

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ  
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

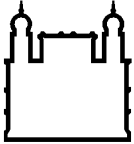
**Diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus da herpes simples  
tipo 1 (HSV-1) e inibição da sua replicação utilizando RNA de  
interferência**

**Amanda Perse da Silva**

Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

Março/2011



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**Amanda Perse da Silva**

**Diagnóstico laboratorial do vírus da herpes simples tipo 1 e  
inibição da replicação do HSV-1 utilizando RNA de interferência**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

**Orientador:** Prof. Dr<sup>a</sup> Vanessa Salete de Paula

**RIO DE JANEIRO**

Março/2011

**Perse, A. S.**

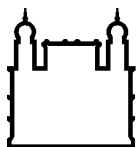
**Diagnóstico laboratorial do vírus da herpes simples tipo 1 e inibição da replicação do HSV-1 utilizando RNA de interferência. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, 2010.**

**100 F / C.**

**Dissertação de Mestrado em Medicina Tropical- Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), 2010.**

**1 –Herpes Simples 2 – Diagnóstico 3 – Silenciamento**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ – Rio de Janeiro/RJ sob orientação da Dr<sup>a</sup> Vanessa Salete de Paula.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**Amanda Perse da Silva**

**Diagnóstico laboratorial do vírus da herpes simples tipo 1 e  
inibição da replicação do HSV-1 utilizando RNA de interferência**

**Orientador(a):** Prof. Dr<sup>a</sup> Vanessa Salete de Paula

**BANCA EXAMINADORA**

Dissertação defendida e aprovada em 02/03, pela comissão julgadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Barreto dos Santos (Presidente e revisora)  
Fundação Oswaldo Cruz/Instituto Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Adilson José de Almeida (Membro)  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro/UNIRIO

Prof<sup>a</sup>. Dr. Tiago Campos Pereira (Membro)  
Universidade de São Paulo

Aos meus pais, Nilma e Valdemir,  
Por sempre acreditarem em mim  
Amo vocês  
Muito obrigada!

## **Agradecimento**

Primeiramente à Deus por sempre iluminar meus caminhos, me mostrando que tudo é possível com fé, perseverança e boa vontade.

À minha querida orientadora Dra. Vanessa Salete de Paula, pelo seu apoio e incentivo, e por sempre me ajudar e apoiar nas minhas “empreitadas”.

Ao Chefe do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LDTV) Dr. Marcelo Alves Pinto pelo suporte e auxílio me dado quando foi preciso.

À minha irmã Thais Perse pelo seu constante apoio, por suportar inúmeras vezes dormir com a luz ligada para que essa dissertação fosse digitada, por aguentar minhas inúmeras reclamações e mau-humor.

Ao Daniel, por ser o melhor namorado do mundo, pelo seu constante apoio, carinho e amor. Por sempre acreditar que tudo seria possível. Obrigada amor, Te amo!

As queridas companheiras e “co-orientadoras” Juliana Lopes e Tamara Fogel, pelas inúmeras explicações e ajuda que me foi me oferecida nesses dois anos. E obrigada também por sempre estarem do meu lado me auxiliando e ouvindo quando mais precisei, não sei se chegaria até aqui sem vocês.

À querida amiga Anna Carolina Mendes que nesses anos se mostrou uma excelente amiga e ótima ouvinte. Obrigada por você ser sempre tão carinhosa e prestativa.

À amiga Rita de Cássia por sempre acreditar em mim, pelo carinho e amizade que sempre me ofereceu, e por sempre estar comigo na alegria e na tristeza, mesmo à distância muitas vezes.

Aos amigos do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LDTV): Luciane, Débora, Gentil, Alexandre, Tatiana, Lilian, Renata, Daniella e Alyne, por serem sempre tão prestativos, pela constante amizade e ajuda oferecida nesses anos.

À técnica do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia Paula Borba Cruz Ferreira, pela constante ajuda com quem pude contar inúmeras vezes para cuidar das minhas células.

À prof<sup>o</sup> Ana Pinto da Universidade Federal Fluminense pela paciência e boa vontade de me ensinar os primeiros passos em cultura celular.

Aos amigos da turma de pós-graduação em Medicina Tropical: Edson Dantas, Rodrigo Cunha, Márcia Gumiel, Riany Silva, Thiago Pavoni e Renata Bortholasse, pela amizade e pelo ambiente tão descontraído durante todo o tempo que passamos juntos.

Aos meus eternos amigos ruralinos por torcerem por mim mesmo à distância.

Ao eterno ciclo: Carla, Ana, Ellen, Aline Pádua e Adriana. Obrigada por todos esses anos de amizade.

À amiga Flávia Valim pelo seu apoio, carinho e respeito me oferecido nesses anos de amizade.

Ao Laboratório de Virologia Comparada por serem sempre tão solícitos e amigos quando mais precisei, em especial, ao Dr. Eduardo Volotão pelos inúmeros ensinamentos e “empréstimos” dados à mim nesses anos.

À Veridina, da equipe de suporte da Applied Biosystems do Brasil pelos inúmeros esclarecimentos realizados e pela paciência.

Aos meus familiares, por sempre acreditarem em mim.

À banca examinadora por aceitar arguir esse trabalho.

À coordenação e a secretaria do programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical (MT) pela oportunidade de participar do programa e a todos os seus funcionários pela boa vontade e disponibilidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante um ano deste projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo prêmio de Bolsista nota 10 e a bolsa concedida no último ano deste projeto.

À todos que diretamente ou indiretamente auxiliaram para essa dissertação.



"O mais importante da vida não é a situação em que estamos, mas a direção para a qual nos movemos."

Oliver Wendell Holmes

"O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada, Caminhando e semeando, no fim terás o que colher."

Cora Coralina

## RESUMO

O vírus do herpes simples é uma importante causa de morbidade, especialmente em pacientes imunossuprimidos. O vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) é um patógeno humano pertencente à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*. O HSV-1 infecta a mucosa oral e provoca a maioria das formas de herpes não genital, embora também possa infectar a mucosa genital em humanos. Os objetivos deste estudo foram otimizar a reação de PCR em tempo real para auxiliar o diagnóstico, detecção e quantificação do HSV-1 em pacientes imunodeprimidos; e avaliar o uso do RNA de interferência (siRNA) para inibir a replicação do vírus HSV-1 *in vitro*, como uma alternativa para terapia antiviral. Para o diagnóstico do HSV-1 foram analisadas 27 amostras de pacientes; amostras de saliva e raspado da lesão (swab) de 6 pacientes com lesões características da infecção pelo HSV-1 e 21 amostras de pacientes infectados com o HSV-1 e HIV (vírus da imunodeficiência humana). Para o estudo do silenciamento do HSV-1, três seqüências específicas de siRNA foram avaliadas (seqüência 1, 2 e 3) como uma estratégia contra o gene UL 39 do HSV-1. Este gene é uma subunidade da ribonucleotídeo redutase, que tem a função de catalisar o passo limitante na síntese do deoxiribonucleotídeos necessários para a síntese de DNA. Nos pacientes infectados com o HSV-1, todas as amostras foram positivas na detecção do HSV-DNA por PCR em tempo real e em 70% destas amostras foi possível o isolamento viral. Entre os pacientes infectados com HIV, 90,48% foram positivas para anti-HSV e a co-infecção HIV/HSV foi detectada em 100% das amostras estudadas por PCR em tempo real. Os resultados mostraram que o PCR em tempo real foi eficiente na detecção e quantificação do HSV-1 em diferentes tipos de amostras, e os níveis de carga viral variaram entre  $10^0$ - $10^4$ . Foi demonstrado que a melhor concentração de siRNA utilizada para inibir o gene UL 39 do HSV-1 foi estabelecido em 10 $\mu$ M através da curva dose-dependentes com as três seqüências inibindo a replicação viral, no entanto a seqüência 1 foi capaz de inibir até 99% da replicação da cepa KOS e da amostra de isolado viral de um paciente infectado com HSV-1. Os resultados demonstraram que o PCR em tempo real fornece resultados rápidos, com excelente sensibilidade e especificidade, e isso é especialmente importante para o diagnóstico em pacientes imunodeprimidos. As seqüências de siRNA analisadas foram eficazes na inibição da replicação do HSV-1 *in vitro*, porém outras investigações sobre os possíveis efeitos benéficos do siRNA *in vivo* são necessários.

## ABSTRACT

The herpes simplex virus is a major cause of morbidity, especially in immunocompromised patients. The herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is a human pathogen belonging to the family *Herpesviridae*, subfamily *Alphaherpesvirinae*. HSV-1 infects the oral mucosa and causes most forms of non-genital herpes, although it can infect the genital mucosa in humans. The objectives of this study were to optimize the real time PCR for the diagnosis, detection and quantification of HSV-1 in immunocompromised patients and to evaluate the use of RNA interference (siRNA) to inhibit HSV-1 *in vitro* replication, as an alternative to antiviral therapy. For the diagnosis of HSV-1 were analyzed 27 patient samples; the saliva samples and swab of 6 patients with lesions characteristic of HSV-1 infection and 21 samples from patients infected with HSV-1 and HIV (human immunodeficiency virus). To study the HSV-1 silencing, three RNA specific sequences were evaluated (sequence 1, 2 and 3) as a strategy against UL 39 gene of HSV-1. This gene is a subunit of ribonucleotide reductase, which functions catalyze the limiting step in the deoxiribonucleotídeos synthesis required for DNA synthesis. In patients HSV-1 infected, all samples were positive by real time PCR, and 70% of these samples were possible by virus isolation. In HIV infected patients, 90.48% were positive for anti-HSV, and co-infection by HIV / HSV was detected in 100% of the samples studied by real time PCR. The results showed that real-time PCR was able to detect and quantify HSV-1 in different types of samples, and viral load levels ranged from  $10^0$  to  $10^4$ . The results of siRNA demonstrated the best concentration used to inhibit UL 39 gene was established by 10 $\mu$ M using and it was dose dependent and the three sequences inhibited of viral replication, but the sequence 1 was able to inhibit up to 99% of replication of the KOS strain and the viral isolate from a patient infected with HSV-1. The results show that the real-time PCR provides rapid results, with excellent sensitivity and specificity, and this is especially important for diagnosis in immunocompromised patients. The siRNA sequences analyzed were effective in inhibiting HSV-1 replication *in vitro*, however further investigations on the possible beneficial effects of siRNA *in vivo* are needed.

