírus em latência não se replica ou se

replica muito pouco, formando poucas moléculas de RNAm viral que poderiam ser utilizadas no silenciamento. A inibição da replicação do vírus HSV-1 encontrada no experimento da cinética demonstrou que o siRNA:RVG-9R pode ser utilizado para inibir a replicação do HSV-1 no cérebro e gânglio trigeminal quando inoculado no início da HSE.

Após o experimento da cinética da inibição da replicação, foi avaliada a sobrevivência, sinais clínicos e inibição da replicação viral de animais tratados com uma dose de siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 no dia da infecção e animais tratados com uma dose de siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 no dia da infecção e uma segunda dose no 3º dia após a infecção. Baseado no dia em que não foi encontrada inibição da replicação viral (4º dia após a infecção) no experimento da cinética, foi realizada a escolha da inoculação da segunda dose de siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 no 3º dia após a infecção, ou seja, um dia antes da ausência de inibição da replicação viral. Essa escolha foi realizada pois torna possível o transporte do siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 via intravascular para o SNC no 4º dia após a infecção, possibilitando o silenciamento do RNAm viral pela 2ª dose do tratamento pelo siRNA nesse dia.

Camundongos BALB/c tratados com uma dose de siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 sobreviveram por mais tempo do que os animais não tratados. Além disso, animais tratados com apenas uma dose da molécula de siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 apresentaram 1 dia à mais de sobrevivência do que os animais tratados com duas doses. Os animais que foram tratados com duas doses de siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 apresentaram sobrevivência de 25%, mas não apresentaram diferença estatística significativa quando comparados com o grupo não tratado. A taxa de sobrevivência encontrada em animais tratados com uma ou duas doses de siRNA:RVG-9R anti-HSV-1, demonstra que mesmo com uma segunda dose de tratamento não é possível prolongar a sobrevivência média dos animais BALB/c. Um fator que pode ter contribuído para não ocorrer aumento na sobrevivência dos animais inoculados com duas doses de siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 é o aumento do estresse nos camundongos quando inoculados pela via intracaudal. A via intracaudal de inoculação é desconfortável, pode causar ferimentos e ser dolorosa para os animais (Anglen et al. 2003; Huang et al. 2011), causando estresse. O aumento de estresse causa a saída da latência e recorrência da infecção, aumentando a

replicação viral. Essas partículas virais, que antes estavam em latência, podem infectar células do cérebro quando reativadas, podendo levar ao aumento da patogênese e morte celular no cérebro, o que aumenta a gravidade da HSE.

Foi encontrado ganho de peso em animais tratados com duas doses de siRNA:RVG-9R anti-HSV-1, bem como diminuição dos sinais clínicos da doença em animais tratados com uma ou duas doses dessa molécula. Essa diminuição dos sinais clínicos da HSE em conjunto com a diminuição dos sinais clínicos da HSE no experimento da cinética da inibição da replicação viral, mostraram a vantagem da utilização do siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 para diminuir os sinais clínicos da HSE. Camundongos BALB/c tratados com uma ou duas doses de siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 demonstraram poucos sinais de HSE e, dentre os sinais apresentados, os principais foram pelo eriçado e perda de peso. Em dois casos que ocorreu perda de peso os animais voltaram a apresentar, após alguns dias, ganho de peso considerado normal para animais não infectados, o que demonstra sua recuperação da doença.

A alta inibição da replicação viral apresentada no cérebro (67,7%) e no gânglio trigeminal (85,7%) de animais tratados com 2 doses de siRNA:RVG-9R anti-HSV-1, comparada com a inibição da replicação viral no cérebro (40,5%) e gânglio trigeminal (70%) de animais tratados com 1 dose da molécula, demonstrou que uma segunda inoculação do siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 é mais eficaz na inibição da replicação viral. Vários estudos já mostraram que o siRNA pode ser facilmente degradado no soro e, conseqüentemente, pode perder sua eficácia (Davidson & McCray 2011; Dykxhoorn & Lieberman 2006; Kumar et al. 2007), o que leva à necessidade de múltiplas doses de siRNA na terapia antiviral. Além disso, para diminuir a porcentagem de moléculas de siRNA degradadas, são utilizadas moléculas que ajudam à entrega dessas moléculas no órgão alvo e as protegem de serem degradadas, como a molécula de RVG-9R. A molécula RVG-9R protege o siRNA de ser degradado, possibilita a passagem pela barreira hematoencefálica e sua entrega no cérebro. Mesmo com todas essas vantagens, a molécula RVG-9R não consegue aumentar a vida média do siRNA por longos dias, sendo necessárias múltiplas doses de siRNA para aumentar a eficiência da inibição da replicação viral pelo siRNA. No caso da inibição da replicação do HSV-1, a utilização de duas doses foi bastante eficaz para aumentar a inibição da replicação viral e

diminuir os sinais clínicos da HSE, mas não foi capaz de diminuir a mortalidade dos animais.

Outro fator que foi estudado para aumentar a eficácia do tratamento com siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 foi a sua inoculação pela via intracaudal com a adição do tratamento pela via intraperitoneal com o aciclovir. A combinação do tratamento utilizando o siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 com aciclovir foi utilizado pois o siRNA e o aciclovir possuem mecanismos de ação diferentes. Enquanto o siRNA inibe a replicação viral ao se ligar à molécula de RNAm e posterior clivagem do RNAm, o aciclovir é um análogo de nucleotídeo que se liga à fita nascente de DNA do vírus, impedindo a DNA polimerase de formar uma nova fita de DNA, bloqueando a polimerização da fita de DNA e, conseqüentemente, a replicação viral (Coen 1996; De Clercq 2004).

Ao avaliar o tratamento do siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 combinado com o aciclovir, também foi realizada a sua comparação com aciclovir inoculado isoladamente e com o siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 inoculado isoladamente. O tratamento com aciclovir inoculado isoladamente não aumentou o tempo de sobrevivência média em relação ao grupo não tratado (6 dias de sobrevivência média), mas o tratamento com siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 inoculado sozinho aumentou a sobrevivência média dos camundongos em 4 dias quando comparados com o grupo não tratado. Além disso, não houve diferença estatística entre a sobrevivência dos animais tratados com siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 ou com aciclovir quando comparados com o grupo não tratado. Mas, em compensação, o tratamento combinado de siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 e aciclovir levou à 100% de sobrevivência dos animais tratados e diferença estatística significativa entre o grupo tratado com siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 combinado com aciclovir e o grupo não tratado. Esses dados demonstram que o tratamento combinado pode ser de grande valia para diminuir a mortalidade dos animais com HSE.

Nenhum dos tratamentos (siRNA:RVG-9R anti-HSV-1, aciclovir ou siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 combinado com aciclovir) resultou na diminuição da perda de peso. O que demonstra que apenas uma dose do tratamento com siRNA:RVG-9R anti-HSV-1, mesmo combinado com aciclovir, não é suficiente para que não ocorra perda de peso dos animais. Além disso, a diminuição dos sinais clínicos da HSE foi encontrada somente nos grupos tratados apenas

com siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 ou tratados com siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 combinado com aciclovir. O que leva a crer que o siRNA é extremamente importante na diminuição dos sinais clínicos da doença e que o aciclovir, nesse estudo, não foi capaz de diminuir os sinais clínicos. Esses resultados aumentam a importância do siRNA no tratamento da HSE, pois a utilização do siRNA no tratamento da HSE pode se tornar bastante útil por ser capaz de diminuir a morbidade causada pela HSE, aspecto bastante procurado em um antiviral. Possivelmente, a utilização dessa molécula como alternativa ao tratamento da HSE poderá também diminuir as sequelas causadas pela doença.

A inibição da replicação do HSV-1 em animais tratados apenas com siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 foi de 40% no cérebro e de 84,8% no gânglio trigeminal. Quando foi realizado o tratamento com aciclovir apenas, a inibição da replicação viral foi de 67% no cérebro e de 71,5% no gânglio trigeminal. Já o tratamento com o siRNA:RVG-9R combinado com o aciclovir apresentou inibição da replicação viral no cérebro de 83,2% e no gânglio trigeminal de 74,5%. Vários estudos mostraram que a redução da replicação do HSV-1 no cérebro está associada com a melhor recuperação da HSE e diminuição da mortalidade (Esiri 1982; Kennedy & Steiner 2013; Kramer 2013; Nicoll et al. 1993). Os resultados encontrados com a alta inibição da replicação do HSV-1 no cérebro corroboram com esses trabalhos, pois foi observado, nos animais tratados, redução dos sinais de HSE e o tratamento foi capaz de prevenir a mortalidade dos camundongos BALB/c infectados com HSV-1, o que demonstra que o uso do siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 combinado com o aciclovir é mais eficiente para inibir a HSE do que pelo tratamento com siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 ou aciclovir inoculados separadamente.

Os fatores imunológicos também podem ter influenciado na eficácia do tratamento da HSE pelo siRNA:RVG-9R anti-HSV-1. Muitos estudos demonstraram que a resposta imune é um fator importante para a encefalite por HSE e que os sinais da encefalite podem ser causados por influência das citocinas e de outros fatores da resposta imune (Ben-David et al. 2007; Dvorak et al. 2004; Herman et al. 2012; Kennedy 2005; Lima et al. 2010; Vilela et al. 2011). Além disso, o estabelecimento da infecção por HSV-1 e a alta taxa de replicação viral encontrada normalmente na HSE pode ser responsável pela

perda de efeito do siRNA. A combinação do tratamento utilizando siRNA, fatores imunorreguladores (Boivin et al. 2008; Dvorak et al. 2004; Sergerie et al. 2007) e o aciclovir pode ser uma ótima estratégia para o tratamento da HSE.

Mesmo com décadas de pesquisas sobre a HSE, ainda não existe um tratamento que seja totalmente efetivo no controle do HSV-1, que previna os sinais clínicos da HSE, que não possua efeitos colaterais e resistência ao vírus. Os resultados apresentados nesse projeto demonstraram a eficácia da utilização do siRNA anti-HSV-1 em modelo experimental de HSE em camundongos BALB/c. O tratamento com a molécula siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 foi bastante eficaz para diminuir os sinais clínicos da HSE, prevenir a mortalidade desses animais e inibir a replicação do vírus HSV-1.

Apesar do siRNA já ter sido descrito anteriormente como uma alternativa ao tratamento de encefalites provocadas pelos *Vírus do Oeste do Nilo* (Bai et al. 2005) e *Vírus da Encefalite Japonesa* (Murakami et al. 2005), a utilização do siRNA como terapia antiviral apresenta algumas limitações como especificidade e estabilidade das sequências, efeito off-target e entrega do siRNA no tecido alvo (Tokatlian & Segura 2010).

Em resumo, este estudo mostrou que a administração de múltiplas doses de siRNA em dias diferentes aliada à combinação da molécula de siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 inoculada com ou sem a combinação do aciclovir consegue inibir a replicação do HSV-1 e possui potencial para se transformar em uma importante terapia alternativa para a HSE, sendo necessário novos estudos clínicos para sua utilização no tratamento em encefalites herpética humanas.

6. CONCLUSÃO

- ✓ Foi encontrada uma alta soroprevalência (85,2%) de anticorpos HSV-1/2 entre homens que fazem sexo com homens da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul com perfil epidemiológico acima de 20 anos, renda familiar de até cinco salários mínimos e nível educacional até o ensino médio.
- ✓ A inoculação pela via intranasal da cepa HSV-1 EK é capaz de causar encefalite herpética em camundongos BALB/c, o que torna esse modelo experimental bastante eficaz para o estudo da encefalite herpética e da utilização de antivirais anti-herpéticos.
- ✓ O siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 foi capaz de inibir a replicação do HSV-1 no cérebro e gânglio trigeminal, mostrando que pode reduzir os sintomas da encefalite herpética logo no começo da infecção.
- ✓ O tratamento com duas doses de siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 é mais eficaz no controle da encefalite herpética do que o tratamento com apenas uma dose de siRNA:RVG-9R anti-HSV-1.
- ✓ A utilização do siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 foi mais eficiente que o aciclovir na diminuição dos sinais clínicos da encefalite herpética.
- ✓ O tratamento combinado do siRNA:RVG-9R anti-HSV-1 com o aciclovir foi capaz de prevenir a mortalidade de camundongos BALB/c, diminuir a perda de peso e os sinais clínicos da encefalite herpética, além de inibir a replicação viral, sendo mais eficaz no tratamento da encefalite herpética do que o tratamento utilizando apenas o siRNA:RVG anti-HSV-1 ou aciclovir.
- ✓ Os resultados sugerem que a molécula de siRNA:RVG anti-HSV-1 pode ser utilizada como uma terapia antiviral alternativa para o tratamento do HSE.