## Sumário

Resumo.....	x
Abstract.....	xi
1.1. Histórico.....	1
1.2. Família Herpesviridae .....	1
1.3. Morfologia do HSV-1 .....	2
1.4. Replicação Viral .....	4
1.5. Latência .....	9
1.7 Manifestações clínicas .....	11
1.8 Diagnóstico .....	13
2. RNA de Interferência.....	16
2.1 Silenciamento gênico .....	16
2.2 Mecanismo de ação .....	21
2.3 Entrega dos siRNA.....	23
2.4 Limitações do uso de siRNA .....	25
3. Justificativa .....	28
4. Objetivos: .....	29
4.1 Objetivo Geral .....	29
4.2 Objetivos específicos: .....	29
5. Materias e Métodos.....	30
5.1. Diagnóstico Laboratorial do vírus do HSV-1 .....	30
5.1.1 Amostras estudadas.....	30
5.6 Inibição do ciclo replicativo do HSV-1 utilizando siRNA .....	34
5.6.1 Amostras de cultura celular .....	34
5.6.2 Preparo e titulação do vírus .....	35
5.6.3 Sequências de siRNA .....	35
5.6.4 Transfecção e plaqueamento.....	37
5.6.6 Análise da viabilidade celular após transfecção .....	39

5.6.7	PCR em tempo real.....	39
5.7	Análise estatística.....	41
6.1	Resultados.....	41
6.2	Estudo retrospectivo e prospectivo.....	41
6.3	Inibição do ciclo replicativo do HSV-1 utilizando RNA de interferência.....	43
6.4	Curva Dose Dependente.....	44
6.5	Análise do silenciamento por PCR em tempo real.....	45
6.6	Análise da inibição da replicação por plaqueamento.....	48
6.7	Análise da eficiência do silenciamento gênico em HSV-1 isolado de paciente	51
7	Discussão .....	54
7.1	Diagnóstico do HSV-1 .....	54
8.	Conclusões .....	62
9.	Bibliografia .....	63

## Lista de Figuras

Figura 1. 1: Mapa genético do HSV-1 _____	4
Figura 1. 2: Entrada do HSV-1 na célula hospedeira. _____	5
Figura 1. 3: Fase $\alpha$ da replicação do HSV-1 (Abrantes, 2006) _____	6
Figura 1. 4 : Fase beta da replicação do HSV-1 (Abrantes, 2006). _____	7
Figura 1. 5 : Fase gama da replicação do HSV-1, montagem do nucleocapsídeo viral (Adaptado de Wagner, 2003). _____	7
Figura 1. 6: Esquema representativo da liberação das partículas virais de HSV-1 da célula hospedeira após a replicação viral (Adaptado de Wagner, 2003). _____	8
Figura 1. 7: Latência e reativação do HSV-1 (Adaptado de Wagner, 2003). _____	10
Figura 1. 8: Lesões causadas por HSV-1. Em A e B : lesões mucocutâneas; C : ceratoconjuntivite; e D: encefalite (Fonte: <a href="http://www.sciencephoto.com">http://www.sciencephoto.com</a> e <a href="http://www.google.com.br">http://www.google.com.br</a> ). _____	12
Figura 1. 9 : Mecanismo de ação de algumas drogas antivirais na célula (Adaptado de Morfin, 2003) _____	16
Figura 2. 1: Biogênese do miRNA (Adaptado de Mack, 2007). _____	20
Figura 2. 2 : Esquema representativo das fontes de geração do RNA de interferência (Adaptado de Carthew & Sontheimer, 2009). _____	23
Figura 2. 3: Mecanismo de ação do siRNA ( Adaptado de Aigner et al., 2006a). _____	23
Figura 2. 4: Possíveis alvos de silenciamento do siRNA durante a replicação viral (Adaptado de Colbere-Garapin et al., 2005) _____	28
Figura 6. 1: Percentagem de Células viáveis após transfecção com RNAi. _____	44
Figura 6. 2: Curva dose dependente demonstrando a melhor concentração de siRNAi. _____	45
Figura 6. 3: Silenciamento da replicação do HSV-1 24 h.p.i com sequências de siRNA e controles. _____	46
Figura 6. 4: Silenciamento da replicação do HSV-1 48 h.p.i com sequências siRNA e controles. _____	47
Figura 6. 5: Silenciamento da replicação do HSV-1 72 h.p.i com sequências de si RNA e controles. _____	48
Figura 6. 6: Análise do silenciamento por plaqueamento em células vero transfectadas e infectadas com o HSV-1. Células vero transfectadas com a sequência 1, sequência 2, sequência 3, sequências 1+2, sequências 1+3, sequências 2+3 e sequências 1+2+3, respectivamente e células vero infectada mas não transfectada (CP). _____	50

Figura 6. 7: Título viral (PFU/ml) obtido em células vero pós transfecção com siRNA (CP, controle positivo). * Signifcativo para $p < 0,05$ no teste t de Student ** Não significativo para $p > 0,05$ no teste t student. ....	51
Figura 6. 8: Análise do silenciamento gênico em HSV-1 isolado de paciente por PCR em Tempo Real. CN- controle negativo; CP: controle positivo.....	52
Figura 6. 9 :Comparação do número de unidades formadoras de placas (PFU) observadas na ausência (controle) e presença dos siRNA. * Significativo para $p < 0,05$ no teste t de Student ** Não significativo para $p > 0,05$ no teste t student.....	53
Figura 6. 10: Plaqueamento para análise da inibição da replicação com siRNA. Células vero tranfectadas com a seq.1, seq.2, seq.3 respectivamente e célula vero infectada e não tranfectada (CP).....	53

## Lista de Tabela

Tabela 5. 1: Distribuição dos pacientes infectados com HIV de acordo com o sexo, idade e ano de coleta da amostra. _____	31
Tabela 6. 1: Resultados da detecção de anticorpos contra o HSV-1 e do genoma viral. _	42
Tabela 6. 2: Detecção do HSV-1 pelo isolamento viral e PCR em tempo real nas amostras de mucosa oral e/ou genital. _____	43
Tabela 6. 3: Análise da taxa da inibição da replicação do HSV utilizando RNAi por plaqueamento. _____	49
Tabela 6. 4: Taxa da inibição da replicação do HSV-1 proveniente do paciente positivo (paciente 2 swab) por plaqueamento em células vero. _____	52

## Lista de Quadros

Quadro 1. 2: Função de algumas glicoproteínas do HSV-1 (adaptado de Miranda et al., 2002) _____	3
Quadro 2. 1: Métodos de silenciamento gênico (Adaptado de Tokatlian, 2010) _____	18
Quadro 5. 1: Sequências nucleotídicas dos siRNA específicos utilizados descritas por Zhe et al., 2008. _____	36
Quadro 5. 2: Oligonucleotídeos para a reação de PCR em tempo real (Zhe et al., 2008)	41



## Lista de Siglas e Abreviaturas

**µg** — Microgramas  
**µl** — Microlitro  
**µM** — Micromolar  
**a.c** — Antes de cristo  
**AW1** — Tampão de lavagem 1  
**α-TIF** – Fator indutor de transcrição de proteínas de fase α  
**ACV** – Aciclovir  
**AGO**- Proteínas Argonautas  
**CAP** — Sete-metil-guanosina trifosfato  
**CO<sub>2</sub>** — Dióxido de carbono  
**COCx** - Média dos calibradores  
**C<sub>T</sub>** — “*Threshold cycle*”  
**D.O.** — Densidade ótica  
**DCR** — Enzima DICER  
**DMEM** – Meio mínimo essencial eagle  
**DMSO** - Dimetilsulfóxido  
**DNA** – Ácido desoxirribonucléico  
**dsRNA** — Dupla fita de RNA  
**EBV**- Vírus Epstein-Barr  
**ECP**- Efeito citopático  
**EDTA** — Ácido etilenodiamino tetra-acético  
**ELISA** — Ensaio Imunoenzimático  
**EXP5** — Exportina 5  
**h** — Horas  
**HBV**- Vírus da hepatite B  
**HCl** – Ácido clorídrico  
**HCMV**- Citalomegavírus humano  
**HCV**- Vírus da hepatite C  
**HEPES**-Ácido 2-[4-(2-hidroxiethyl)1-piperazinil]-etanosulfônico  
**HHH**- Herpervírus Humano  
**HIV** - Vírus da imunodeficiência humana  
**HVEM** – Mediador da entrada de herpesvirus  
**HSV-1** – Vírus herpes simples tipo – 1  
**HSV-2** – Vírus herpes simples tipo - 2  
**ICP** – Proteína de célula infectada  
**IgG** — Imunoglobulina G  
**IgM** — Imunoglobulina M  
**ICTV**- Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus  
**IRES** — Sítio interno de ligação ribossomal  
**Kb** — Kilobase  
**Log** — Logaritmo  
**MEM**- Meio mínimo essencial  
**mg** — Miligrama  
**min** — Minutos  
**miRNAs** — Micro RNAs  
**mL** — Mililitro  
**mM** — Milimolar  
**MOI** – Multiplicidade de infecção

**MTT** – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbrometo  
**nmol** - nanomol  
**nM**- Nanomolar  
**NaCl** — Cloreto de sódio  
**NaOH** — Hidróxido de sódio  
**nm** — Nanômetro  
**nt** —Nucleotídeos  
**ODNs** — Oligonucleotídeos antisense  
**OMS** — Organização Mundial de Saúde  
**pb** — Pares de bases  
**PBS** — Tampão fosfato salino  
**PCR** — Reação em cadeia da polimerase  
**PEI** — Polietilamina  
**PFU**- Unidade formadora de placas virais  
**pH** — Potencial hidrogeniônico  
**piRNAs** — Interação de piwi- RNAs  
**PKR** — Proteína quinase R  
**Poli-A** — Poliadenilato  
**PTGS** — Silenciamento gênico pós-transcricional  
**RISC** — Complexo de silenciamento induzido por RNA  
**RNA** — Ácido Ribonucléico  
**RNAi** — RNA de interferência  
**RNAm** — RNA mensageiro  
**RNase** — Ribonuclease  
**RQ** — Quantificação Relativa  
**RPM**- Rotações por minuto  
**PCR** —Reação em cadeia da polimerase  
**SDS** - Dodecilsulfato de sódio  
**SFP** — Soro fetal bovino  
**siRNAs** — Pequenos RNAs de interferência  
**sRNA** — Simples fita de RNA  
**TNF $\alpha$**  — Fator de necrose tumoral alfa  
**TAP** – Transportador associado com o processamento do antígeno  
**TNF** – Fator de necrose tumoral  
**TI** – Índice terapêutico  
**TK** – Timidina cinase  
**UFRJ**- Universidade Federal do Rio de Janeiro  
**Vero** - Células de rim de macaco verde africano  
**VHS** – Proteína de “desligamento” da tradução protéica da célula hospedeira  
**VZV**-Vírus da varicella zoster  
**OCT-1 e OCT-2** – Proteínas reguladoras de transcrição

## 1. Introdução

### 1.1. Histórico

O vírus herpes simplex (simples) tipo 1 (HSV-1), ou herpesvírus humano tipo 1 (HHV-1), foi primeiramente documentado pelo médico grego Hipócrates de Cós (460/377 a.c.), que o denominou de *herpes* (derivado do grego herpein= rastejar, réptil), e descreveu lesões causadas pelo vírus, como vesículas e ulcerações. Todas estas manifestações caracterizavam a doença *Herpes febrilis*, que foi descrita mais tarde por Heródoto (484/425 a.c.) (McGeoch *et al.*, 2006). No entanto, somente no século XX, entre 1920 a 1960, foi demonstrado que os isolados virais infectavam uma imensa gama de hospedeiros, como ratos, camundongos, coelhos, cobaias e macacos (Miranda *et al.*, 2002), também foi demonstrado que este vírus poderia se multiplicar rapidamente em cultura de células fibroblásticas, epiteliais, nervosas e ovos embrionados, levando à lise celular. Em 1968 Nahmias e Dowdle classificaram os herpesvírus no gênero *simplex* e, com base em diferenças imunológicas, epidemiológicas e clínicas, propuseram sua divisão em duas espécies, denominando-as de vírus herpes simplex tipo 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2). Na reunião do ICTV (International Committee for Viruses Taxonomy) (ICTV., 2002) os vírus herpes simplex foram classificados como pertencentes à família *Herpesviridae* e à subfamília *Alphaherpesviridae*, em virtude das características genômicas, sorológicas, ciclo replicativo e latência (Miranda *et al.*, 2002).

### 1.2. Família *Herpesviridae*

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

Oito herpesvírus foram descritas em associação à infecção pelos herpesvírus de mamíferos e por meio da análise filogenética foram classificadas três subfamília alfa herpesvirus, beta herpesvirus e gama herpesvirus (McGeoch *et al.*, 1995). A subfamília *Alpha herpesvirinae* tem como principais características um grande número de hospedeiros, a eficiente e rápida reprodução do ciclo celular, e capacidade de estabelecer infecção latente nos nervos sensoriais (Roizman & Whitley, 2001). Dentre os membros da subfamília *Alpha herpesvirinae* estão o HSV-1, HSV-2 e o vírus da Varicela - zoster (VZV). A subfamília  $\beta$ -*herpesvirinae* tem como principais características serem citomegálicos (aumento das células infectadas), crescimento lento e infecções latentes nas glândulas secretórias e nos rins, nessa subfamília encontramos o citomegalovírus humano (HCMV), herpesvírus humano tipo 6 (HHV-6) e o herpesvírus humano tipo 7 (HHV-7). A subfamília  $\gamma$ -*herpesvirinae* tem como principais características causarem infecções latentes nas células linfóides, nessa subfamília encontramos o vírus Epstein-Barr (EBV) e o herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8) (Gilbert *et al.*, 2002). Apesar do HSV-1 ser classicamente conhecido como causador do herpes labial e o HSV-2 como causador do herpes genital, podemos encontrar infecções por HSV-2 no sítio labial e por HSV-1 no trato genital (Bhattarakosol *et al.*, 2005). O VZV é o causador da catapora em crianças e herpes zoster na reativação da latência. O EBV é associado com a mononucleose infecciosa e com o linfoma de Burkitt. Todas as infecções por herpesvírus humanos, até mesmo aquelas que produzem preferivelmente infecções benignas em indivíduos normais, podem causar doença grave em pacientes imunodeprimidos (Boehmer & Lehman, 1997; Gilbert *et al.*, 2002).

### 1.3. Morfologia do HSV-1

A partícula viral completa do HSV-1 mede cerca de 150 nm (Flakow, 1996) e o seu genoma é formado por uma molécula de DNA dupla fita, linear, com cerca de 150 kb. É constituído por dois componentes que são formados por sequências únicas (U) covalentemente ligadas chamadas L (Long) e S (Short), relacionadas ao tamanho do fragmento genômico, utilizando-se as siglas UL ou US (Sheldrick & Berthelot, 1975; Wadsworth *et al.*, 1975). No genoma viral existem sequências para codificação de cerca de 70 proteínas. Durante a infecção ocorre a

circularização do DNA viral no núcleo da célula hospedeira (Whitley, 1996; Roizman & Sears, 1996).

Uma característica interessante do genoma dos HHVs é o arranjo das sequências. Esses arranjos acabam por dividir o genoma dos herpesvirus em seis grupos designados por letras de A a F (Pellett & Roizman, 2007).

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

**Quadro 1. 1:** Função de algumas glicoproteínas do HSV-1 (adaptado de Miranda *et al.*, 2002)

<b>GLICOPROTEÍNAS</b>	<b>FUNÇÕES</b>
gB	Interação com GAGs, adsorção e Fusão; formação de sincício
gC	Interação com GAGs
gD	Adsorção em receptores diferentes dos GAGs, espalhamento célula-célula; não forma sincício
gE	Receptor para Fc de Imunoglobulinas
gI	Forma complexo com gE; envolvido com o espalhamento pelas junções intercelulares
gH	Forma complexo com gL; está envolvido na fusão do envelope viral com a membrana plasmática
gL	Forma complexo com gH
gK	Envolvido com o transporte do vírion pelo citoplasma

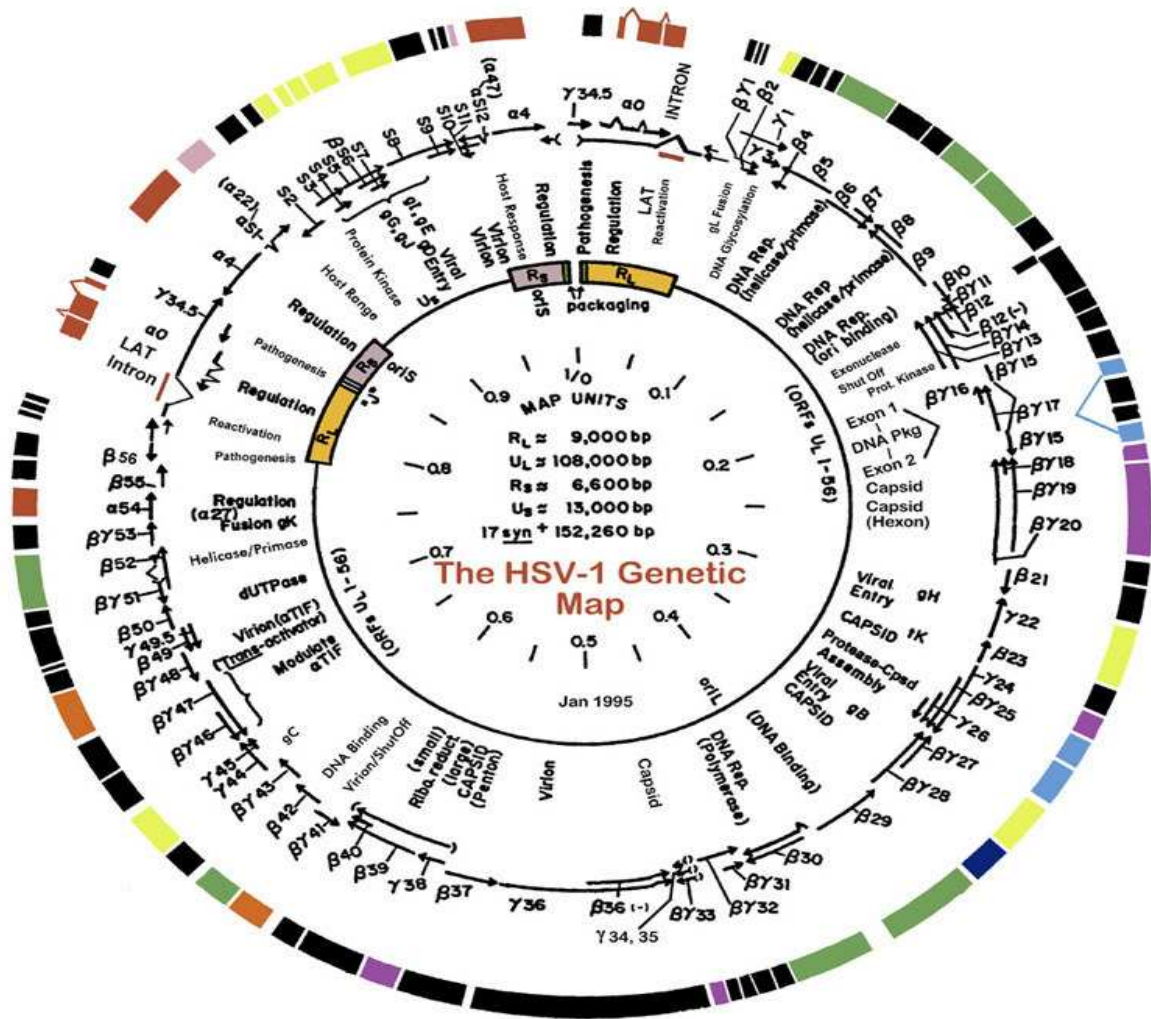
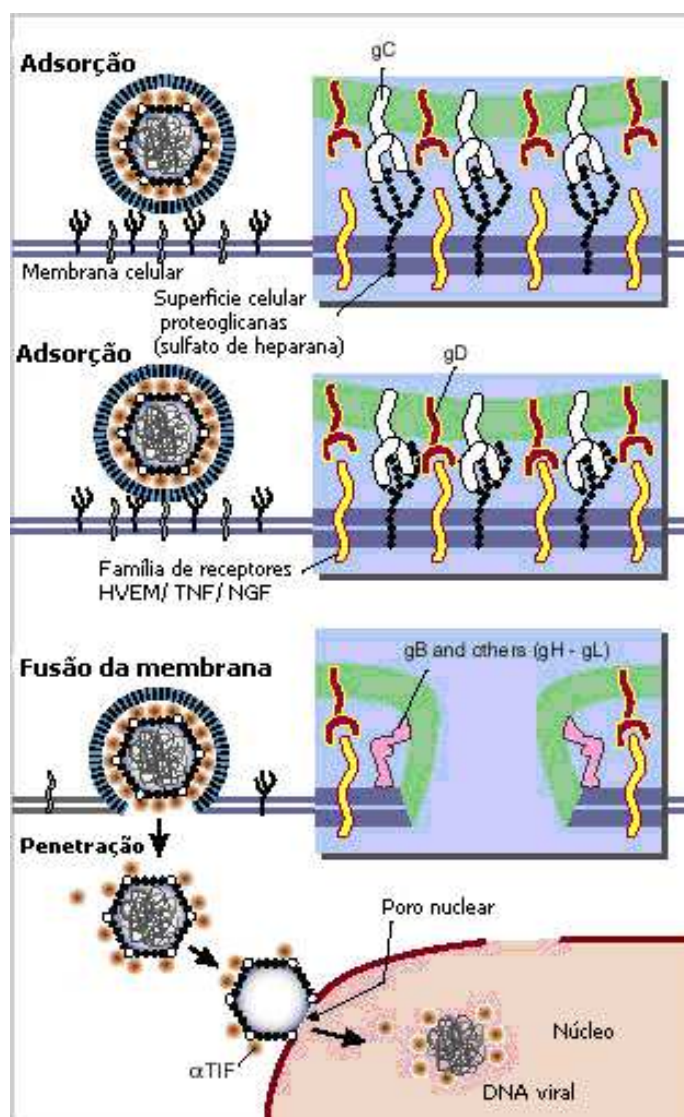


Figura 1. 1: Mapa genético do HSV-1  
(<http://bioinformatica.upf.edu/2003/projectes03/4.5.1/genomas.gif>)

#### 1.4. Replicação Viral

O ciclo de replicação viral começa com a entrada do vírus na célula do hospedeiro mediado por glicoproteínas virais. A primeira etapa da infecção viral inicia-se no momento em que ocorre a adsorção do HSV-1 na célula hospedeira. Nesta etapa, ocorre a interação das glicoproteínas virais gC e gB com proteoglicanos celulares, principalmente com moléculas de heparan sulfato. Após este processo, a glicoproteína gD pode interagir com três tipos distintos de receptores secundários responsáveis pela entrada do vírus na célula hospedeira: o mediador da entrada de herpesvírus (HVEM – Entrada Mediadora dos Herpesvírus), receptores da família do NGF/TNF; os receptores da família da

Nectina -1 e Nectina -2 e membros da superfamília das imunoglobulinas e moléculas de heparan sulfato modificadas em sítios específicos pela ação da enzima 3 – O – sulfotransferase (Spear *et al.*, 2000; Spear & Longnecker, 2003; Spear, 2004; Spear *et al.*, 2006) (Figura 1.2).