7. PERSPECTIVAS

Como perspectivas, será realizada a avaliação do tratamento da ceratoconjuntivite herpética (manifestação clínica do HSV-1 que pode levar à perda da córnea) com a utilização de adenovírus recombinante expressando siRNA anti-HSV-1. Além de avaliar o tratamento da ceratoconjuntivite herpética com siRNA anti-HSV-1, a utilização do adenovírus recombinante como vetor é importante para aumentar o conhecimento sobre o uso de vetores virais no tratamento de infecções oculares com siRNA e é útil para mostrar a aplicabilidade dos mesmos no tratamento de infecções herpéticas em geral. Caso o tratamento com siRNA funcione no tratamento da ceratoconjuntivite, a atuação do siRNA na inibição da replicação viral poderá levar à diminuição do dano tecidual e reduzir os transplantes de córnea e de sequelas ocasionadas pela ceratoconjuntivite herpética.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK 2003. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67, 657-685.

Aigner A 2006a. Delivery systems for the direct application of siRNAs to induce RNA interference (RNAi) in vivo. *J Biomed Biotechnol*, 2006, 71659.

— 2006b. Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: strategies based on the direct application of siRNAs. *Journal of biotechnology*, 124, 12-25.

Akerstrom S, Mirazimi A, Tan YJ 2007. Inhibition of SARS-CoV replication cycle by small interference RNAs silencing specific SARS proteins, 7a/7b, 3a/3b and S. *Antiviral Res*, 73, 219-227.

Akhtar J, Shukla D 2009. Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *The FEBS journal*, 276, 7228-7236.

Akhtar S, Benter IF 2007. Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. *J Clin Invest*, 117, 3623-3632.

Alvarez R, Elbashir S, Borland T, Toudjarska I, Hadwiger P, John M, Roehl I, Morskaya SS, Martinello R, Kahn J, Van Ranst M, Tripp RA, DeVincenzo JP, Pandey R, Maier M, Nechev L, Manoharan M, Kotelianski V, Meyers R 2009. RNA interference-mediated silencing of the respiratory syncytial virus nucleocapsid defines a potent antiviral strategy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53, 3952-3962.

Anglen CS, Truckenmiller ME, Schell TD, Bonneau RH 2003. The dual role of CD8+ T lymphocytes in the development of stress-induced herpes simplex encephalitis. *Journal of neuroimmunology*, 140, 13-27.

Ank N, Iversen MB, Bartholdy C, Staeheli P, Hartmann R, Jensen UB, Dagnaes-Hansen F, Thomsen AR, Chen Z, Haugen H, Klucher K, Paludan SR 2008. An important role for type III interferon (IFN-lambda/IL-28) in TLR-induced antiviral activity. *Journal of immunology*, 180, 2474-2485.

Aouadi M, Tesz GJ, Nicoloso SM, Wang M, Chouinard M, Soto E, Ostroff GR, Czech MP 2009. Orally delivered siRNA targeting macrophage Map4k4 suppresses systemic inflammation. *Nature*, 458, 1180-1184.

Araújo MEXS, Santos NC, Freitas D 2002. Corneal transplantation for herpes simplex keratitis. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, 65, 515-518.

Aravalli RN, Peterson PK, Lokensgard JR 2007. Toll-like receptors in defense and damage of the central nervous system. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 2, 297-312.

Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Landgraf P, Iovino N, Morris P, Brownstein MJ, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Chien M, Russo JJ, Ju J, Sheridan R, Sander C, Zavolan M, Tuschl T 2006. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature*, 442, 203-207.

Arduino PG, Porter SR 2006. Oral and perioral herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection: review of its management. *Oral diseases*, 12, 254-270.

— 2008. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 37, 107-121.

Armien AG, Hu S, Little MR, Robinson N, Lokensgard JR, Low WC, Cheeran MC 2010. Chronic cortical and subcortical pathology with associated neurological deficits ensuing experimental herpes encephalitis. *Brain pathology*, 20, 738-750.

Aurelian L 2008. Herpes Simplex Viruses: General Features. In BWJ Mahy, MHV VAN REGENMORTEL, *Encyclopedia of Virology*, 3 ed., Elsevier, Oxford, Londres, p. 397-404.

Bacon TH, Levin MJ, Leary JJ, Sarisky RT, Sutton D 2003. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. *Clin Microbiol Rev*, 16, 114-128.

Bai F, Wang T, Pal U, Bao F, Gould LH, Fikrig E 2005. Use of RNA interference to prevent lethal murine west nile virus infection. *J Infect Dis*, 191, 1148-1154.

Baringer JR 2008. Herpes simplex infections of the nervous system. *Neurol Clin*, 26, 657-674, viii.

Barney NP, Foster CS 1994. A prospective randomized trial of oral acyclovir after penetrating keratoplasty for herpes simplex keratitis. *Cornea*, 13, 232-236.

Barquinero J, Eixarch H, Perez-Melgosa M 2004. Retroviral vectors: new applications for an old tool. *Gene Ther*, 11 Suppl 1, S3-9.

Ben-David H, Sharabi A, Dayan M, Sela M, Mozes E 2007. The role of CD8+CD28 regulatory cells in suppressing myasthenia gravis-associated responses by a dual altered peptide ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 17459-17464.

Bennasser Y, Le SY, Benkirane M, Jeang KT 2005. Evidence that HIV-1 encodes an siRNA and a suppressor of RNA silencing. *Immunity*, 22, 607-619.

Berg CJ, Wilcox LS, d'Almada PJ 2001. The prevalence of socioeconomic and behavioral characteristics and their impact on very low birth weight in black and white infants in Georgia. *Maternal and child health journal*, 5, 75-84.

Bernstein DI, Bellamy AR, Hook EW, 3rd, Levin MJ, Wald A, Ewell MG, Wolff PA, Deal CD, Heineman TC, Dubin G, Belshe RB 2013. Epidemiology, clinical presentation, and antibody response to primary infection with herpes simplex virus type 1 and type 2 in young women. *Clin Infect Dis*, 56, 344-351.

Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, Barik S 2005. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med*, 11, 50-55.

Bivalkar-Mehla S, Vakharia J, Mehla R, Abreha M, Kanwar JR, Tikoo A, Chauhan A 2011. Viral RNA silencing suppressors (RSS): novel strategy of viruses to ablate the host RNA interference (RNAi) defense system. *Virus research*, 155, 1-9.

Boehmer PE, Lehman IR 1997. Herpes simplex virus DNA replication. *Annual review of biochemistry*, 66, 347-384.

Bohl DD, Katz KA, Bernstein K, Wong E, Raymond HF, Klausner JD, McFarland W 2011. Prevalence and correlates of herpes simplex virus type-2 infection among men who have sex with men, san francisco, 2008. *Sexually transmitted diseases*, 38, 617-621.

Boivin N, Sergerie Y, Rivest S, Boivin G 2008. Effect of pretreatment with toll-like receptor agonists in a mouse model of herpes simplex virus type 1 encephalitis. *J Infect Dis*, 198, 664-672.

Bradley SP, Rastellini C, da Costa MA, Kowalik TF, Bloomenthal AB, Brown M, Cicalese L, Basadonna GP, Uknis ME 2005. Gene silencing in the endocrine pancreas mediated by short-interfering RNA. *Pancreas*, 31, 373-379.

Brennecke J, Aravin AA, Stark A, Dus M, Kellis M, Sachidanandam R, Hannon GJ 2007. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell*, 128, 1089-1103.

Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM 2003. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell*, 113, 25-36.

Brockman MA, Knipe DM 2008. Herpes simplex virus as a tool to define the role of complement in the immune response to peripheral infection. *Vaccine*, 26 Suppl 8, I94-99.

Brown TJ, McCrary M, Tyring SK 2002. Antiviral agents: Non-antiretroviral [correction of Nonantiviral] drugs. *J Am Acad Dermatol*, 47, 581-599.

Cai X, Cullen BR 2007. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *RNA*, 13, 313-316.

Campadelli-Fiume G, Menotti L, Avitabile E, Gianni T 2012. Viral and cellular contributions to herpes simplex virus entry into the cell. *Current opinion in virology*, 2, 28-36.

Cardozo FT, Larsen IV, Carballo EV, Jose G, Stern RA, Brummel RC, Camellini CM, Rossi MJ, Simoes CM, Brandt CR 2013. In vivo anti-herpes simplex virus activity of a sulfated derivative of *Agaricus brasiliensis* mycelial polysaccharide. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57, 2541-2549.

Carmell MA, Girard A, van de Kant HJ, Bourc'his D, Bestor TH, de Rooij DG, Hannon GJ 2007. MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Developmental cell*, 12, 503-514.

Carmell MA, Xuan Z, Zhang MQ, Hannon GJ 2002. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes & development*, 16, 2733-2742.

Carr DJ, Harle P, Gebhardt BM 2001. The immune response to ocular herpes simplex virus type 1 infection. *Experimental biology and medicine*, 226, 353-366.

Carrozza MJ, DeLuca NA 1996. Interaction of the viral activator protein ICP4 with TFIID through TAF250. *Mol Cell Biol*, 16, 3085-3093.

Carthew RW, Sontheimer EJ 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136, 642-655.

Chaudhuri A, Kennedy PG 2002. Diagnosis and treatment of viral encephalitis. *Postgrad Med J*, 78, 575-583.

Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R 2005. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436, 740-744.

Cheng G, Feng Z, He B 2005. Herpes simplex virus 1 infection activates the endoplasmic reticulum resident kinase PERK and mediates eIF-2alpha dephosphorylation by the gamma(1)34.5 protein. *J Virol*, 79, 1379-1388.

Choudhuri S 2009. Lesser known relatives of miRNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 388, 177-180.

Christophers J, Clayton J, Craske J, Ward R, Collins P, Trowbridge M, Darby G 1998. Survey of resistance of herpes simplex virus to acyclovir in northwest England. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42, 868-872.

Chung WJ, Okamura K, Martin R, Lai EC 2008. Endogenous RNA interference provides a somatic defense against Drosophila transposons. *Current biology : CB*, 18, 795-802.

Clemens SA, Farhat CK 2010. Seroprevalence of herpes simplex 1-2 antibodies in Brazil. *Rev Saude Publica*, 44, 726-734.

Coburn GA, Cullen BR 2002. Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. *J Virol*, 76, 9225-9231.

Coen DM 1996. Antiviral drug resistance in herpes simplex virus. *Advances in experimental medicine and biology*, 394, 49-57.

Cogoni C, Irelan JT, Schumacher M, Schmidhauser TJ, Selker EU, Macino G 1996. Transgene silencing of the al-1 gene in vegetative cells of Neurospora is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *The EMBO journal*, 15, 3153-3163.

Cohen EJ, Laibson PR, Arentsen JJ 1983. Corneal transplantation for herpes simplex keratitis. *American journal of ophthalmology*, 95, 645-650.

Colbere-Garapin F, Blondel B, Saulnier A, Pelletier I, Labadie K 2005. Silencing viruses by RNA interference. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 7, 767-775.

Conrady CD, Drevets DA, Carr DJ 2010. Herpes simplex type I (HSV-1) infection of the nervous system: is an immune response a good thing? *Journal of neuroimmunology*, 220, 1-9.

Cook WJ, Kramer MF, Walker RM, Burwell TJ, Holman HA, Coen DM, Knipe DM 2004. Persistent expression of chemokine and chemokine receptor RNAs at primary and latent sites of herpes simplex virus 1 infection. *Virology journal*, 1, 5.

Cowan FM, French RS, Mayaud P, Gopal R, Robinson NJ, de Oliveira SA, Faillace T, Uuskula A, Nygard-Kibur M, Ramalingam S, Sridharan G, El Aouad R, Alami K, Rbai M, Sunil-Chandra NP, Brown DW 2003. Seroepidemiological study of herpes simplex virus types 1 and 2 in Brazil, Estonia, India, Morocco, and Sri Lanka. *Sexually transmitted infections*, 79, 286-290.