**Figura 1. 2:** Entrada do HSV-1 na célula hospedeira.

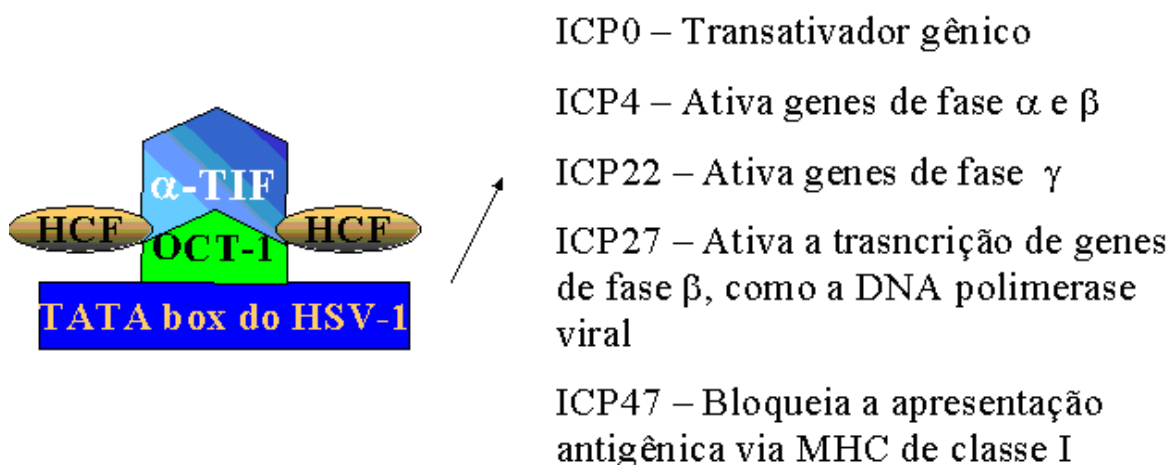
gC- Glicoproteínas C; gD- Glicoproteína D; gB- Glicoproteínas B; HVEM- Entrada mediadora de herpesvírus; TNF- Fator de necrose tumoral; NGF- Fator de crescimento do nervo;  $\alpha$ -TIF- Fator indutor de transcrição de proteínas de fase  $\alpha$  (Adaptado de Wagner, 2003).

O ciclo lítico do HSV-1 envolve a expressão de três conjuntos de genes virais: imediatamente iniciais ou de fase  $\alpha$ , iniciais ou de fase  $\beta$  e fase  $\gamma$  ou tardios (Hancock *et al.*, 2006). A primeira delas (fase  $\alpha$ ), que tem início no momento em que a proteína do tegumento viral  $\alpha$ -TIF, associada aos fatores nucleares OCT-1 e HCF, se liga ao TATA Box no genoma viral, formando o complexo de pré-iniciação

viral. Nesta fase são produzidos cinco genes: gene ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 ou/e ICP47. Os genes ICP4 (Dixon & Schaffer, 1980; Carrozza & DeLuca, 1996) e ICP27 (Sacks *et al.*, 1985; McCarthy *et al.*, 1989) são necessários para o crescimento do vírus em cultura de tecidos.

A proteína ICP4, geralmente, reprime a expressão gênica dos genes imediatamente iniciais (Roberts *et al.*, 1988; Gu & DeLuca, 1994; Carrozza & DeLuca, 1996) e ativa a expressão dos genes E ou L através da interação com fatores da RNA polimerase II (Smith *et al.*, 1993; Gu & DeLuca, 1994). A proteína ICP27 contribui para diminuição de genes celulares através da inibição do processamento do RNAm (Sandri-Goldin & Mendoza, 1992; Lindberg & Kreivi, 2002). A proteína ICP47 impede o transporte de peptídeos antigênicos para o retículo endoplasmático (Hill *et al.*, 1995), sendo crucial para a neurovirulência uma vez que inibe a resposta da célula T do tipo CD8+. A ICP0 atua como um transativador de diversos genes, estimulando a expressão de genes do HSV pertencentes a todas as três classes temporais (fases  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) durante a infecção lítica (Hancock *et al.*, 2006).

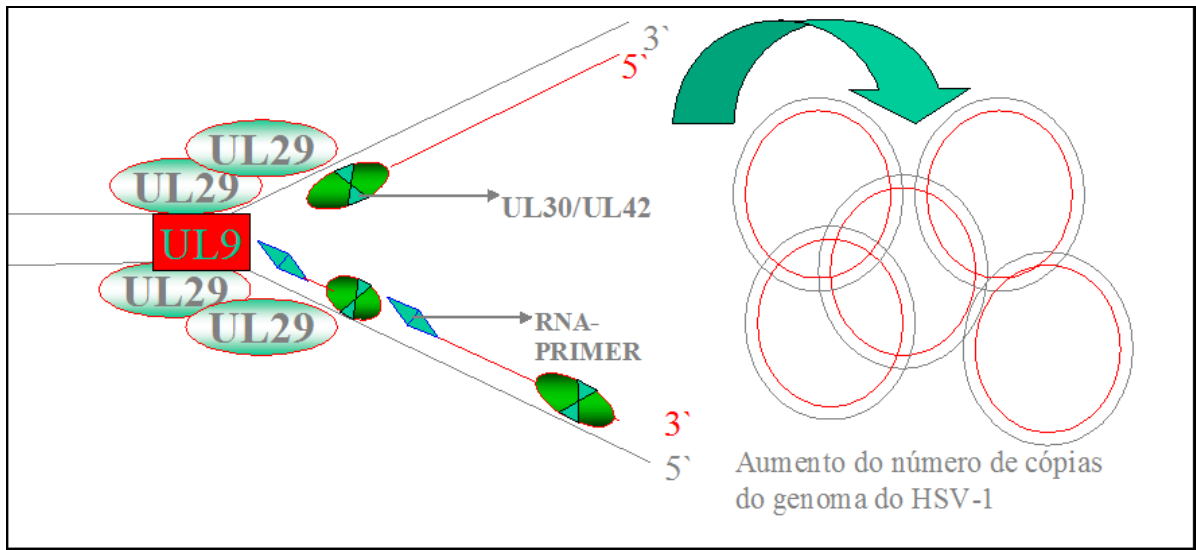
A proteína ICP22 não é essencial para a replicação do HSV-1 em cultura, mas é necessário para uma expressão eficiente de genes de fase  $\alpha$ , assim como um subconjunto de genes da fase  $\gamma$  (O'Toole *et al.*, 2003)(figura 1.3). Na fase  $\beta$  ou fase inicial, as proteínas responsáveis pela replicação do DNA viral e produção de substratos para a síntese de DNA são sintetizadas. Destacam-se a timidina quinase viral (TK) e a DNA polimerase viral (UL30) (Gong *et al.*, 2002)(Figura 1.4).



**Figura 1. 3:** Fase  $\alpha$  da replicação do HSV-1 (Abrantes, 2006)

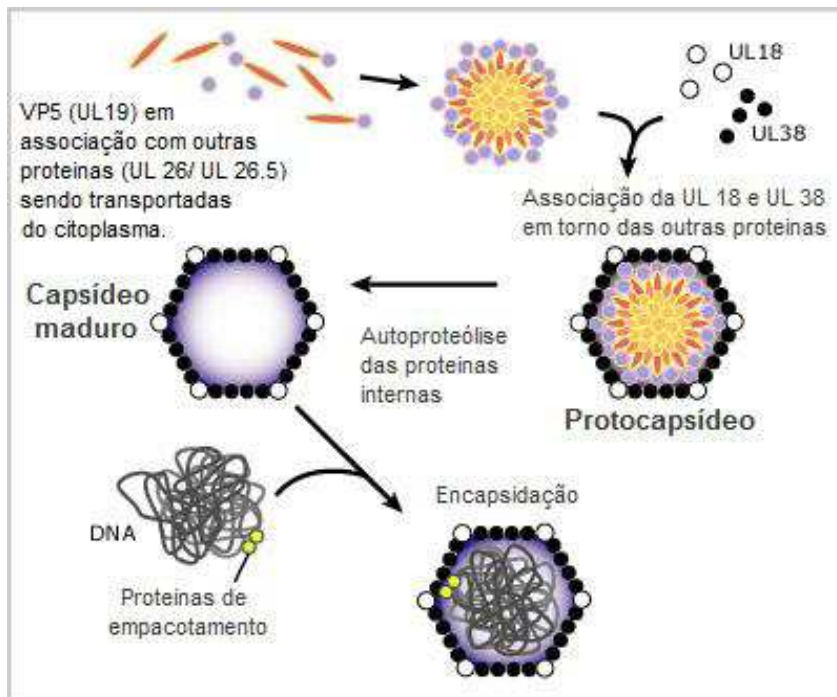


$\alpha$ TIF-Fator indutor de transcrição de proteínas da fase  $\alpha$ ; HCF- Proteína estabilizadora de fator de transcrição; OCT 1- Proteína reguladora da transcrição.



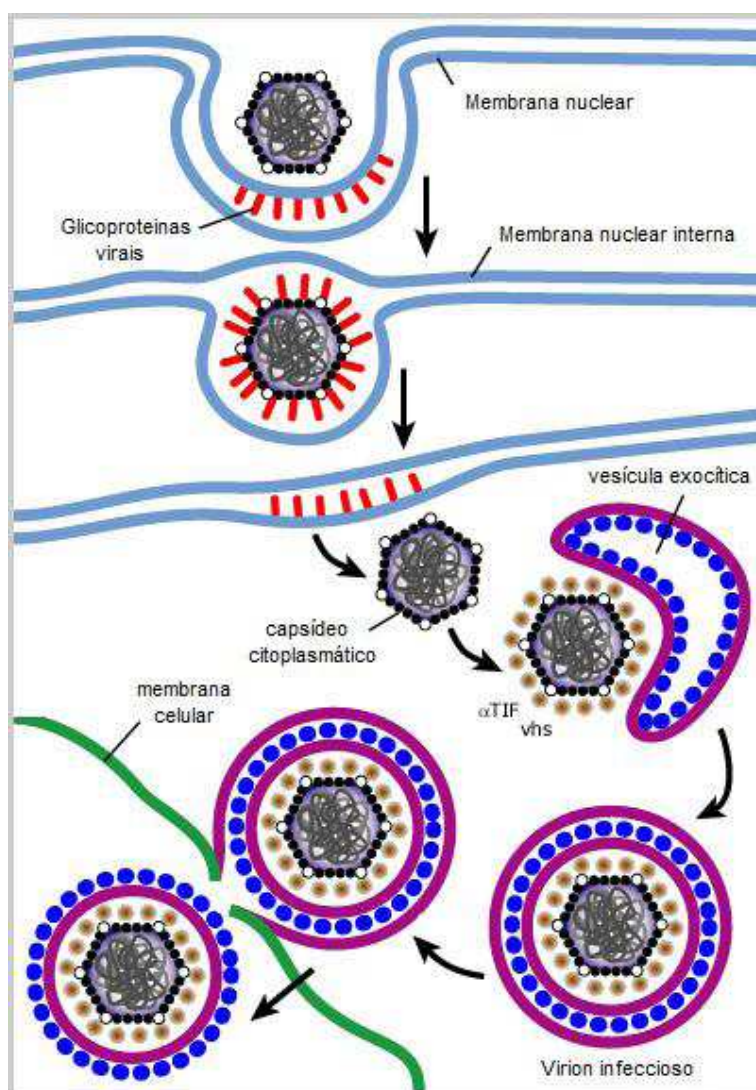
**Figura 1. 4** : Fase beta da replicação do HSV-1 (Abrantes, 2006).

A fase  $\gamma$ , ou tardia, se caracteriza pela produção de proteínas estruturais do vírion, como as presentes no tegumento e no envelope, assim com a montagem da partícula viral (Roizman, 1996, Roizman & Sears, 1996; Whitley, 1996; Boehmer & Lehman, 1997) (Figura 1.5).



**Figura 1. 5** : Fase gama da replicação do HSV-1, montagem do nucleocapsídeo viral (Adaptado de Wagner, 2003).

Após a montagem das partículas no núcleo da célula hospedeira, o nucleocapsídeo viral é envelopado por meio da fusão com a membrana nuclear interna, aumentando o número de vírus envelopados no espaço perinuclear. A posterior fusão do envelope viral com a membrana nuclear externa possibilita que as partículas virais sejam liberadas do núcleo da célula hospedeira, gerando um acúmulo de capsídeos sem envelope no citoplasma. Os capsídeos são re-envelopados por vesículas derivadas do complexo de Golgi. Esta última etapa pode ser mediada por interações entre proteínas do tegumento viral e porções citoplasmáticas de glicoproteínas virais, as quais já estariam inseridas nas vesículas derivadas do complexo de Golgi (Figura 1.6) (Melancon *et al.*, 2004).

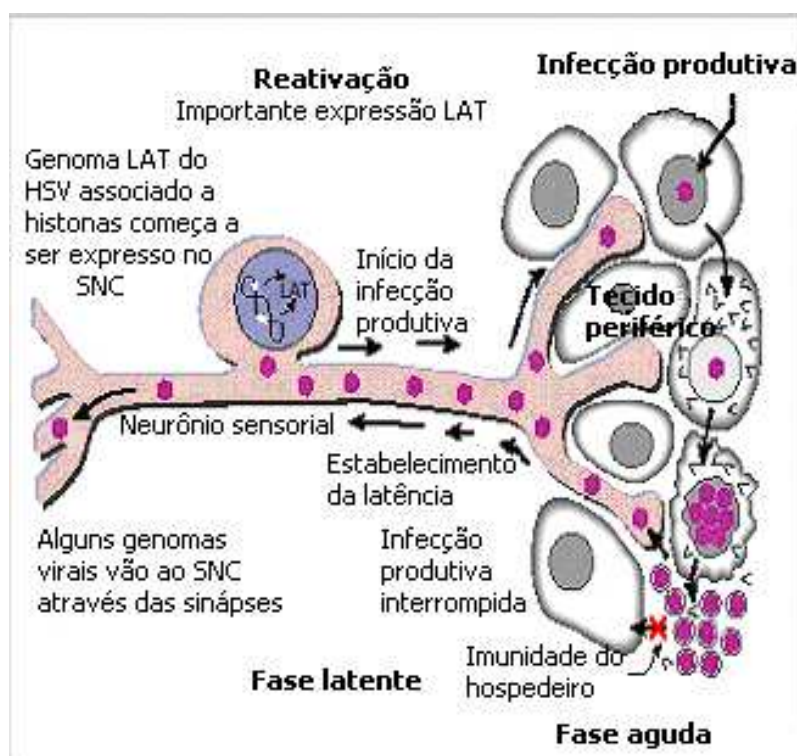


**Figura 1. 6:** Esquema representativo da liberação das partículas virais de HSV-1 da célula hospedeira após a replicação viral (Adaptado de Wagner, 2003).

## 1.5. Latência

A manutenção da latência no hospedeiro infectado com o vírus do HSV-1 é definida como o período que o vírus não é detectado pelo método diagnóstico “padrão-ouro” para HSV que é o isolamento viral (Perng & Jones, 2010). Após a infecção e replicação ativa nas mucosas, o HSV-1 pode alcançar o terminal nervoso. O vírus é conduzido por transporte axonal retrógrado para os corpos das células nervosas, resultando muito freqüentemente em uma infecção latente nestes neurônios (Quinn *et al.*, 2000).

Em geral, nesta infecção ocorre uma abundante expressão de genes virais que não são requeridos na infecção ativa, mas são produzidos na fase de latência conhecidos como transcritos associados a latência (LAT's). A latência do HSV-1 ocorre tipicamente nos gânglios trigêmeos e dorsais, e a reativação da infecção ocorre geralmente por diversos estímulos como stress e imunossupressão, resultando novamente na reativação do vírus latente (Perng & Jones, 2010). Estes vírus, então, retornam pelos axônios, produzindo um novo ciclo de infecção produtiva no sítio da infecção inicial ou próximo deste sítio, podendo resultar no reaparecimento da doença (Quinn *et al.*, 2000; Kimberlin, 2003; Kimberlin & Whitley, 2005). Durante o período de latência o HSV-1 associa-se a histonas, formando um DNA episomal. Além disso, a latência ocorre principalmente no sistema nervoso onde há uma maior expressão do fator nuclear OCT-2 em relação a isoforma OCT-1, que é expressa principalmente em outros tecidos. Na maioria dos tecidos a proteína do tegumento viral  $\alpha$ -TIF interage preferencialmente com a proteína OCT-1. Esta ligação é estabilizada pelo fator HCF proporcionando a formação do complexo de pré-iniciação junto ao TATA Box do genoma do HSV-1, iniciando a transcrição de genes de fase alfa, com consequente infecção produtiva (Preston, 2000) (Figura 1.7).



**Figura 1. 7:** Latência e reativação do HSV-1 (Adaptado de Wagner, 2003).

## 1.6 Epidemiologia

A infecção pelo HHV é prevalente em todo o mundo, sendo que no Brasil a cada ano surgem 640,000 mil casos de herpes genital diagnosticados (Nahmias *et al.*, 1990; Passos., 2002), sendo estas viroses consideradas um problema de saúde pública no território brasileiro (Clemens & Farhat, 2010).

A infecção pelo HSV ocorre geralmente na infância e na adolescência através da exposição oral direta, sendo caracterizado por lesões orolabial ou facial. Estudos recentes têm demonstrado que o HSV-1 tornou-se um importante agente causador da herpes genital em alguns países desenvolvidos (Mertz *et al.*, 2003), além disso, estudos epidemiológicos têm mostrado uma importante interação entre HSV, HIV-1 e HPV (Smith *et al.*, 2002; Celum *et al.*, 2004; Weiss, 2004).

Muitos adultos são infectados com HSV, mas o sorotipo, severidade, sintomas e modo de transmissão variam com a idade. Crianças possuem a infecção primária orolabial por HSV-1 por volta dos 5 anos de idade, com a taxa

de infecção variando entre 33% na população de baixo nível socioeconômico e 20% na população de elevado nível socioeconômico. Em jovens e adultos esta taxa varia entre 70% a 80% na população de baixo nível socioeconômico e 40% a 60% na população de elevado nível socioeconômico (Fatahzadeh & Schwartz, 2007). Globalmente, a prevalência do HSV-1 aumenta consideravelmente com a idade variando entre 40% até os 15 anos de idade e 60% a 90% a partir dos 21 anos (Smith & Robinson, 2002).

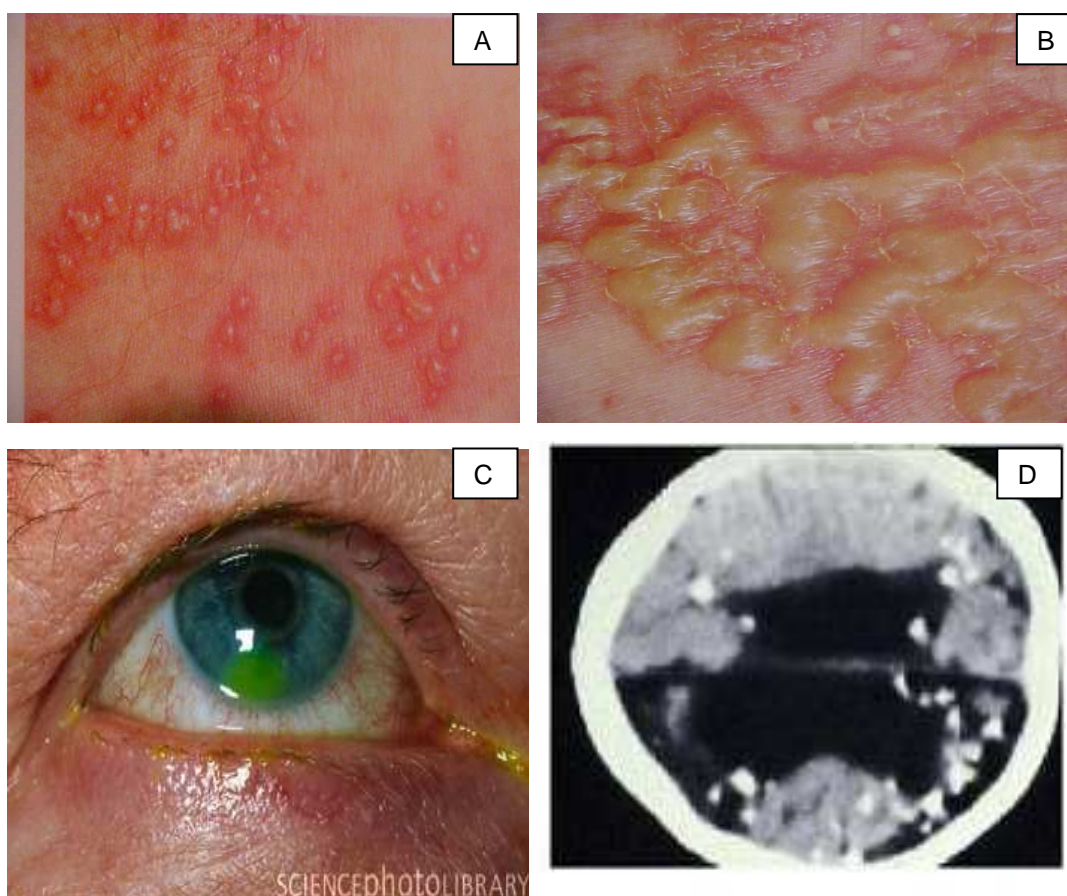
Atualmente acredita-se que 45 milhões de pessoas em todo mundo vivem com HIV e cerca de 75% de pessoas infectadas com o HIV vivem com algum tipo de herpesvirose (Palella *et al.*, 1998; Schwartz, 2004; Springer & Weinberg, 2004; Weiss, 2004; Leidner & Aboulafia, 2005). O aumento da utilização de terapia antiviral aumenta a incidência de infecções oportunistas de doenças causadas por HHVs (Miralles *et al.*, 1998; Clifford *et al.*, 1999; Antinori *et al.*, 2003). Ainda não se sabe se o uso da terapia antiviral para HIV altera a remeergência da habilidade de latência ou a habilidade de produzir manifestações clínicas do HSV-1, porém já se sabe que a infecção do HSV em pacientes co-infectados com HIV aumenta significativamente a gravidade da doença (Wood & Harrington, 2005; Bower *et al.*, 2006).

### **1.7 Manifestações clínicas**

A transmissão do HSV-1 ocorre quando a mucosa ou pele com algum tipo de abrasão entra em contato direto com secreções que contenham o vírus, podendo causar lesões mucocutâneas, encefalite em pacientes imunocomprometidos e neonatos, e ceratoconjutivite (Corey & Spear, 1986; Whitley, 2002; Brady & Bernstein, 2004). A lesão orolabial recorrente causada pelo HSV-1 tem como sinais uma vermelhidão em torno dos lábios e pode ser precedida por “*formigamento*” ou queimação local (Whitley, 2002).

O vírus também é facilmente transmitido pela saliva, podendo ser estável no hospedeiro por curtos períodos de tempo permitindo a transmissão deste pelo contato direto com o vírus. O HSV também pode ser transmitido por meio de gotículas respiratórias ou através da exposição mucocutâneas em indivíduos assintomáticos (Chayavichitsilp *et al.*, 2009). As manifestações clínicas da infecção do vírus do HSV-1 são variáveis e dependem do método de transmissão, idade e

imunocompetência do hospedeiro. A infecção herpética é, geralmente, assintomática ou manifesta-se por meio de conjunto de sinais e sintomas inespecíficos. Muitos dos quadros infecciosos da infância e da adolescência erroneamente atribuídos a outros vírus e infecções bacterianas da orofaringe, são, na verdade, infecções herpéticas. Até 95% dos pacientes expostos primariamente ao HSV não apresentam sintomas clinicamente evidentes suficiente para plena caracterização do quadro da infecção (Lupi *et al.*, 2000). Essa primeira manifestação do herpes simples pode ocorrer em pacientes hígidos que desenvolverão o quadro próprio chamado infecção herpética benigna. O quadro clássico desta infecção é caracterizado por cefaléia, febre, mialgias e adinamia. Em 24 horas surgem pápulas eritomas acompanhadas por dor, ardor e prurido (Lupi *et al.*, 1995) (Figura 1.8) Os quadros de infecção grave ocorrem em pacientes imunodeprimidos, especialmente quando a carga viral é elevada, cursando com manifestações mais graves e duradouras (Schirren *et al.*, 1995)



**Figura 1. 8:** Lesões causadas por HSV-1. Em A e B : lesões mucocutâneas; C : ceratoconjuntivite; e D: encefalite (Fonte: <http://www.sciencephoto.com> e <http://www.google.com.br>).