Crowther C, Mowa MB, Ely A, Arbuthnot PB 2013. Inhibition of hepatitis B virus replication in vivo using helper-dependent adenovirus vectors to deliver antiviral RNAi expression cassettes. *Antiviral therapy*.

Cunningham AL, Diefenbach RJ, Miranda-Saksena M, Bosnjak L, Kim M, Jones C, Douglas MW 2006. The cycle of human herpes simplex virus infection: virus transport and immune control. *J Infect Dis*, 194 Suppl 1, S11-18.

Cunningham AL, Mikloska Z 2001. The Holy Grail: immune control of human herpes simplex virus infection and disease. *Herpes*, 8 Suppl 1, 6A-10A.

Czech B, Hannon GJ 2011. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat Rev Genet*, 12, 19-31.

Da Rosa-Santos OL, Goncalves Da Silva A, Pereira AC, Jr. 1996. Herpes simplex virus type 2 in Brazil: seroepidemiologic survey. *International journal of dermatology*, 35, 794-796.

Dalkvist J, Wahlin TB, Bartsch E, Forsbeck M 1995. Herpes simplex and mood: a prospective study. *Psychosomatic medicine*, 57, 127-137.

Dambrosi S, Martin M, Yim K, Miles B, Canas J, Sergerie Y, Boivin G 2010. Neurovirulence and latency of drug-resistant clinical herpes simplex viruses in animal models. *J Med Virol*, 82, 1000-1006.

Davidson BL, McCray PB, Jr. 2011. Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nature reviews. Genetics*, 12, 329-340.

Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E 2009. The order Herpesvirales. *Archives of virology*, 154, 171-177.

Davuluri GR, van Tuinen A, Fraser PD, Manfredonia A, Newman R, Burgess D, Brummell DA, King SR, Palys J, Uhlig J, Bramley PM, Pennings HM, Bowler C 2005. Fruit-specific RNAi-mediated suppression of DET1 enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. *Nat Biotechnol*, 23, 890-895.

De Clercq E 2001. Antiviral drugs: current state of the art. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 22, 73-89.

— 2004. Antiviral drugs in current clinical use. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 30, 115-133.

De Clercq E, Field HJ 2006. Antiviral prodrugs - the development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy. *British journal of pharmacology*, 147, 1-11.

De Clercq E, Luczak M 1976. Intranasal challenge of mice with herpes simplex virus: an experimental model for evaluation of the efficacy of antiviral drugs. *J Infect Dis*, 133 Suppl, A226-236.

De Tiege X, Rozenberg F, Heron B 2008. The spectrum of herpes simplex encephalitis in children. *Eur J Paediatr Neurol*, 12, 72-81.

de Vries W, Haasnoot J, Fouchier R, de Haan P, Berkhout B 2009. Differential RNA silencing suppression activity of NS1 proteins from different influenza A virus strains. *J Gen Virol*, 90, 1916-1922.

DeLano RM, Mallery SR 1998. Stress-related modulation of central nervous system immunity in a murine model of herpes simplex encephalitis. *Journal of neuroimmunology*, 89, 51-58.

DeVincenzo J, Lambkin-Williams R, Wilkinson T, Cehelsky J, Nochur S, Walsh E, Meyers R, Gollob J, Vaishnav A 2010. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 8800-8805.

Dix RD, McKendall RR, Baringer JR 1983. Comparative neurovirulence of herpes simplex virus type 1 strains after peripheral or intracerebral inoculation of BALB/c mice. *Infect Immun*, 40, 103-112.

Donahue RE, Clark SC 1992. Granulocyte colony-stimulating factors as therapeutic agents. *Immunol Ser*, 57, 637-649.

Donahue RE, Kessler SW, Bodine D, McDonagh K, Dunbar C, Goodman S, Agricola B, Byrne E, Raffeld M, Moen R, et al. 1992. Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J Exp Med*, 176, 1125-1135.

Douglas JM, Jr., Berman SM 2009. Screening for HSV-2 infection in STD clinics and beyond: a few answers but more questions. *Sexually transmitted diseases*, 36, 729-731.

Drummond CW, Eglin RP, Esiri MM 1994. Herpes simplex virus encephalitis in a mouse model: PCR evidence for CNS latency following acute infection. *Journal of the neurological sciences*, 127, 159-163.

Duan R, van Dun JM, Remeijer L, Siemerink M, Mulder PG, Norberg P, Osterhaus AD, Verjans GM 2008. Prevalence of herpes simplex virus type 1 glycoprotein G (gG) and gI genotypes in patients with herpetic keratitis. *The British journal of ophthalmology*, 92, 1195-1200.

Dvorak F, Martinez-Torres F, Sellner J, Haas J, Schellinger PD, Schwaninger M, Meyding-Lamade UK 2004. Experimental herpes simplex virus encephalitis: a long-term study of interleukin-6 expression in mouse brain tissue. *Neuroscience letters*, 367, 289-292.

Dykxhoorn DM, Lieberman J 2006. Knocking down disease with siRNAs. *Cell*, 126, 231-235.

Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA 2003. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 457-467.

Egan KP, Wu S, Wigdahl B, Jennings SR 2013. Immunological control of herpes simplex virus infections. *Journal of neurovirology*, 19, 328-345.

Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 15, 188-200.

Enquist LW, Husak PJ, Banfield BW, Smith GA 1998. Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Adv Virus Res*, 51, 237-347.

Ernst ME, Franey RJ 1998. Acyclovir- and ganciclovir-induced neurotoxicity. *Ann Pharmacother*, 32, 111-113.

Esiri MM 1982. Herpes simplex encephalitis. An immunohistological study of the distribution of viral antigen within the brain. *Journal of the neurological sciences*, 54, 209-226.

Esiri MM, Drummond CW, Morris CS 1995. Macrophages and microglia in HSV-1 infected mouse brain. *Journal of neuroimmunology*, 62, 201-205.

Fatahzadeh M, Schwartz RA 2007a. Human herpes simplex labialis. *Clinical and experimental dermatology*, 32, 625-630.

— 2007b. Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J Am Acad Dermatol*, 57, 737-763; quiz 764-736.

Ferreira HL, Spilki FR, de Almeida RS, Santos MM, Arns CW 2007. Inhibition of avian metapneumovirus (AMPV) replication by RNA interference targeting nucleoprotein gene (N) in cultured cells. *Antiviral research*, 74, 77-81.

Ficker LA, Kirkness CM, Rice NS, Steele AD 1988. Longterm prognosis for corneal grafting in herpes simplex keratitis. *Eye*, 2 (Pt 4), 400-408.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-811.

Flannagan RS, Cosio G, Grinstein S 2009. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature reviews. Microbiology*, 7, 355-366.

Fleming DT, Wasserheit JN 1999. From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection. *Sexually transmitted infections*, 75, 3-17.

Forstemann K, Tomari Y, Du T, Vagin VV, Denli AM, Bratu DP, Klattenhoff C, Theurkauf WE, Zamore PD 2005. Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS biology*, 3, e236.

Freeman EE, Weiss HA, Glynn JR, Cross PL, Whitworth JA, Hayes RJ 2006. Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Aids*, 20, 73-83.

Gallagher M, Rapp PR 1997. The use of animal models to study the effects of aging on cognition. *Annual review of psychology*, 48, 339-370.

Gantt S, Muller WJ 2013. The immunologic basis for severe neonatal herpes disease and potential strategies for therapeutic intervention. *Clinical & developmental immunology*, 2013, 369172.

Ge Q, Filip L, Bai A, Nguyen T, Eisen HN, Chen J 2004. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 8676-8681.

Ge Q, McManus MT, Nguyen T, Shen CH, Sharp PA, Eisen HN, Chen J 2003. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for

degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 2718-2723.

Gebhardt BM, Halford WP 2005. Evidence that spontaneous reactivation of herpes virus does not occur in mice. *Virology journal*, 2, 67.

Geisbert TW, Lee AC, Robbins M, Geisbert JB, Honko AN, Sood V, Johnson JC, de Jong S, Tavakoli I, Judge A, Hensley LE, Maclachlan I 2010. Postexposure protection of non-human primates against a lethal Ebola virus challenge with RNA interference: a proof-of-concept study. *Lancet*, 375, 1896-1905.

Ghildiyal M, Seitz H, Horwich MD, Li C, Du T, Lee S, Xu J, Kittler EL, Zapp ML, Weng Z, Zamore PD 2008. Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. *Science*, 320, 1077-1081.

Ghosn J, Leruez-Ville M, Blanche J, Delobelle A, Beaudoux C, Mascard L, Lecuyer H, Canestri A, Landman R, Zucman D, Ponscarne D, Rami A, Viard JP, Spire B, Rouzioux C, Costagliola D, Suzan-Monti M, Evarist AEPSG 2014. HIV-1 DNA levels in peripheral blood mononuclear cells and cannabis use are associated with intermittent HIV shedding in semen of men who have sex with men on successful antiretroviral regimens. *Clin Infect Dis*, 58, 1763-1770.

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

Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Carmell MA 2006. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*, 442, 199-202.

Glazov E, Phillips K, Budziszewski GJ, Schob H, Meins F, Jr., Levin JZ 2003. A gene encoding an RNase D exonuclease-like protein is required for post-transcriptional silencing in *Arabidopsis*. *Plant J*, 35, 342-349.

Gleave ME, Monia BP 2005. Antisense therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*, 5, 468-479.

Gong Y, Matthews B, Cheung D, Tam T, Gadawski I, Leung D, Holan G, Raff J, Sacks S 2002. Evidence of dual sites of action of dendrimers: SPL-2999 inhibits both virus entry and late stages of herpes simplex virus replication. *Antiviral Res*, 55, 319-329.

Gosselin RD, Suter MR, Ji RR, Decosterd I 2010. Glial cells and chronic pain. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 16, 519-531.

Graeber MB, Streit WJ 2010. Microglia: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119, 89-105.

Gu B, DeLuca N 1994. Requirements for activation of the herpes simplex virus glycoprotein C promoter in vitro by the viral regulatory protein ICP4. *J Virol*, 68, 7953-7965.

Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N, Altman S 1983. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, 35, 849-857.

Gupta A, Gartner JJ, Sethupathy P, Hatzigeorgiou AG, Fraser NW 2006. Anti-apoptotic function of a microRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript. *Nature*, 442, 82-85.

Gupta PK, Sonwane AA, Singh NK, Meshram CD, Dahiya SS, Pawar SS, Gupta SP, Chaturvedi VK, Saini M 2012. Intracerebral delivery of small interfering RNAs (siRNAs) using adenoviral vector protects mice against lethal peripheral rabies challenge. *Virus research*, 163, 11-18.

Haasnoot J, de Vries W, Geutjes EJ, Prins M, de Haan P, Berkhout B 2007a. The Ebola virus VP35 protein is a suppressor of RNA silencing. *PLoS Pathog*, 3, e86.

Haasnoot J, Westerhout EM, Berkhout B 2007b. RNA interference against viruses: strike and counterstrike. *Nat Biotechnol*, 25, 1435-1443.

Hajeri PB, Singh SK 2009. siRNAs: their potential as therapeutic agents--Part I. Designing of siRNAs. *Drug discovery today*, 14, 851-858.

Halford WP, Balliet JW, Gebhardt BM 2004. Re-evaluating natural resistance to herpes simplex virus type 1. *J Virol*, 78, 10086-10095.

Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404, 293-296.

Hancock MH, Corcoran JA, Smiley JR 2006. Herpes simplex virus regulatory proteins VP16 and ICP0 counteract an innate intranuclear barrier to viral gene expression. *Virology*, 352, 237-252.

Hannon GJ, Rossi JJ 2004. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature*, 431, 371-378.

Hatano A 1989. [Intranasal infection of ICR mice with herpes simplex virus type 1]. *Nihon Jibiinkoka Gakkai kaiho*, 92, 579-587.

He ML, Zheng B, Peng Y, Peiris JS, Poon LL, Yuen KY, Lin MC, Kung HF, Guan Y 2003. Inhibition of SARS-associated coronavirus infection and replication by RNA interference. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 290, 2665-2666.