## 1.8 Diagnóstico

Muitos métodos diagnósticos, atualmente conseguem identificar a infecção pelo HSV, variando desde métodos mais sensíveis e custosos a métodos utilitários e métodos trabalhosos. O principal método clínico atualmente utilizado é o reconhecimento das vesículas características desta virose. As vesículas são agrupadas, eritematosas, apresentando pápulas crostosas e placas em 1 a 3 dias. O mais comum método diagnóstico para a detecção mucocutânea do HSV ou VZV é o isolamento viral, porém o isolamento viral requer que o material seja coletado a fresco com a virose ainda viável (Storch, 2001). O maior problema desta técnica é principalmente o longo tempo para a detecção do vírus, com resultados variando entre 7 a 15 dias (Kimberlin, 2004).

O advento dos testes sorológicos HSV tipo específicos facilitou enormemente a identificação do HSV. Os testes sorológicos inicialmente disponíveis eram baseados em preparações de antígeno bruto, não sendo confiáveis como uma ferramenta de diagnóstico para identificação da infecção com o HSV-1 ou HSV-2 (Ashley *et al.*, 1991). Apesar do alto grau de reatividade sorológica cruzada entre o HSV-1 e o HSV-2, uma glicoproteína do envelope (g), gG, foi identificada como antigenicamente distinta entre as duas viroses (Dolan *et al.*, 1998). Os teste sorológicos gG tipo específicos, portanto, podem diferenciar com precisão infecções por HSV-1 (gG1) ou HSV-2 (gG2) e são cada vez mais utilizados em pesquisas para identificar infecções por HSV-1 e HSV-2 (Leyland *et al.*, 2009). Estes testes sorológico incluem imunofluorescência, imunoblot, western blot e imunoabsorção (ELISA), sendo bastante utilizados para a realização do diagnóstico do HSV-1. Estes testes podem detectar anticorpos anti-HSV-1 e anti-HSV-2 (Wald & Ashley-Morrow, 2002), no entanto, alguns destes ensaios não fornecem resultados altamente quantitativos, e muitos são incapazes de distinguir entre HSV-1 e o HSV-2.

O teste western blot gG é considerado excelente para a detecção do HSV e pode discriminar as infecções entre o HSV-1 e o HSV-2, mas este método é demorado e caro, podendo ser de difícil interpretação (Corey *et al.*, 2004). Outro teste gG menos demorado e que pode discriminar entre as infecções por HSV-1 e o HSV-2 incluem testes de ELISA. No entanto, estes ensaios são menos sensíveis

do que o western blot. Apesar disso, os teste de ELISA tipo - específico são altamente precisos para a diagnóstico sorológico principalmente da infecção pelo HSV-2 em populações onde a prevalência da doença é alta (Mark *et al.*, 2007).

Entretanto, novas técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), estão sendo cada vez mais utilizadas e vêm sendo capazes de detectar pequenas quantidades de genoma viral (Schmutzhard *et al.*, 2004). A nested-PCR é bastante utilizada nos laboratórios atualmente e permite identificar rapidamente a presença do vírus em diferentes tipos de amostras, sendo bastante utilizada principalmente por sua especificidade (Kawada *et al.*, 2004).

Nos últimos anos vêm crescendo a aplicação da PCR em tempo real, no diagnóstico da infecção constituindo-se em técnica de detecção e quantificação de ácidos nucléicos com alta sensibilidade, rapidez e minimização de contaminações. A PCR quantitativa em tempo real é uma técnica precisa e reprodutível porque determina o nível de amplificação durante a fase exponencial da reação, isto evita que qualquer variação mínima na eficiência de amplificação possa produzir dramáticas diferenças na quantificação do produto final, tornando o resultado extremamente confiável (Bustin *et al.*; 2005). A maior vantagem da PCR em tempo real para o diagnóstico do HSV é a análise quantitativa das amostras, isto é particularmente importante principalmente para o diagnóstico e tratamento do HSV e VZV em pacientes transplantados e imunossuprimidos (Schmutzhard *et al.*, 2004).

## 1.9 Prevenção e Tratamento

A prevenção da transmissão é o primeiro passo para o controle da infecção pelo HSV-1. Além disso, algumas precauções para o controle da infecção incluem uso do preservativo ou uso de métodos de barreira durante a relação sexual para a prevenção da infecção pelo HSV em área genital, evitar contato direto e indireto com lesões mucocutâneas em pacientes com a virose em atividade, uso de preservativos ou abstinência sexual em mulheres grávidas soronegativas com parceiros soropositivos para a infecção primária. Além disso, múltiplos fatores como, estresse, exposição ao sol, imunossupressão, febre e traumas podem desencadear a recorrência da infecção pelo HSV (Chayavichitsilp *et al.*, 2009). Dentre as drogas mais estudadas e utilizadas para

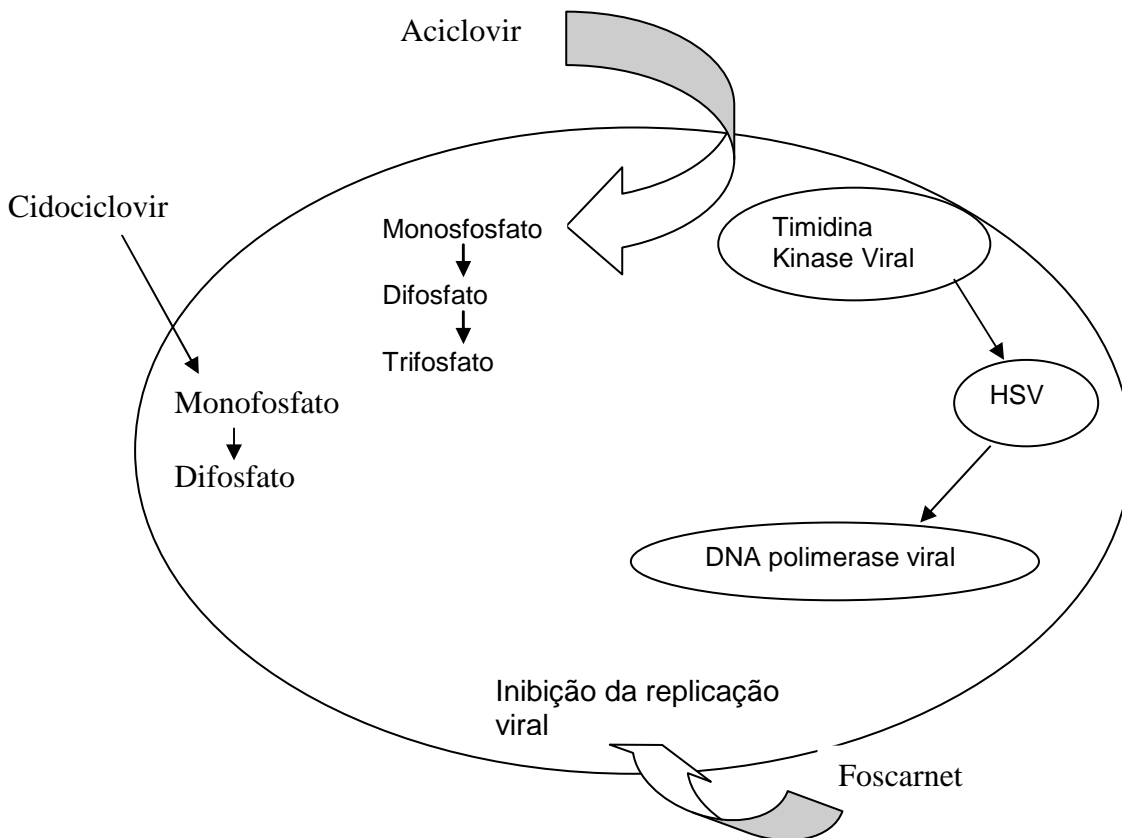


o tratamento contra herpesvírus temos o aciclovir (ACV). No entanto, cepas de HSV-1 resistentes ao ACV vêm sendo descritas, principalmente em pacientes imunocomprometidos, seja decorrente de uma infecção com HIV ou tratamento com corticosteróide após transplante de órgãos (Coen, 1996; Kimberlin & Whitley, 1996). Também têm surgido cepas resistentes em pacientes transplantados (Chayavichitsilp *et al.*, 2009).

A resistência ao aciclovir é associada com a mutação de duas enzimas virais envolvidas no mecanismo de ação do aciclovir, que são a timidina quinase (TK) e a DNA polimerase sendo que, em 95% dos casos essa resistência está associada ao gene da timidina quinase. Cepas resistentes ao aciclovir podem ser tratadas com foscarnet ou cidoclovir, porém, estes são mais tóxicos que o aciclovir (Morfin & Thouvenot, 2003).

O ACV é uma guanina com grupamento ribosil incompleto, isto é, não apresenta os carbonos 2' e 3' com suas respectivas hidroxilas. Em seu mecanismo de ação, o composto é fosforilado pela timidina quinase (TK) viral e, posteriormente, di e trifosforilado por enzimas celulares. O cidociclovir sofre somente duas fosforilações, sendo ativado com a molécula difosfatada atuando nas quinases celulares (De Clercq, 2004).

O foscarnet, um ácido fosfonofórmico, atua principalmente como um análogo de pirofosfato, interagindo diretamente com o sitio de ligação pirofosfato da DNA polimerase. Tem ação principalmente sobre o citomegalovírus em pacientes HIV positivos e em cepas de HSV TK deficientes, que são resistentes ao ACV (De Clercq *et al.*, 2001) (Figura 1.9).



**Figura 1. 9 :** Mecanismo de ação de algumas drogas antivirais na célula (Adaptado de Morfin, 2003)

## 2. RNA de Interferência

### 2.1 Silenciamento gênico

A específica inibição da expressão gênica foi introduzida primeiramente em 1978 através de oligonucleotídeos antisense (ODN) (Stephenson & Zamecnik, 1978; Zamecnik & Stephenson, 1978), a partir da década de 1980 começou a ser melhor explorada esta técnica através do aumento e da estabilidade dos ODNs. Os ODNs são caracterizados estruturalmente por serem de fita simples, com cerca de 18 a 25 pares de bases (pb). Sua ação baseia-se resumidamente no bloqueio da tradução por hibridização ao RNA mensageiro correspondente (Walder *et al.*, 1988; Cook *et al.*, 1993; Baker & Monia, 1999). Com o passar dos tempos houve uma diminuição do entusiasmo com os ODNs antisense (Gleave & Monia, 2005). Isto

ocorreu devido aos resultados não satisfatórios com relação aos ensaios clínicos randomizados, principalmente na fase de avaliação da eficácia (fase II), utilizando ODNs que limitaram sua utilização terapêutica efetiva (Haasnoot *et al.*, 2007b).

A descoberta de RNAs com atividade catalítica (riboenzimas) teve início a partir da década de 1980 (Kruger *et al.*, 1982; Guerrier-Takada *et al.*, 1983) quando se demonstrou que a molécula de RNA, além de transferir a informação genética, pode ter a ação de enzimas independentes das proteínas. Essas funções enzimáticas incluem a quebra de ligações covalentes. O uso terapêutico, no entanto, possui desvantagens, como uma ação ineficaz no tecido alvo / célula-alvo, bem como a sua grande instabilidade (Aigner, 2006a).

No entanto, a técnica de interferência mediada por RNA (RNAi) tem sido utilizada como um potente candidato biológico para a estratégia de silenciamento de genes. O termo “Interferência por RNA” foi primeiramente utilizado no trabalho de Andrew Z. Fire, Craig e colaboradores, publicado na revista científica *Nature*, em 1998 (Fire *et al.*, 1998), os quais identificaram moléculas de RNA dupla fita (dsRNA) como o mediador de silenciamento de genes em *Caenorhabditis elegans*. Buscando silenciar diversos genes no nematóide *C. elegans*, este grupo utilizou RNAs senso e antisenso separadamente e dsRNA, demonstrando que dsRNA tinha uma ação supressora mais potente e específica em detrimento da 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 o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia, em 2006.

Descobriu-se que o mecanismo de interferência mediado por RNA não se restringe a um organismo específico, parece estar presente na maioria dos organismos eucariontes (Aigner, 2006a).

Conceitualmente a RNAi é uma técnica que aproveita-se de um mecanismo biológico pré-existente no organismo: a via de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS), envolvido no sistema de defesa de certos organismos. Desta maneira, RNAs estranhos ao transcriptoma da célula seriam reconhecidos como sinais de perigo ou alerta, sendo identificados e desabilitados (Agrawal *et al.*, 2003).

Atualmente existem diversas classes de pequenos RNAs que não codificam informações gênicas: curto hairpin RNA (shRNA) (Takahashi *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2009), micro RNA (miRNA) (Reischl & Zimmer, 2009) (Takahashi *et al.*, 2009) e o Piwi-RNA (piRNA) (Choudhuri, 2009). O siRNA, que são pequenas moléculas de RNAs com ação de interferência, é o mais comumente utilizado para a RNAi em aplicações terapêuticas (Quadro 2.1).

**Quadro 2. 1:** Métodos de silenciamento gênico (Adaptado de Tokatlian, 2010)

<b>Mecanismo de silenciamento</b>	<b>Descrição</b>	<b>Referência</b>
ODNs	18-25bp, fitas únicas, menos resistente que o siRNA em soro fetal.	(Reischl & Zimmer, 2009; Yao <i>et al.</i> , 2009)
Riboenzimas	RNA cataliticamente ativo composto por três hélices, resistente em soro por menos de 10 minutos.	(Reischl & Zimmer, 2009; Yao <i>et al.</i> , 2009)
siRNA	21-25 nt, Dupla fita endógenos ou exógenos naturais, defesa contra vírus e transposons, regulam o RNAm e a degradação postranscricional deste através de seqüências	(Akhtar & Benter, 2007; Reischl & Zimmer, 2009)
shRNA	Semelhante ao ds-siRNA com um loop de 4-9nt em uma extremidade, processado por Dicer para produzir siRNA, transcrito pela RNA polimerase III	(Takahashi <i>et al.</i> , 2009; Yao <i>et al.</i> , 2009)
miRNA	20-24 nt, endógeno, transcrito por RNA polimerase II, regulam a degradação do RNAm ou inibição da tradução postranscricional com seqüências parcialmente incompatíveis	(Reischl & Zimmer, 2009; Takahashi <i>et al.</i> , 2009; Yao <i>et al.</i> , 2009)
piRNA	24-30 nt, endógeno, liga proteína Piwi proteínas, envolvidas no transposon controle, desenvolvimento de células germinativas, espermatogênese	(Choudhuri, 2009)

As moléculas de pequenos RNAs com ação de interferência (siRNAs) são caracterizadas por terem aproximadamente 21 a 23 nucleotídeos (nt) que agem regulando a expressão gênica ao nível pós-transcricional de forma sequência-específica (Hamilton *et al.*, 1999).

Os siRNAs são incorporados a um complexo de multiproteína (RISC), induzindo silenciamento onde o duplex do siRNA é desenrolado, deixando a fita antisense para orientar a RISC e gerando a clivagem do RNAm homólogo (Zamore, 2002; Dykxhoorn *et al.*, 2003). A descoberta do siRNA, bem como sua aplicação bem-sucedida, fornece uma poderosa ferramenta para a desativação dos genes alvos (Czech & Hannon, 2011)

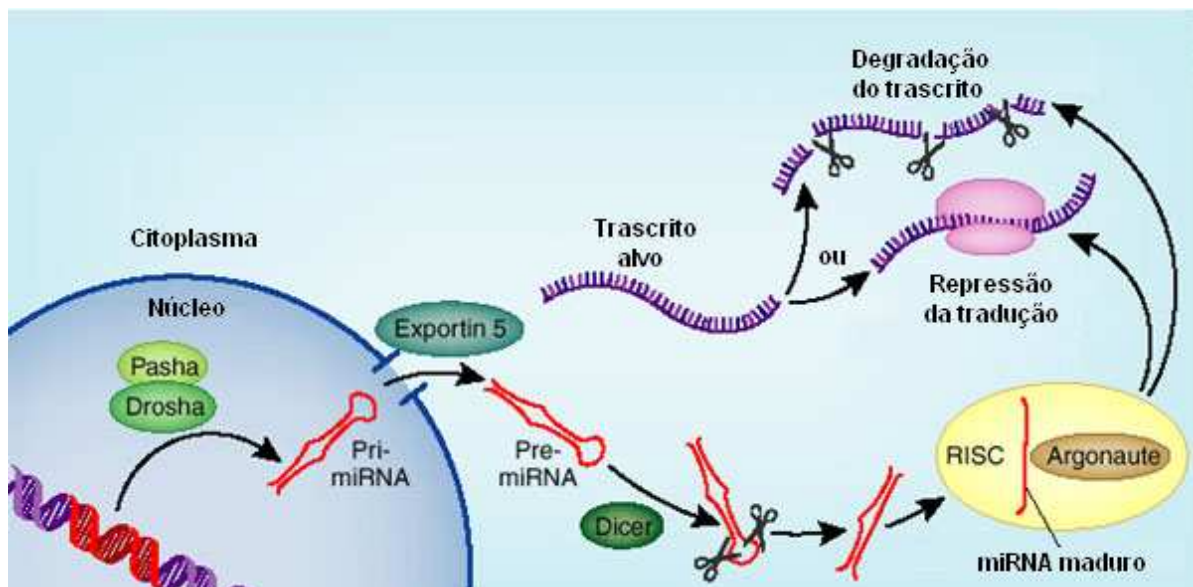
O shRNA é utilizado mais frequentemente em laboratórios onde a regulação permanente de um RNAm específico é desejado, normalmente entregue usando vetores virais (Manjunath *et al.*, 2009). Ao contrário do siRNA, shRNA é entregue como um gene que codifica para o shRNA desejado, que, quando transcrito forma uma estrutura em forma de grampo. O gene que codifica para shRNA entra no núcleo, o que aumenta a complexidade da entrega do shRNA na célula (Takahashi *et al.*, 2009).

MicroRNAs (miRNAs) representam uma classe de moléculas de RNA não-codificante que desempenham um papel fundamental nos processos de desenvolvimento celular e pela regulação da expressão gênica ao nível pós transcricional. Os miRNAs desempenham um papel importante em diversos processos biológicos tais como o desenvolvimento, proliferação celular e diferenciação, apoptose, oncogênese, metabolismo, angiogênese e inflamação. A desregulação da expressão do miRNA está associada a uma variedade de doenças humanas, incluindo câncer e doenças inflamatórias crônicas (Kanwar *et al.*, 2010; Sonntag, 2010; Tufekci *et al.*, 2011). Desvendar a rede do silenciamento por miRNA continua sendo um desafio, em parte porque miRNAs individuais normalmente tem alvos transcritos apenas por um gene específico e um único RNAm pode ser regulado por vários miRNAs distintos que atuam de forma cooperativa (Bartel, 2009).

MicroRNAs são expressos em 21-23 nucleotídeos de moléculas de RNA inicialmente transcritos pela RNA polimerase II em longos miRNAs primário (pri-

microRNAs). Embora a maioria dos genes de miRNA sejam transcritos pela RNA polimerase II, um grupo de miRNAs humano dependente da RNA polimerase III para a sua transcrição foi descrito recentemente (Borchert *et al.*, 2006). A forma estrutural Pri-miRNAs é processada no núcleo em um ou mais precursores-miRNAs (pré-miRNAs) com cerca de 70 nucleotídeos (nt), podendo ser caracterizados em estrutura de alça (Tufekci *et al.*, 2011).

O processamento é realizado por um complexo de proteínas chamado composto da nuclease Drosha (RNase III nuclear) que é acoplado a uma proteína ligadora de RNA (DGCR8 em humanos) (Denli *et al.*, 2004). Os Pré-miRNAs são exportados do núcleo para o citoplasma pela exportina-5, que reconhece especificamente a estrutura final característica dos pré-miRNAs (Yi *et al.*, 2003; Bohnsack *et al.*, 2004). No citoplasma, outra RNase III, conhecida como Dicer, processa os pré-miR em maduro miRNA, que é de fita dupla (miRNA duplex) (Hutvagner *et al.*, 2001; Ketting *et al.*, 2001). Após o processamento Dicer, o miRNA duplex é desenrolado em um fio (conhecido como miRNA fita ou fita guia) liga a uma proteína Argonaute 2. A partir de então, no citoplasma os pré-miRNAs vão seguir os mesmo processamento realizado pela enzima DICER em siRNAs (Figura 2.1).



**Figura 2. 1:** Biogênese do miRNA (Adaptado de Mack, 2007).

O piRNAs foram primeiramente identificadas através de estudos sobre a *Drosophila locus* estreladas, que é composta por repetidas cópias de um gene que codifica uma caseína quinase II beta subunidade homólogo (Livak, 1990). Pequenos RNAs clonados e sequenciados em estudos posteriores mostraram que RNAs relacionados com 22-30 nucleotídeos de comprimento, sendo derivados em grande parte de retrotransposons e outras seqüências de elementos repetitivos são abundantes nas células germinativas masculinas e femininas (Aravin *et al.*, 2003). Estes novos pequenos RNAs foram, portanto, inicialmente chamados de pequenos RNAs de interferência chamados de siRNAs (Aravin *et al.*, 2003; Aravin *et al.*, 2006). Entretanto foi observado que nos outros sistemas de pequenos RNAs de interferência não possui seqüências de transposons. Esses RNA são associados ao subgrupo PIWI da super-família de proteínas Argounatas diferentes da ação das argonatas associadas miRNA e siRNA que é do subgrupo AGO (Aravin *et al.*, 2006; Girard *et al.*, 2006).

Como resultado surgiu uma nova família de pequenos RNAs conhecidas como PIWI-RNAs (piRNAs) (Brennecke *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2007b). Esses piRNAs foram definidos em células de mamíferos com cerca de 26-31 nucleotídeos, assim em comparação com o típico miRNA ou siRNA de aproximadamente 21 nucleotídeos são relativamente maiores. Estes piRNAs são chamados de "cluster" genômico (Girard *et al.*, 2006) que podem ser originários de regiões repetitivas do genoma, tais como retrotransposons ou regiões normalmente organizadas em heterocromatina, e que normalmente são derivados exclusivamente da fita antisense do RNA de fita dupla (Vagin *et al.*, 2006).