Heidenreich O, Krauter J, Riehle H, Hadwiger P, John M, Heil G, Vornlocher HP, Nordheim A 2003. AML1/MTG8 oncogene suppression by small interfering RNAs supports myeloid differentiation of t(8;21)-positive leukemic cells. *Blood*, 101, 3157-3163.

Heister T, Heid I, Ackermann M, Fraefel C 2002. Herpes simplex virus type 1/adenovirus hybrid vectors mediate site-specific integration at the adenovirus preintegration site, AAVS1, on human chromosome 19. *J Virol*, 76, 7163-7173.

Heldwein EE, Krummenacher C 2008. Entry of herpesviruses into mammalian cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65, 1653-1668.

Herman M, Ciancanelli M, Ou YH, Lorenzo L, Klaudel-Dreszler M, Pauwels E, Sancho-Shimizu V, Perez de Diego R, Abhyankar A, Israelsson E, Guo Y, Cardon A, Rozenberg F, Lebon P, Tardieu M, Heropolitanska-Pliszka E, Chaussabel D, White MA, Abel L, Zhang SY, Casanova JL 2012. Heterozygous TBK1 mutations impair TLR3 immunity and underlie herpes simplex encephalitis of childhood. *The Journal of experimental medicine*, 209, 1567-1582.

Hill A, Jugovic P, York I, Russ G, Bennink J, Yewdell J, Ploegh H, Johnson D 1995. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature*, 375, 411-415.

Hill C, McKinney E, Lowndes CM, Munro H, Murphy G, Parry JV, Gill ON, Network GUMA 2009. Epidemiology of herpes simplex virus types 2 and 1 amongst men who have sex with men attending sexual health clinics in England and Wales: implications for HIV prevention and management. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 14.

Hoots BE, Hudgens MG, Cole SR, King CC, Klein RS, Mayer KH, Rompalo AM, Sobel JD, Jamieson DJ, Smith JS 2011. Lack of association of herpes simplex virus type 2 seropositivity with the progression of HIV infection in the HERS cohort. *American journal of epidemiology*, 173, 837-844.

Hosono T, Mizuguchi H, Katayama K, Xu ZL, Sakurai F, Ishii-Watabe A, Kawabata K, Yamaguchi T, Nakagawa S, Mayumi T, Hayakawa T 2004. Adenovirus vector-

mediated doxycycline-inducible RNA interference. *Human gene therapy*, 15, 813-819.

Huang DB, Wu JJ, Tying SK 2004. A review of licensed viral vaccines, some of their safety concerns, and the advances in the development of investigational viral vaccines. *The Journal of infection*, 49, 179-209.

Huang F, Hua X, Yang S, Yuan C, Zhang W 2009. Effective inhibition of hepatitis E virus replication in A549 cells and piglets by RNA interference (RNAi) targeting RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral research*, 83, 274-281.

Huang W, Xie P, Xu M, Li P, Zao G 2011. The influence of stress factors on the reactivation of latent herpes simplex virus type 1 in infected mice. *Cell biochemistry and biophysics*, 61, 115-122.

Hufner K, Derfuss T, Herberger S, Sunami K, Russell S, Sinicina I, Arbusow V, Strupp M, Brandt T, Theil D 2006. Latency of alpha-herpes viruses is accompanied by a chronic inflammation in human trigeminal ganglia but not in dorsal root ganglia. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 65, 1022-1030.

Hutvagner G, Zamore PD 2002. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, 297, 2056-2060.

ICTV 2015. ICTV 2014 Master Species List. In *ICTV*, 12/06/2015 ed.

Idrees S, Ashfaq UA, Khaliq S 2013. RNAi: antiviral therapy against dengue virus. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 3, 232-236.

Itoyama Y, Sekizawa T, Openshaw H, Kogure K, Goto I 1991. Early loss of astrocytes in herpes simplex virus-induced central nervous system demyelination. *Annals of neurology*, 29, 285-292.

Jacobs A, Breakefield XO, Fraefel C 1999. HSV-1-based vectors for gene therapy of neurological diseases and brain tumors: part I. HSV-1 structure, replication and pathogenesis. *Neoplasia*, 1, 387-401.

Jacque JM, Triques K, Stevenson M 2002. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature*, 418, 435-438.

James SH, Kimberlin DW, Whitley RJ 2009. Antiviral therapy for herpesvirus central nervous system infections: neonatal herpes simplex virus infection, herpes simplex encephalitis, and congenital cytomegalovirus infection. *Antiviral research*, 83, 207-213.

Janeway CA, Jr., Medzhitov R 2002. Innate immune recognition. *Annual review of immunology*, 20, 197-216.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ 2007. *Imunobiologia - O sistema imune na saúde e na doença*. 6 ed., 6 ed., Artmed, Porto Alegre, Brasil.

Ji J, Glaser A, Wernli M, Berke JM, Moradpour D, Erb P 2008. Suppression of short interfering RNA-mediated gene silencing by the structural proteins of hepatitis C virus. *J Gen Virol*, 89, 2761-2766.

Jin F, Prestage GP, Mao L, Kippax SC, Pell CM, Donovan B, Templeton DJ, Taylor J, Mindel A, Kaldor JM, Grulich AE 2006. Transmission of herpes simplex virus types 1 and 2 in a prospective cohort of HIV-negative gay men: the health in men study. *J Infect Dis*, 194, 561-570.

Johnson GL, Limon L, Trikha G, Wall H 1994. Acute renal failure and neurotoxicity following oral acyclovir. *Ann Pharmacother*, 28, 460-463.

Johnson KE, Knipe DM 2010. Herpes simplex virus-1 infection causes the secretion of a type I interferon-antagonizing protein and inhibits signaling at or before Jak-1 activation. *Virology*, 396, 21-29.

Johnson M, Valyi-Nagy T 1998. Expanding the clinicopathologic spectrum of herpes simplex encephalitis. *Human pathology*, 29, 207-210.

Jones C, Inman M, Peng W, Henderson G, Doster A, Perng GC, Angeletti AK 2005. The herpes simplex virus type 1 locus that encodes the latency-associated transcript enhances the frequency of encephalitis in male BALB/c mice. *J Virol*, 79, 14465-14469.

Kaiser PK, Symons RC, Shah SM, Quinlan EJ, Tabandeh H, Do DV, Reisen G, Lockridge JA, Short B, Guerciolini R, Nguyen QD, Sirna-027 Study I 2010. RNAi-based treatment for neovascular age-related macular degeneration by Sirna-027. *American journal of ophthalmology*, 150, 33-39 e32.

Kanwar JR, Mahidhara G, Kanwar RK 2010. MicroRNA in human cancer and chronic inflammatory diseases. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2, 1113-1126.

Kastrukoff LF, Lau AS, Kim SU 1987. Multifocal CNS demyelination following peripheral inoculation with herpes simplex virus type 1. *Annals of neurology*, 22, 52-59.

— 1988. Herpes simplex virus type 1 induced multifocal demyelination of the central nervous system in mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 540, 654-656.

Kastrukoff LF, Lau AS, Thomas EE 2012. The effect of mouse strain on herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection of the central nervous system (CNS). *Herpesviridae*, 3, 4.

Kawai T, Akira S 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*, 11, 373-384.

Kawamura Y, Saito K, Kin T, Ono Y, Asai K, Sunohara T, Okada TN, Siomi MC, Siomi H 2008. Drosophila endogenous small RNAs bind to Argonaute 2 in somatic cells. *Nature*, 453, 793-797.

Kelly BJ, Fraefel C, Cunningham AL, Diefenbach RJ 2009. Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virus research*, 145, 173-186.

Kennedy PG 2004. Viral encephalitis: causes, differential diagnosis, and management. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 75 Suppl 1, i10-15.

— 2005. Viral encephalitis. *J Neurol*, 252, 268-272.

Kennedy PG, Steiner I 2013. Recent issues in herpes simplex encephalitis. *Journal of neurovirology*, 19, 346-350.

Kern ER, Richards JT, Glasgow LA, Overall JC, Jr., de Miranda P 1982. Optimal treatment of herpes simplex virus encephalitis in mice with oral acyclovir. *The American journal of medicine*, 73, 125-131.

Kern ER, Richards JT, Overall JC, Jr. 1986. Acyclovir treatment of disseminated herpes simplex virus type 2 infection in weanling mice: alteration of mortality and pathogenesis. *Antiviral research*, 6, 189-195.

Khaliq S, Khaliq SA, Zahur M, Ijaz B, Jahan S, Ansar M, Riazuddin S, Hassan S 2010. RNAi as a new therapeutic strategy against HCV. *Biotechnology advances*, 28, 27-34.

Kim DH, Behlke MA, Rose SD, Chang MS, Choi S, Rossi JJ 2005. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol*, 23, 222-226.

Kim DH, Longo M, Han Y, Lundberg P, Cantin E, Rossi JJ 2004. Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. *Nat Biotechnol*, 22, 321-325.

Kim JC, Choi SH, Kim JK, Kim Y, Kim HJ, Im JS, Lee SY, Choi JM, Lee HM, Ahn JK 2008. [Herpes simplex virus type 1 ICP27 induces apoptotic cell death by

increasing intracellular reactive oxygen species]. *Molekuliarnaia biologija*, 42, 470-477.

Kim SS, Ye C, Kumar P, Chiu I, Subramanya S, Wu H, Shankar P, Manjunath N 2010. Targeted delivery of siRNA to macrophages for anti-inflammatory treatment. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 18, 993-1001.

Kim WJ, Kim SW 2009. Efficient siRNA delivery with non-viral polymeric vehicles. *Pharmaceutical research*, 26, 657-666.

Kimberlin DW 2007. Management of HSV encephalitis in adults and neonates: diagnosis, prognosis and treatment. *Herpes*, 14, 11-16.

Kimberlin DW, Lakeman FD, Arvin AM, Prober CG, Corey L, Powell DA, Burchett SK, Jacobs RF, Starr SE, Whitley RJ 1996. Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis and management of neonatal herpes simplex virus disease. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. *J Infect Dis*, 174, 1162-1167.

Klattenhoff C, Theurkauf W 2008. Biogenesis and germline functions of piRNAs. *Development*, 135, 3-9.

Kleinman ME, Yamada K, Takeda A, Chandrasekaran V, Nozaki M, Baffi JZ, Albuquerque RJ, Yamasaki S, Itaya M, Pan Y, Appukuttan B, Gibbs D, Yang Z, Kariko K, Ambati BK, Wilgus TA, DiPietro LA, Sakurai E, Zhang K, Smith JR, Taylor EW, Ambati J 2008. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature*, 452, 591-597.

Kleymann G 2003. Novel agents and strategies to treat herpes simplex virus infections. *Expert opinion on investigational drugs*, 12, 165-183.

Kneen R, Jakka S, Mithyantha R, Riordan A, Solomon T 2010. The management of infants and children treated with aciclovir for suspected viral encephalitis. *Arch Dis Child*, 95, 100-106.

Kodukula P, Liu T, Rooijen NV, Jager MJ, Hendricks RL 1999. Macrophage control of herpes simplex virus type 1 replication in the peripheral nervous system. *Journal of immunology*, 162, 2895-2905.

Koelle DM, Wald A 2000. Herpes simplex virus: the importance of asymptomatic shedding. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 45 Suppl T3, 1-8.

Kolokotronis A, Dumas S 2006. Herpes simplex virus infection, with particular reference to the progression and complications of primary herpetic

gingivostomatitis. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 12, 202-211.

Kopp SJ, Banisadr G, Glajch K, Maurer UE, Grunewald K, Miller RJ, Osten P, Spear PG 2009. Infection of neurons and encephalitis after intracranial inoculation of herpes simplex virus requires the entry receptor nectin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 17916-17920.

Kozomara A, Griffiths-Jones S 2015. miRNA DATABASE [database on the Internet]2014 [updated 06/14; cited 23/08/15]. Available from: <http://www.mirbase.org/>.

Kramer AH 2013. Viral encephalitis in the ICU. *Critical care clinics*, 29, 621-649.

Kristensson K, Svennerholm B, Lycke E 1983. Herpes simplex virus-induced demyelination. Effects of reinfection and challenge with neuroantigens. *Journal of the neurological sciences*, 60, 247-252.

Kristensson K, Svennerholm B, Persson L, Vahlne A, Lycke E 1979. Latent herpes simplex virus trigeminal ganglionic infection in mice and demyelination in the central nervous system. *Journal of the neurological sciences*, 43, 253-263.

Kristensson K, Vahlne A, Persson LA, Lycke E 1978. Neural spread of herpes simplex virus types 1 and 2 in mice after corneal or subcutaneous (footpad) inoculation. *Journal of the neurological sciences*, 35, 331-340.

Kronke J, Kittler R, Buchholz F, Windisch MP, Pietschmann T, Bartenschlager R, Frese M 2004. Alternative approaches for efficient inhibition of hepatitis C virus RNA replication by small interfering RNAs. *J Virol*, 78, 3436-3446.

Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ, Sands J, Gottschling DE, Cech TR 1982. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell*, 31, 147-157.

Kumar P, Wu H, McBride JL, Jung KE, Kim MH, Davidson BL, Lee SK, Shankar P, Manjunath N 2007. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature*, 448, 39-43.

Kuo YC, Chen CC, Tsai WJ, Ho YH 2001. Regulation of herpes simplex virus type 1 replication in Vero cells by *Psychotria serpens*: relationship to gene expression, DNA replication, and protein synthesis. *Antiviral research*, 51, 95-109.

Kurt-Jones EA, Chan M, Zhou S, Wang J, Reed G, Bronson R, Arnold MM, Knipe DM, Finberg RW 2004. Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 1315-1320.

Kusov YY, Gosert R, Gauss-Muller V 2005. Replication and in vivo repair of the hepatitis A virus genome lacking the poly(A) tail. *J Gen Virol*, 86, 1363-1368.

Lafferty WE, Downey L, Celum C, Wald A 2000. Herpes simplex virus type 1 as a cause of genital herpes: impact on surveillance and prevention. *J Infect Dis*, 181, 1454-1457.

Lambiase A, Coassin M, Costa N, Lauretti P, Micera A, Ghinelli E, Aloe L, Rama P, Bonini S 2008. Topical treatment with nerve growth factor in an animal model of herpetic keratitis. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 246, 121-127.

Lang A, Nikolich-Zugich J 2005. Development and migration of protective CD8+ T cells into the nervous system following ocular herpes simplex virus-1 infection. *Journal of immunology*, 174, 2919-2925.

Lasek AW, Azouaou N 2010. Virus-delivered RNA interference in mouse brain to study addiction-related behaviors. *Methods in molecular biology*, 602, 283-298.

Lee NS, Dohjima T, Bauer G, Li H, Li MJ, Ehsani A, Salvaterra P, Rossi J 2002. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol*, 20, 500-505.

Lehman IR, Boehmer PE 1999. Replication of herpes simplex virus DNA. *The Journal of biological chemistry*, 274, 28059-28062.

Leuschner PJ, Ameres SL, Kueng S, Martinez J 2006. Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep*, 7, 314-320.

Lewandowski G 1997. Immunohistochemical examination of intracerebral T cell recruitment and adhesion molecule induction in herpes simplex virus-infected mice. *Brain, behavior, and immunity*, 11, 264-272.

Lewandowski G, Zimmerman MN, Denk LL, Porter DD, Prince GA 2002. Herpes simplex type 1 infects and establishes latency in the brain and trigeminal ganglia during primary infection of the lip in cotton rats and mice. *Archives of virology*, 147, 167-179.

Li BJ, Tang Q, Cheng D, Qin C, Xie FY, Wei Q, Xu J, Liu Y, Zheng BJ, Woodle MC, Zhong N, Lu PY 2005. Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. *Nat Med*, 11, 944-951.

Li J, Ye L, Wang X, Hu S, Ho W 2012. Induction of interferon-gamma contributes to Toll-like receptor 3-mediated herpes simplex virus type 1 inhibition in astrocytes. *Journal of neuroscience research*, 90, 399-406.

Li WX, Li H, Lu R, Li F, Dus M, Atkinson P, Brydon EW, Johnson KL, Garcia-Sastre A, Ball LA, Palese P, Ding SW 2004. Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 1350-1355.

Liesegang TJ 2001. Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance. *Cornea*, 20, 1-13.

Lima GK, Zolini GP, Mansur DS, Freire Lima BH, Wischhoff U, Astigarraga RG, Dias MF, das Gracas Almeida Silva M, Bela SR, do Valle Antonelli LR, Arantes RM, Gazzinelli RT, Bafica A, Kroon EG, Campos MA 2010. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR9 expressed in trigeminal ganglia are critical to viral control during herpes simplex virus 1 infection. *The American journal of pathology*, 177, 2433-2445.

Lin YA, Chiang A, Lin R, Yao P, Chen R, Butte AJ 2007. Methodologies for extracting functional pharmacogenomic experiments from international repository. *AMIA Annu Symp Proc*, 463-467.

Lindberg A, Kreivi JP 2002. Splicing inhibition at the level of spliceosome assembly in the presence of herpes simplex virus protein ICP27. *Virology*, 294, 189-198.

Lippman Z, Martienssen R 2004. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature*, 431, 364-370.

Liu F, Liu Y, Meng Y, Yang M, He K 2004a. Structure of polysaccharide from *Polygonatum cyrtoneura* Hua and the antiherpetic activity of its hydrolyzed fragments. *Antiviral research*, 63, 183-189.

Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ 2004b. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 305, 1437-1441.

Liu Q, Rand TA, Kalidas S, Du F, Kim HE, Smith DP, Wang X 2003. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science*, 301, 1921-1925.

Liu Q, Singh SP, Green AG 2002. High-stearic and High-oleic cottonseed oils produced by hairpin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing. *Plant physiology*, 129, 1732-1743.

Livak KJ 1990. Detailed structure of the *Drosophila melanogaster* stellate genes and their transcripts. *Genetics*, 124, 303-316.

Livorsi D, Anderson E, Qureshi S, Howard M, Wang YF, Franco-Paredes C 2010. Brainstem encephalitis: an unusual presentation of herpes simplex virus infection. *J Neurol*, 257, 1432-1437.

Lokensgard JR, Cheeran MC, Hu S, Gekker G, Peterson PK 2002. Glial cell responses to herpesvirus infections: role in defense and immunopathogenesis. *J Infect Dis*, 186 Suppl 2, S171-179.

Lomholt JA, Baggesen K, Ehlers N 1995. Recurrence and rejection rates following corneal transplantation for herpes simplex keratitis. *Acta ophthalmologica Scandinavica*, 73, 29-32.

Looker KJ, Garnett GP 2005. A systematic review of the epidemiology and interaction of herpes simplex virus types 1 and 2. *Sexually transmitted infections*, 81, 103-107.

Looker KJ, Garnett GP, Schmid GP 2008. An estimate of the global prevalence and incidence of herpes simplex virus type 2 infection. *Bulletin of the World Health Organization*, 86, 805-812, A.

Lopez C 1975. Genetics of natural resistance to herpesvirus infections in mice. *Nature*, 258, 152-153.

Lu L, Ho Y, Kwang J 2006. Suppression of porcine arterivirus replication by baculovirus-delivered shRNA targeting nucleoprotein. *Biochemical and biophysical research communications*, 340, 1178-1183.

Lucchetta EM, Carthew RW, Ismagilov RF 2009. The endo-siRNA pathway is essential for robust development of the *Drosophila* embryo. *PloS one*, 4, e7576.

Lundberg P, Welander P, Han X, Cantin E 2003. Herpes simplex virus type 1 DNA is immunostimulatory in vitro and in vivo. *J Virol*, 77, 11158-11169.

Lupi O 2011. Prevalence and risk factors for herpes simplex infection among patients at high risk for HIV infection in Brazil. *International journal of dermatology*, 50, 709-713.

Lyon AW, Mansoor A, Trotter MJ 2002. Urinary gems: acyclovir crystalluria. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 126, 753-754.

MacRae IJ, Ma E, Zhou M, Robinson CV, Doudna JA 2008. In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 512-517.

- Manjunath N, Wu H, Subramanya S, Shankar P 2009. Lentiviral delivery of short hairpin RNAs. *Adv Drug Deliv Rev*, 61, 732-745.
- Mansoor S, Amin I, Hussain M, Zafar Y, Briddon RW 2006. Engineering novel traits in plants through RNA interference. *Trends in plant science*, 11, 559-565.
- Mansur DS, Kroon EG, Nogueira ML, Arantes RM, Rodrigues SC, Akira S, Gazzinelli RT, Campos MA 2005. Lethal encephalitis in myeloid differentiation factor 88-deficient mice infected with herpes simplex virus 1. *The American journal of pathology*, 166, 1419-1426.
- Marques CP, Cheeran MC, Palmquist JM, Hu S, Lokensgard JR 2008. Microglia are the major cellular source of inducible nitric oxide synthase during experimental herpes encephalitis. *Journal of neurovirology*, 14, 229-238.
- Marques CP, Hu S, Sheng W, Lokensgard JR 2006. Microglial cells initiate vigorous yet non-protective immune responses during HSV-1 brain infection. *Virus research*, 121, 1-10.
- Martinez-Raga J, Marshall EJ, Keaney F, Best D, Ball D, Strang J 2001. Hepatitis B and C in alcohol-dependent patients admitted to a UK alcohol inpatient treatment unit. *Addiction biology*, 6, 363-372.
- Martinez J, Tuschl T 2004. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev*, 18, 975-980.
- Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD 2005. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*, 123, 607-620.
- McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, Huang Z, Salazar FH, Xu H, Wieland SF, Marion PL, Kay MA 2003. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol*, 21, 639-644.
- McGeoch DJ, Dolan A, Ralph AC 2000. Toward a comprehensive phylogeny for mammalian and avian herpesviruses. *J Virol*, 74, 10401-10406.
- McGeoch DJ, Rixon FJ, Davison AJ 2006. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus research*, 117, 90-104.
- McLean JH, Shipley MT, Bernstein DI, Corbett D 1993. Selective lesions of neural pathways following viral inoculation of the olfactory bulb. *Experimental neurology*, 122, 209-222.

Meister G, Tuschl T 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431, 343-349.

Mello CC, Conte D, Jr. 2004. Revealing the world of RNA interference. *Nature*, 431, 338-342.

Mello S, Menck C, Andrade L 2013. Estratégias para uso da RNAi em células de mamíferos *in vitro*. In T Pereira, *Introdução à técnica de interferência por RNA - RNAi*, Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP, p. 94-112.

Merkel OM, Librizzi D, Pfestroff A, Schurrat T, Buyens K, Sanders NN, De Smedt SC, Behe M, Kissel T 2009. Stability of siRNA polyplexes from poly(ethylenimine) and poly(ethylenimine)-g-poly(ethylene glycol) under in vivo conditions: effects on pharmacokinetics and biodistribution measured by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy and Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) imaging. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 138, 148-159.

Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H 2009. Herpesvirus assembly: an update. *Virus research*, 143, 222-234.

Miller CS, Danaher RJ, Jacob RJ 1998. Molecular aspects of herpes simplex virus I latency, reactivation, and recurrence. *Crit Rev Oral Biol Med*, 9, 541-562.

Ministério da Saúde [homepage on the Internet]. Brasil: Ministério da Saúde; 2015. Available from: <http://www.aids.gov.br/pagina/dst-no-brasil>.

Miranda MMFS 2002. Viroses dermatópicas. In NSO Santos, Romanos, M.T.V., Wigg, M.D., *Introdução a virologia humana* 1ed., Guanabara Koogan., Rio de Janeiro, p. 75 - 85.

Mitchell BM, Bloom DC, Cohrs RJ, Gilden DH, Kennedy PG 2003. Herpes simplex virus-1 and varicella-zoster virus latency in ganglia. *Journal of neurovirology*, 9, 194-204.

Mole L, Ripich S, Margolis D, Holodniy M 1997. The impact of active herpes simplex virus infection on human immunodeficiency virus load. *J Infect Dis*, 176, 766-770.

Moore CB, Guthrie EH, Huang MT, Taxman DJ 2010a. Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods in molecular biology*, 629, 141-158.

Moore JC, Atze K, Yeung PL, Toro-Ramos AJ, Camarillo C, Thompson K, Ricupero CL, Brenneman MA, Cohen RI, Hart RP 2010b. Efficient, high-throughput transfection of human embryonic stem cells. *Stem cell research & therapy*, 1, 23.

Morrison LA, Knipe DM 1997. Contributions of antibody and T cell subsets to protection elicited by immunization with a replication-defective mutant of herpes simplex virus type 1. *Virology*, 239, 315-326.

Moss NJ, Harper CC, Ahrens K, Scott K, Kao S, Padian N, Raine T, Klausner JD 2007. Predictors of incident herpes simplex virus type 2 infections in young women at risk for unintended pregnancy in San Francisco. *BMC infectious diseases*, 7, 113.

Mossman KL, Sherburne R, Lavery C, Duncan J, Smiley JR 2000. Evidence that herpes simplex virus VP16 is required for viral egress downstream of the initial envelopment event. *J Virol*, 74, 6287-6299.

Mott KR, Bresee CJ, Allen SJ, BenMohamed L, Wechsler SL, Ghiasi H 2009. Level of herpes simplex virus type 1 latency correlates with severity of corneal scarring and exhaustion of CD8+ T cells in trigeminal ganglia of latently infected mice. *J Virol*, 83, 2246-2254.

Mott KR, Gate D, Zandian M, Allen SJ, Rajasagi NK, van Rooijen N, Chen S, Arditi M, Rouse BT, Flavell RA, Town T, Ghiasi H 2011. Macrophage IL-12p70 signaling prevents HSV-1-induced CNS autoimmunity triggered by autoaggressive CD4+ Tregs. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52, 2321-2333.

Murakami M, Ota T, Nukuzuma S, Takegami T 2005. Inhibitory effect of RNAi on Japanese encephalitis virus replication in vitro and in vivo. *Microbiol Immunol*, 49, 1047-1056.

Murray P, Clegg RA, Rees HH, Fisher MJ 2008. siRNA-mediated knockdown of a splice variant of the PK-A catalytic subunit gene causes adult-onset paralysis in *C. elegans*. *Gene*, 408, 157-163.

Nadelman CM, Newcomer VD 2000. Herpes simplex virus infections. New treatment approaches make early diagnosis even more important. *Postgraduate medicine*, 107, 189-195, 199-200.

Nahmias AJ, Dowdle WR 1968. Antigenic and biologic differences in herpesvirus hominis. *Progress in medical virology. Fortschritte der medizinischen Virusforschung. Progres en virologie medicale*, 10, 110-159.

Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant cell*, 2, 279-289.

Nicoll JA, Love S, Kinrade E 1993. Distribution of herpes simplex virus DNA in the brains of human long-term survivors of encephalitis. *Neuroscience letters*, 157, 215-218.

Norberg P, Kasubi MJ, Haarr L, Bergstrom T, Liljeqvist JA 2007. Divergence and recombination of clinical herpes simplex virus type 2 isolates. *J Virol*, 81, 13158-13167.

Novina CD, Murray MF, Dykxhoorn DM, Beresford PJ, Riess J, Lee SK, Collman RG, Lieberman J, Shankar P, Sharp PA 2002. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med*, 8, 681-686.

O'Toole JM, Aubert M, Kotsakis A, Blaho JA 2003. Mutation of the protein tyrosine kinase consensus site in the herpes simplex virus 1 alpha22 gene alters ICP22 posttranslational modification. *Virology*, 305, 153-167.

Ogita S, Uefuji H, Morimoto M, Sano H 2004. Application of RNAi to confirm theobromine as the major intermediate for caffeine biosynthesis in coffee plants with potential for construction of decaffeinated varieties. *Plant molecular biology*, 54, 931-941.

Okamura K, Balla S, Martin R, Liu N, Lai EC 2008a. Two distinct mechanisms generate endogenous siRNAs from bidirectional transcription in *Drosophila melanogaster*. *Nature structural & molecular biology*, 15, 998.

Okamura K, Chung WJ, Ruby JG, Guo H, Bartel DP, Lai EC 2008b. The *Drosophila* hairpin RNA pathway generates endogenous short interfering RNAs. *Nature*, 453, 803-806.

Orban TI, Izaurralde E 2005. Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA*, 11, 459-469.

Orroth KK, White RG, Korenromp EL, Bakker R, Chagalucha J, Habbema JD, Hayes RJ 2006. Empirical observations underestimate the proportion of human immunodeficiency virus infections attributable to sexually transmitted diseases in the Mwanza and Rakai sexually transmitted disease treatment trials: Simulation results. *Sexually transmitted diseases*, 33, 536-544.

Paladino P, Mossman KL 2009. Mechanisms employed by herpes simplex virus 1 to inhibit the interferon response. *Journal of interferon & cytokine research : the*

official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research, 29, 599-607.

Palliser D, Chowdhury D, Wang QY, Lee SJ, Bronson RT, Knipe DM, Lieberman J 2006. An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection. *Nature*, 439, 89-94.

Pardridge WM 2007. Brain drug development and brain drug targeting. *Pharmaceutical research*, 24, 1729-1732.

Pease JE, Williams TJ 2006. The attraction of chemokines as a target for specific anti-inflammatory therapy. *British journal of pharmacology*, 147 Suppl 1, S212-221.

Pellet PE, Roizman B 2013. Herpesviridae. In K D.M., H R.M., *Fields virology*. 6th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia - Pennsylvania, p. 2479–2499.

Pena KC, Adelson ME, Mordechai E, Blaho JA 2010. Genital herpes simplex virus type 1 in women: detection in cervicovaginal specimens from gynecological practices in the United States. *Journal of clinical microbiology*, 48, 150-153.

Peng Y, Lu JX, Shen XF 2007. shRNA driven by Pol II/T7 dual-promoter system effectively induce cell-specific RNA interference in mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 360, 496-500.

Perez AP, Mundina-Weilenmann C, Romero EL, Morilla MJ 2012. Increased brain radioactivity by intranasal P-labeled siRNA dendriplexes within in situ-forming mucoadhesive gels. *International journal of nanomedicine*, 7, 1373-1385.

Peng GC, Jones C 2010. Towards an understanding of the herpes simplex virus type 1 latency-reactivation cycle. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 2010, 262415.

Perse AS, Freitas JL, de Paula VS 2014. RNA interference inhibits herpes simplex virus type 1 isolated from saliva samples and mucocutaneous lesions. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*.

Peters L, Meister G 2007. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Molecular cell*, 26, 611-623.

Phelan DF, Gange SJ, Ahdieh-Grant L, Mehta SH, Kirk GD, Shah K, Gravitt P 2009. Determinants of newly detected human papillomavirus infection in HIV-infected and HIV-uninfected injection drug using women. *Sexually transmitted diseases*, 36, 149-156.

Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, Bertrand E, Filipowicz W 2005. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*, 309, 1573-1576.

Prestage G, Van de Ven P, Mao L, Grulich A, Kippax S, Kaldor J 2005. Contexts for last occasions of unprotected anal intercourse among HIV-negative gay men in Sydney: the health in men cohort. *AIDS care*, 17, 23-32.

Preston CM 2000. Repression of viral transcription during herpes simplex virus latency. *J Gen Virol*, 81, 1-19.

Pruijn GJ 2006. The RNA interference pathway: a new target for autoimmunity. *Arthritis research & therapy*, 8, 110.

Pulford B, Reim N, Bell A, Veatch J, Forster G, Bender H, Meyerett C, Hafeman S, Michel B, Johnson T, Wyckoff AC, Miele G, Julius C, Kranich J, Schenkel A, Dow S, Zabel MD 2010. Liposome-siRNA-peptide complexes cross the blood-brain barrier and significantly decrease PrP on neuronal cells and PrP in infected cell cultures. *PloS one*, 5, e11085.

Qian S, Zhong X, Yu L, Ding B, de Haan P, Boris-Lawrie K 2009. HIV-1 Tat RNA silencing suppressor activity is conserved across kingdoms and counteracts translational repression of HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 605-610.

Qin XF, An DS, Chen IS, Baltimore D 2003. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 183-188.

Rabenau HF, Buxbaum S, Preiser W, Weber B, Doerr HW 2002. Seroprevalence of herpes simplex virus types 1 and type 2 in the Frankfurt am Main area, Germany. *Medical microbiology and immunology*, 190, 153-160.

Rana TM 2007. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 23-36.

Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X 2005. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*, 123, 621-629.

Randall G, Grakoui A, Rice CM 2003. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 235-240.

Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J 2009. siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev*, 61, 746-759.

- Reischl D, Zimmer A 2009. Drug delivery of siRNA therapeutics: potentials and limits of nanosystems. *Nanomedicine*, 5, 8-20.
- Remeijer L, Osterhaus A, Verjans G 2004. Human herpes simplex virus keratitis: the pathogenesis revisited. *Ocular immunology and inflammation*, 12, 255-285.
- Reske A, Pollara G, Krummenacher C, Chain BM, Katz DR 2007. Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Reviews in medical virology*, 17, 205-215.
- Riera-Mestre A, Gubieras L, Martinez-Yelamos S, Cabellos C, Fernandez-Viladrich P 2009. Adult herpes simplex encephalitis: fifteen years' experience. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 27, 143-147.
- Roberts MS, Boundy A, O'Hare P, Pizzorno MC, Ciufo DM, Hayward GS 1988. Direct correlation between a negative autoregulatory response element at the cap site of the herpes simplex virus type 1 IE175 (alpha 4) promoter and a specific binding site for the IE175 (ICP4) protein. *J Virol*, 62, 4307-4320.
- Rodrigues J, Grinsztejn B, Bastos FI, Velasque L, Luz PM, de Souza CT, Georg I, Pilotto JH, Veloso VG 2009. Seroprevalence and factors associated with herpes simplex virus type 2 among HIV-negative high-risk men who have sex with men from Rio de Janeiro, Brazil: a cross-sectional study. *BMC infectious diseases*, 9, 39.
- Roizman B 1996. The function of herpes simplex virus genes: a primer for genetic engineering of novel vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 11307-11312.
- Roizman B, Knipe DM, Whitley RJ 2007. Herpes Simplex Viruses. In K D.M., H R.M., *Fields virology. 5th ed.*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia - Pennsylvania, p. 2502–2601.
- 2013. Herpes Simplex Viruses. In K D.M., H R.M., *Fields virology. 6th ed.*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia - Pennsylvania, p. 1823–1897.
- Roller DG, Dollery SJ, Doyle JL, Nicola AV 2008. Structure-function analysis of herpes simplex virus glycoprotein B with fusion-from-without activity. *Virology*, 382, 207-216.
- Romano N, Macino G 1992. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular microbiology*, 6, 3343-3353.
- Rose L, Crowley B 2013. Molecular characterization of clinical isolates of herpes simplex virus type 1 collected in a tertiary-care hospital in Dublin, Ireland. *J Med Virol*, 85, 839-844.

Rubbo PA, Tuaille E, Nagot N, Chentoufi AA, Bollore K, Reynes J, Vendrell JP, BenMohamed L, Van De Perre P 2011. HIV-1 infection impairs HSV-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell response by reducing Th1 cytokines and CCR5 ligand secretion. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*, 58, 9-17.

Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Zhang M, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML, Van Parijs L 2003. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nature genetics*, 33, 401-406.

Sabbioni S, Callegari E, Manservigi M, Argnani R, Corallini A, Negrini M, Manservigi R 2007. Use of herpes simplex virus type 1-based amplicon vector for delivery of small interfering RNA. *Gene Ther*, 14, 459-464.

Sabin A 1938. Progression of different nasally instilled viruses along different nervous pathways in the same host. *Proc Soc Exp Biol Med*, 38, 270 - 275.

Sainz B, Jr., Halford WP 2002. Alpha/Beta interferon and gamma interferon synergize to inhibit the replication of herpes simplex virus type 1. *J Virol*, 76, 11541-11550.

Sancho-Shimizu V, Zhang SY, Abel L, Tardieu M, Rozenberg F, Jouanguy E, Casanova JL 2007. Genetic susceptibility to herpes simplex virus 1 encephalitis in mice and humans. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 7, 495-505.

Sandri-Goldin RM, Mendoza GE 1992. A herpesvirus regulatory protein appears to act post-transcriptionally by affecting mRNA processing. *Genes Dev*, 6, 848-863.

Santel A, Aleku M, Keil O, Endruschat J, Esche V, Fisch G, Dames S, Loffler K, Fechtner M, Arnold W, Giese K, Klippel A, Kaufmann J 2006. A novel siRNA-lipoplex technology for RNA interference in the mouse vascular endothelium. *Gene Ther*, 13, 1222-1234.

Sasaki T, Shiohama A, Minoshima S, Shimizu N 2003. Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome. *Genomics*, 82, 323-330.

Sauerbrei A, Eichhorn U, Hottenrott G, Wutzler P 2000. Virological diagnosis of herpes simplex encephalitis. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 17, 31-36.

Sauerbrei A, Schmitt S, Scheper T, Brandstadt A, Saschenbrecker S, Motz M, Soutschek E, Wutzler P 2011. Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in Thuringia, Germany, 1999 to 2006. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 16.

Schacker T, Ryncarz AJ, Goddard J, Diem K, Shaughnessy M, Corey L 1998. Frequent recovery of HIV-1 from genital herpes simplex virus lesions in HIV-1-infected men. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 280, 61-66.

Schacker T, Zeh J, Hu H, Shaughnessy M, Corey L 2002. Changes in plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA associated with herpes simplex virus reactivation and suppression. *J Infect Dis*, 186, 1718-1725.

Schlachetzki F, Zhang Y, Boado RJ, Pardridge WM 2004. Gene therapy of the brain: the trans-vascular approach. *Neurology*, 62, 1275-1281.

Schleiss MR 2009. Persistent and recurring viral infections: the human herpesviruses. *Current problems in pediatric and adolescent health care*, 39, 7-23.

Schmidt-Chanasit J, Bialonski A, Heinemann P, Ulrich RG, Gunther S, Rabenau HF, Doerr HW 2010. A 12-year molecular survey of clinical herpes simplex virus type 2 isolates demonstrates the circulation of clade A and B strains in Germany. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 48, 208-211.

Schmidt FR 2004. RNA interference detected 20 years ago? *Nat Biotechnol*, 22, 267-268.

Schmutzhard E 2001. Viral infections of the CNS with special emphasis on herpes simplex infections. *J Neurol*, 248, 469-477.

Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology*, 75, 163-189.

Schubert S, Rothe D, Werk D, Grunert HP, Zeichhardt H, Erdmann VA, Kurreck J 2007. Strand-specific silencing of a picornavirus by RNA interference: evidence for the superiority of plus-strand specific siRNAs. *Antiviral research*, 73, 197-205.

Sciubba JJ 2003. Herpes simplex and aphthous ulcerations: presentation, diagnosis and management--an update. *General dentistry*, 51, 510-516.

Sellner J, Dvorak F, Zhou Y, Haas J, Kehm R, Wildemann B, Meyding-Lamade U 2005. Acute and long-term alteration of chemokine mRNA expression after anti-viral and anti-inflammatory treatment in herpes simplex virus encephalitis. *Neuroscience letters*, 374, 197-202.

Sen J, Liu X, Roller R, Knipe DM 2013. Herpes simplex virus US3 tegument protein inhibits Toll-like receptor 2 signaling at or before TRAF6 ubiquitination. *Virology*, 439, 65-73.

Sergerie Y, Boivin G, Gosselin D, Rivest S 2007. Delayed but not early glucocorticoid treatment protects the host during experimental herpes simplex virus encephalitis in mice. *J Infect Dis*, 195, 817-825.

Seth S, Templin MV, Severson G, Baturevych O 2010. A potential therapeutic for pandemic influenza using RNA interference. *Methods in molecular biology*, 623, 397-422.

Sheridan PA, Beck MA 2008. The immune response to herpes simplex virus encephalitis in mice is modulated by dietary vitamin E. *The Journal of nutrition*, 138, 130-137.

Shimeld C, Efstathiou S, Hill T 2001. Tracking the spread of a lacZ-tagged herpes simplex virus type 1 between the eye and the nervous system of the mouse: comparison of primary and recurrent infection. *J Virol*, 75, 5252-5262.

Shimeld C, Whiteland JL, Williams NA, Easty DL, Hill TJ 1997. Cytokine production in the nervous system of mice during acute and latent infection with herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol*, 78 (Pt 12), 3317-3325.

Shlomai A, Shaul Y 2003. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology*, 37, 764-770.

Shrey K, Suchit A, Nishant M, Vibha R 2009. RNA interference: emerging diagnostics and therapeutics tool. *Biochemical and biophysical research communications*, 386, 273-277.

Shukla D, Spear PG 2001. Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. *The Journal of clinical investigation*, 108, 503-510.

Silva Junior Ade J, de Campos-Buzzi F, Romanos MT, Wagner TM, Guimaraes AF, Filho VC, Batista R 2013. Chemical composition and antinociceptive, anti-inflammatory and antiviral activities of *Gallesia gorazema* (Phytolaccaceae), a potential candidate for novel anti-herpetic phytomedicines. *Journal of ethnopharmacology*, 150, 595-600.

Simmons A 2002. Clinical manifestations and treatment considerations of herpes simplex virus infection. *J Infect Dis*, 186 Suppl 1, S71-77.

Singh NK, Meshram CD, Sonwane AA, Dahiya SS, Pawar SS, Chaturvedi VK, Saini M, Singh RP, Gupta PK 2014. Protection of mice against lethal rabies virus challenge using short interfering RNAs (siRNAs) delivered through lentiviral vector. *Molecular biotechnology*, 56, 91-101.

- Siolas D, Lerner C, Burchard J, Ge W, Linsley PS, Paddison PJ, Hannon GJ, Cleary MA 2005. Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat Biotechnol*, 23, 227-231.
- Sioud M, Leirdal M 2004. Potential design rules and enzymatic synthesis of siRNAs. *Methods in molecular biology*, 252, 457-469.
- Skapenko A, Leipe J, Niesner U, Devriendt K, Beetz R, Radbruch A, Kalden JR, Lipsky PE, Schulze-Koops H 2004. GATA-3 in human T cell helper type 2 development. *The Journal of experimental medicine*, 199, 423-428.
- Slavin HB, Berry GP 1943. Studies on Herpetic Infection in Mice : li. The Pathways of Invasion of the Central Nervous System after Intranasal Instillation of Virus in Suckling Mice. *The Journal of experimental medicine*, 78, 315-320.
- Sledz CA, Williams BR 2005. RNA interference in biology and disease. *Blood*, 106, 787-794.
- Smith CA, Bates P, Rivera-Gonzalez R, Gu B, DeLuca NA 1993. ICP4, the major transcriptional regulatory protein of herpes simplex virus type 1, forms a tripartite complex with TATA-binding protein and TFIIIB. *J Virol*, 67, 4676-4687.
- Sonntag KC 2010. MicroRNAs and deregulated gene expression networks in neurodegeneration. *Brain Res*, 1338, 48-57.
- Souret FF, Kastenmayer JP, Green PJ 2004. AtXRN4 degrades mRNA in Arabidopsis and its substrates include selected miRNA targets. *Mol Cell*, 15, 173-183.
- Souza PM, Holland EJ, Huang AJ 2003. Bilateral herpetic keratoconjunctivitis. *Ophthalmology*, 110, 493-496.
- Spear PG, Manoj S, Yoon M, Jogger CR, Zago A, Myscowski D 2006. Different receptors binding to distinct interfaces on herpes simplex virus gD can trigger events leading to cell fusion and viral entry. *Virology*, 344, 17-24.
- Stahl JP, Mailles A, Dacheux L, Morand P 2011. Epidemiology of viral encephalitis in 2011. *Medecine et maladies infectieuses*, 41, 453-464.
- Steiner I, Kennedy PG, Pachner AR 2007. The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster. *Lancet Neurol*, 6, 1015-1028.
- Stephenson ML, Zamecnik PC 1978. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75, 285-288.

Stock AT, Jones CM, Heath WR, Carbone FR 2011. Rapid recruitment and activation of CD8+ T cells after herpes simplex virus type 1 skin infection. *Immunology and cell biology*, 89, 143-148.

Stock C, Guillen-Grima F, de Mendoza JH, Marin-Fernandez B, Aguinaga-Ontoso I, Kramer A 2001. Risk factors of herpes simplex type 1 (HSV-1) infection and lifestyle factors associated with HSV-1 manifestations. *European journal of epidemiology*, 17, 885-890.

Strang BL, Stow ND 2005. Circularization of the herpes simplex virus type 1 genome upon lytic infection. *J Virol*, 79, 12487-12494.

Suresh PS, Tullo AB 1999. Herpes simplex keratitis. *Indian journal of ophthalmology*, 47, 155-165.

Taft RJ, Kaplan CD, Simons C, Mattick JS 2009. Evolution, biogenesis and function of promoter-associated RNAs. *Cell cycle*, 8, 2332-2338.

Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y 2009. Nonviral vector-mediated RNA interference: its gene silencing characteristics and important factors to achieve RNAi-based gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 61, 760-766.

Takigawa Y, Nagano-Fujii M, Deng L, Hidajat R, Tanaka M, Mizuta H, Hotta H 2004. Suppression of hepatitis C virus replicon by RNA interference directed against the NS3 and NS5B regions of the viral genome. *Microbiol Immunol*, 48, 591-598.

Tam OH, Aravin AA, Stein P, Girard A, Murchison EP, Cheloufi S, Hodges E, Anger M, Sachidanandam R, Schultz RM, Hannon GJ 2008. Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature*, 453, 534-538.

Tan DT, Anshu A, Mehta JS 2009. Paradigm shifts in corneal transplantation. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, 38, 332-338.

Tan EL, Wong AP, Poh CL 2010. Development of potential antiviral strategy against coxsackievirus B4. *Virus research*, 150, 85-92.

Tan SL, Katze MG 2000. HSV.com: maneuvering the internetworks of viral neuropathogenesis and evasion of the host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5684-5686.

Tchurikov NA, Kretova OV 2007. Suffix-specific RNAi leads to silencing of F element in *Drosophila melanogaster*. *PLoS one*, 2, e476.

- Tenllado F, Martinez-Garcia B, Vargas M, Diaz-Ruiz JR 2003. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. *BMC biotechnology*, 3, 3.
- Thompson RW, Jr., Price MO, Bowers PJ, Price FW, Jr. 2003. Long-term graft survival after penetrating keratoplasty. *Ophthalmology*, 110, 1396-1402.
- Timmons L, Fire A 1998. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, 395, 854.
- Tokatlian T, Segura T 2010. siRNA applications in nanomedicine. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, 2, 305-315.
- Tomari Y, Matranga C, Haley B, Martinez N, Zamore PD 2004. A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science*, 306, 1377-1380.
- Tomari Y, Zamore PD 2005. Perspective: machines for RNAi. *Genes & development*, 19, 517-529.
- Tomlinson AH, Esiri MM 1983. Herpes simplex encephalitis. Immunohistological demonstration of spread of virus via olfactory pathways in mice. *Journal of the neurological sciences*, 60, 473-484.
- Townsend JJ 1981a. The demyelinating effect of corneal HSV infections in normal and nude (athymic) mice. *J Neurol Sci*, 50, 435-441.
- 1981b. The relationship of astrocytes and macrophages to CNS demyelination after experimental herpes simplex virus infection. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 40, 369-379.
- 1985. Macrophage response to herpes simplex encephalitis in immune competent and T cell-deficient mice. *Journal of neuroimmunology*, 7, 195-206.
- Townsend JJ, Baringer JR 1979. Morphology of central nervous system disease in immunosuppressed mice after peripheral herpes simplex virus inoculation. Trigeminal root entry zone. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 40, 178-182.
- Tronstein E, Johnston C, Huang ML, Selke S, Magaret A, Warren T, Corey L, Wald A 2011. Genital shedding of herpes simplex virus among symptomatic and asymptomatic persons with HSV-2 infection. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 305, 1441-1449.
- Tufekci KU, Oner MG, Genc S, Genc K 2011. MicroRNAs and Multiple Sclerosis. *Autoimmune Dis*, 2011, 807426.

Turner PV, Brabb T, Pekow C, Vasbinder MA 2011. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 50, 600-613.

Ursic-Bedoya R, Mire CE, Robbins M, Geisbert JB, Judge A, Maclachlan I, Geisbert TW 2013. Protection Against Lethal Marburg Virus Infection Mediated by Lipid Encapsulated Small Interfering RNA. *J Infect Dis*.

Vagin VV, Sigova A, Li C, Seitz H, Gvozdev V, Zamore PD 2006. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science*, 313, 320-324.

van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR 1990. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *The Plant cell*, 2, 291-299.

van Lint A, Ayers M, Brooks AG, Coles RM, Heath WR, Carbone FR 2004. Herpes simplex virus-specific CD8+ T cells can clear established lytic infections from skin and nerves and can partially limit the early spread of virus after cutaneous inoculation. *Journal of immunology*, 172, 392-397.

Van Sant C, Lopez P, Advani SJ, Roizman B 2001. Role of cyclin D3 in the biology of herpes simplex virus 1 ICPO. *J Virol*, 75, 1888-1898.

Vanitharani R, Chellappan P, Fauquet CM 2003. Short interfering RNA-mediated interference of gene expression and viral DNA accumulation in cultured plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 9632-9636.

Vilela MC, Campos RD, Mansur DS, Rodrigues DH, Lacerda-Queiroz N, Lima GK, Rachid MA, Kroon EG, Campos MA, Teixeira AL 2011. Role of IL-4 in an experimental model of encephalitis induced by intracranial inoculation of herpes simplex virus-1 (HSV-1). *Arquivos de neuro-psiquiatria*, 69, 237-241.

Vilela MC, Lima GK, Rodrigues DH, Lacerda-Queiroz N, Mansur DS, de Miranda AS, Rachid MA, Kroon EG, Vieira LQ, Campos MA, Teixeira MM, Teixeira AL 2010. TNFR1 plays a critical role in the control of severe HSV-1 encephalitis. *Neuroscience letters*, 479, 58-62.

Vilela MC, Mansur DS, Lacerda-Queiroz N, Rodrigues DH, Arantes RM, Kroon EG, Campos MA, Teixeira MM, Teixeira AL 2008. Traffic of leukocytes in the central nervous system is associated with chemokine up-regulation in a severe model of herpes simplex encephalitis: an intravital microscopy study. *Neuroscience letters*, 445, 18-22.

Vilela MC, Mansur DS, Lacerda-Queiroz N, Rodrigues DH, Lima GK, Arantes RM, Kroon EG, da Silva Campos MA, Teixeira MM, Teixeira AL 2009. The chemokine CCL5 is essential for leukocyte recruitment in a model of severe Herpes simplex encephalitis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1153, 256-263.

Vollstedt S, Arnold S, Schwerdel C, Franchini M, Alber G, Di Santo JP, Ackermann M, Suter M 2004. Interplay between alpha/beta and gamma interferons with B, T, and natural killer cells in the defense against herpes simplex virus type 1. *J Virol*, 78, 3846-3850.

Wakisaka H, Hato N, Honda N, Takahashi H, Kisaki H, Murakami S, Gyo K, Mominoki K, Kobayashi N, Matsuda S 2002. Demyelination associated with HSV-1-induced facial paralysis. *Experimental neurology*, 178, 68-79.

Wald A, Corey L, Handsfield HH, Holmes KK 1993. Influence of HIV infection on manifestations and natural history of other sexually transmitted diseases. *Annual review of public health*, 14, 19-42.

Wald A, Link K 2002. Risk of human immunodeficiency virus infection in herpes simplex virus type 2-seropositive persons: a meta-analysis. *J Infect Dis*, 185, 45-52.

Wald A, Zeh J, Selke S, Ashley RL, Corey L 1995. Virologic characteristics of subclinical and symptomatic genital herpes infections. *The New England journal of medicine*, 333, 770-775.

Wang Y, Kato N, Jazag A, Dharel N, Otsuka M, Taniguchi H, Kawabe T, Omata M 2006. Hepatitis C virus core protein is a potent inhibitor of RNA silencing-based antiviral response. *Gastroenterology*, 130, 883-892.

Wang YY, Li Z, Jiao D, Zhang Z, Shao X, Yuan J, Yu P 2010. RNA interference reveals a requirement for both p18INK4c and p27Kip1 in B lymphopoiesis. *Journal of molecular cell biology*, 2, 209-216.

Watanabe T, Takeda A, Tsukiyama T, Mise K, Okuno T, Sasaki H, Minami N, Imai H 2006. Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes & development*, 20, 1732-1743.

Weinberg MS, Arbuthnot P 2010. Progress in the use of RNA interference as a therapy for chronic hepatitis B virus infection. *Genome Med*, 2, 28.

Weir JP 2001. Regulation of herpes simplex virus gene expression. *Gene*, 271, 117-130.

Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang MB, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG, Waterhouse PM 2001. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 27, 581-590.

Wheeler LA 2014. Silencing sexually transmitted infections: topical siRNA-based interventions for the prevention of HIV and HSV. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, 2014, 125087.

Whitley RJ 1986. Neonatal herpes simplex virus infections. Presentation and management. *The Journal of reproductive medicine*, 31, 426-432.

—— 2006. Herpes simplex encephalitis: adolescents and adults. *Antiviral research*, 71, 141-148.

Whitley RJ, Kimberlin DW, Roizman B 1998. Herpes simplex viruses. *Clin Infect Dis*, 26, 541-553; quiz 554-545.

Whitley RJ, Roizman B 2001. Herpes simplex virus infections. *Lancet*, 357, 1513-1518.

Wilson SS, Fakioglu E, Herold BC 2009. Novel approaches in fighting herpes simplex virus infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 7, 559-568.

Wu CJ, Huang HW, Liu CY, Hong CF, Chan YL 2005. Inhibition of SARS-CoV replication by siRNA. *Antiviral research*, 65, 45-48.

Wu SY, McMillan NA 2009. Lipidic systems for in vivo siRNA delivery. *The AAPS journal*, 11, 639-652.

Wu Z, Yang F, Zhao R, Zhao L, Guo D, Jin Q 2009. Identification of small interfering RNAs which inhibit the replication of several Enterovirus 71 strains in China. *Journal of virological methods*, 159, 233-238.

Wuest TR, Carr DJ 2008. The role of chemokines during herpes simplex virus-1 infection. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 13, 4862-4872.

Wutzler P, Thust R 2001. Genetic risks of antiviral nucleoside analogues--a survey. *Antiviral research*, 49, 55-74.

Xu F, Sternberg MR, Markowitz LE 2010. Men who have sex with men in the United States: demographic and behavioral characteristics and prevalence of HIV and HSV-2 infection: results from National Health and Nutrition Examination Survey 2001-2006. *Sexually transmitted diseases*, 37, 399-405.

- Xu P, Vernooy SY, Guo M, Hay BA 2003. The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Current biology : CB*, 13, 790-795.
- Yagi N, Manabe I, Tottori T, Ishihara A, Ogata F, Kim JH, Nishimura S, Fujiu K, Oishi Y, Itaka K, Kato Y, Yamauchi M, Nagai R 2009. A nanoparticle system specifically designed to deliver short interfering RNA inhibits tumor growth in vivo. *Cancer research*, 69, 6531-6538.
- Yang S, Chen Y, Ahmadie R, Ho EA 2013. Advancements in the field of intravaginal siRNA delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 167, 29-39.
- Yang Y, Jin Y, Liu P, Shi Y, Cao Y, Liu J, Shi Y, Li H, Lin J 2012. RNAi silencing of type V collagen in *Schistosoma japonicum* affects parasite morphology, spawning, and hatching. *Parasitology research*, 111, 1251-1257.
- Yao Y, Wang C, Varshney RR, Wang DA 2009. Antisense makes sense in engineered regenerative medicine. *Pharm Res*, 26, 263-275.
- Yigit E, Batista PJ, Bei Y, Pang KM, Chen CC, Tolia NH, Joshua-Tor L, Mitani S, Simard MJ, Mello CC 2006. Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. *Cell*, 127, 747-757.
- Yin YP, Chen SC, Wang HC, Wei WH, Wang QQ, Liang GJ, Jiang N, Han Y, Chen XS, Wang B 2012. Prevalence and risk factors of HSV-2 infection and HSV-2/HIV coinfection in men who have sex with men in China: a multisite cross-sectional study. *Sexually transmitted diseases*, 39, 354-358.
- Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe Y, Miyagishi M, Maekawa S, Yi L, Kurosaki M, Taira K, Watanabe M, Mizusawa H 2003. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO reports*, 4, 602-608.
- Yoshimizu T, Miroglio A, Ripoché MA, Gabory A, Vernucci M, Riccio A, Colnot S, Godard C, Terris B, Jammes H, Dandolo L 2008. The H19 locus acts in vivo as a tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 12417-12422.
- Zamecnik PC, Stephenson ML 1978. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75, 280-284.
- Zamore PD 2002. Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science*, 296, 1265-1269.

Zanoni I, Foti M, Ricciardi-Castagnoli P, Granucci F 2005. TLR-dependent activation stimuli associated with Th1 responses confer NK cell stimulatory capacity to mouse dendritic cells. *Journal of immunology*, 175, 286-292.

Zhang YQ, Lai W, Li H, Li G 2008. Inhibition of herpes simplex virus type 1 by small interfering RNA. *Clinical and experimental dermatology*, 33, 56-61.

Zhe R, Mei-Ying Z, Kitazato K, Kobayash N, Qin-Chang Z, Pei-Zhuo Z, Zhi-Rong Y, Yi-Fei W 2008. Effect of siRNA on HSV-1 plaque formation and relative expression levels of UL39 mRNA. *Archives of virology*, 153, 1401-1406.

Zhiqiang W, Yaowu Y, Fan Y, Jian Y, Yongfeng H, Lina Z, Jianwei W, Qi J 2010. Effective siRNAs inhibit the replication of novel influenza A (H1N1) virus. *Antiviral research*, 85, 559-561.

Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, Harborth J, Heyes JA, Jeffs LB, John M, Judge AD, Lam K, McClintock K, Nechev LV, Palmer LR, Racie T, Rohl I, Seiffert S, Shanmugam S, Sood V, Soutschek J, Toudjarska I, Wheat AJ, Yaworski E, Zedalis W, Koteliansky V, Manoharan M, Vornlocher HP, MacLachlan I 2006. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*, 441, 111-114.

Zwenger SR 2009. Bogarting that joint might decrease oral HPV among cannabis users. *Current oncology*, 16, 5-7.

9. ANEXOS

9.1. Anexo A - Aprovação do estudo do perfil epidemiológico do grupo de risco de homens que fazem sexo com homens

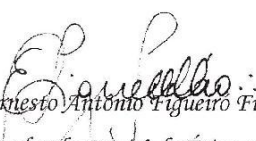


Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa / CEP/UFMS



Carta de Aprovação

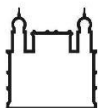
O protocolo nº 1948 CAAE 0039.0.049.000-11 da Pesquisadora Ana Rita Coimbra Motta de Castro intitulado "Aspectos soropidemiológicos e moleculares das infecções pelo vírus das Hepatites B e C e pelo vírus da imunodeficiência humana em homens que fazem sexo com homens em Campo Grande-MS", e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião ordinária no dia 28 de abril de 2011, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.


Prof. Ernesto Antonio Figueiro Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 2 de maio de 2011.

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Rua 15 de Novembro, 1000 - Campo Grande, MS
Fone: (51) 345-7187

9.2. Anexo B - Aprovação da utilização no uso de camundongos BALB/c em modelo experimental de encefalite herpética



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-28/12

Certificamos que o protocolo (P-28/11-6), intitulado "Estudo das Propriedades antivirais de derivados da alga *Dictyota menstrualis* e produtos biotecnológicos em modelo experimental de infecção pelo HSV-1 em camundongo BALB/c", sob a responsabilidade de MARCELO ALVES PINTO, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 19/04/2016 e inclui o uso total de :

Mus musculus

- 120 Machos de BALB/c - BM, Idade: 4 Semana(s).
- 120 Fêmeas de BALB/c - BM, Idade: 4 Semana(s).

Rio de Janeiro, 19 de abril de 2012

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br