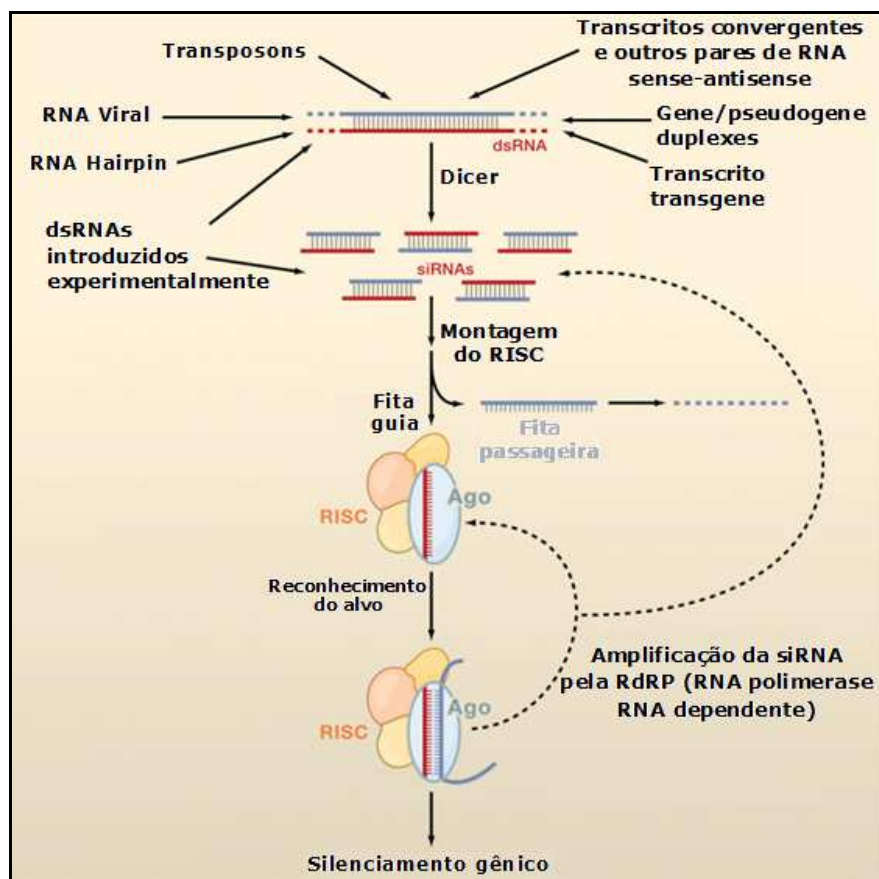
## 2.2 Mecanismo de ação

No interior da célula, o processo de RNAi começa com a degradação enzimática do dsRNA pela DICER, uma endoribonuclease da família RNase de classe III, que é capaz de reconhecer duplas fitas de RNA através de uma proteína ligadora de RNA, TRBP (trans-ativador RNA(tar)binding protein) (Chendrimada *et al.*, 2005), que gera siRNAs de interferência de 21 a 23 nt. Estes são caracterizados por um grupo fosfato na extremidade 5' e dois nucleotídeos não pareados na extremidade 3' hidroxiterminal.(Elbashir *et al.*, 2001). Após a

clivagem, a proteína DICER/TRBP irá se associar com outra classe de proteína denominada Argonautas (Ago) ou *slicer*, sendo esta a principal proteína com atividade catalítica envolvida no processo de silenciamento mediado por RNA (Liu *et al.*, 2004). O trímero, DICER/TRBP/Ago 2 pode então reconhecer estruturas de siRNAs, formando o complexo de silenciamento mediado por RNA (*RNA-induced silencing complex-RISC*) (Hammond *et al.*, 2000). A proteína TRBP parece ser responsável pelo reconhecimento das fitas. Após a etapa de reconhecimento, a fita antisense (ou fita guia) do siRNA é acoplada ao complexo, sendo a fita sense (fita passageira) descartada pela ação da proteína Ago 2 e, posteriormente, degradada. Assim, o complexo RISC se torna ativo para a ação catalítica (MacRae *et al.*, 2008).

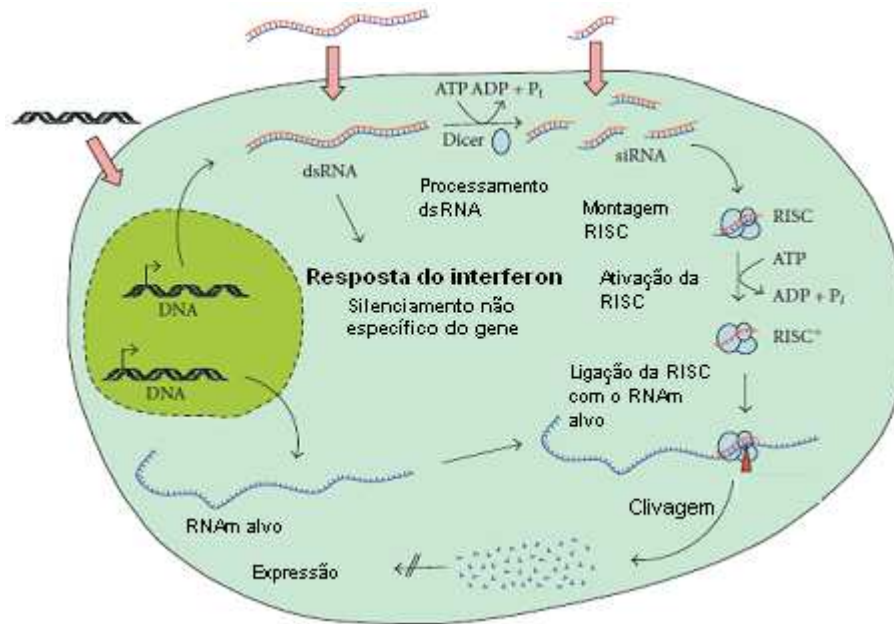
A fita antisense direciona o RISC para um RNAm alvo a ser degradado (Leuschner *et al.*, 2006). Esta degradação é dirigida pela proteína Ago 2 (Matranga *et al.*, 2005; Rand *et al.*, 2005), que realiza ligações fosfodiéster entre os nucleotídeos alvo e as bases 10 e 11 da fita guia (contados a partir da extremidade 5') (Elbashir *et al.*, 2001). E em seguida, cliva o RNAm alvo, gerando grupos 3'-hidroxila e 5'-fosfato (Martinez & Tuschl, 2004). A fita guia permanece intacta e permite que o RISC silencie pelo menos nove RNAs antes de deixar o complexo (Hutvagner & Zamore, 2002) (Figura 2.2).





**Figura 2. 2** : Esquema representativo das fontes de geração do RNA de interferência (Adaptado de Carthew & Sontheimer, 2009).

Após todo o processo de clivagem, a fita guia se dissocia do complexo RISC, liberando-o para a degradação de novos alvos (Rana, 2007). Os fragmentos 5' (contendo CAP – sete-metil-guanosina trifosfato) e o fragmento 3' (contendo cauda poli-A), são então atacados por exonucleases celulares: o primeiro é degradado pelo exossomo (Orban & Izaurralde, 2005) e/ou uma exoribonuclease com atividade 3'-5' (Glazov *et al.*, 2003), ao passo que o segundo é processado por uma exoribonuclease com atividade 5'-3' (Souret *et al.*, 2004). Esse processo garante que os dois fragmentos não sejam traduzidos, o que poderia gerar proteínas truncadas e, possivelmente, citotóxicas (Figura 2.3)



**Figura 2. 3:** Mecanismo de ação do siRNA ( Adaptado de Aigner *et al.*, 2006a).  
 dsRNA: Duplo RNA, RISC: Complexo de silenciamento mediado por RNA, ATP: Anenina trifosfatada, ADP: Adenina difosfatada, DICER: endoribonuclease da família RNase de classe III.

### 2.3 Entrega dos siRNA

Os vetores de expressão plasmidiais podem ser usados especificamente para regular negativamente a expressão de um determinado gene de interesse ou de relevância patológica *in vitro*. Os vetores virais têm sido bastantes utilizados, já que têm a vantagem da eficácia devido à capacidade inerente do vírus para transportar material genético nas células.

Por outro lado, no entanto, sistemas virais mostram uma capacidade de carga limitada. Além disso, não conseguem replicar em grande escala o material genético, além de seu potencial oncogênico e efeitos imunogênicos que os impedem de administração repetida (Donahue & Clark, 1992; Donahue *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 2004).

Devido a estas limitações, sistemas não virais aparecem como uma alternativa de entrega dos genes bastante promissora. Neste contexto, diversas estratégias como lipotransfecção e politransfecção estão sendo realizadas através de lipídio catiônicos ou polímeros em alguns estudos (Merdan *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003).

Outra estratégia que pode ser utilizada é a de plasmídeos de expressão de DNA que codificam alças em forma de grampo com a sequência desejada. Outro método bastante utilizado *in vitro* se baseia na expressão da shRNAs em *E. coli* e sua entrega através da invasão bacteriana (Zhao *et al.*, 2005). Diferentes sistemas baseados em DNA oferecem a vantagem de expressão do siRNA com uma maior duração e, provavelmente, um nível maior de silenciamento de genes, porém questiona-se a segurança *in vivo*. Assim, a entrega direta de moléculas de siRNAs, derivados da transcrição *in vitro* ou sintetizados quimicamente, oferece vantagens sobre estratégias baseadas em DNA e pode ser preferível para a terapêutica *in vivo* (Aigner, 2006a).

A proteção eficaz contra degradação enzimática ou não-enzimática é particularmente importante para o RNA, incluindo moléculas de siRNAs (Aigner, 2006a). A utilização de siRNA como estratégia terapêutica para o tratamento de várias doenças é, em princípio, muito promissora porém as limitações de vetores de transferência pode vir a ser um fator limitante no desenvolvimento de siRNAs com base em estratégias terapêuticas.

Uma abordagem alternativa surgida baseia-se na complexação de moléculas de siRNA modificadas com um polímero catiônico a polietilamina (PEI). PEIs são polímeros sintéticos disponíveis em formas ramificadas ou lineares em uma ampla gama de pesos moleculares. Possuem a capacidade de condensar e compactar o DNA em complexos, que formam pequenas partículas coloidais, permitindo a captação celular eficiente através de endocitose. A PEI foi introduzida como um potente reagente de transfecção de DNA em uma variedade de linhagens celulares e em animais (Kichler, 2004; Aigner, 2006a)

Embora essas abordagens tenham todas mostrado vantagens e desvantagens específicas, a atratividade pelos polímeros consiste na possibilidade de serem especificamente adaptados para diferentes aplicações. Ao mesmo tempo, os principais problemas dos polímeros utilizados atualmente é sua elevada toxicidade provavelmente gerada pela sua biodegradabilidade.

Uma nova classe de polímeros tem surgido nos últimos anos. Polímeros são biodegradáveis catiônicos com base amida/aminas e pontes dissulfeto (SS-PAA) (Lin *et al.*, 2006). Esses polímeros exibem propriedades de transferência eficiente dos genes. Introdução de dissulfeto na cadeia do polímero demonstrou

resultar em aumento da eficiência de transfecção, devido a um aumento da liberação dos complexos de DNA e diminuição de toxicidade para essa classe de polímeros (Lin *et al.*, 2007; Vader *et al.*, 2010). Independente do tipo de entrega utilizado na célula, o importante desse é aumentar a eficiência de transfecção na célula sem gerar alta citotoxicidade do sistema.

## **2.4 Limitações do uso de siRNA**

Atualmente, a utilização do siRNA para aplicações biomédicas é bastante promissora devido a utilização da ação de sequências específicas no silenciamento do genes *in vivo* e *in vitro* (Zimmermann *et al.*, 2006). No entanto, existem limitações em níveis extracelular e intracelular que devem ser superadas para o uso terapêutico do siRNA (Tokatlian & Segura, 2010).

### **2.4.1 Estabilidade das sequências**

Os siRNAs, como a maioria das moléculas de RNA, são facilmente degradadas tanto na matriz extracelular como na matriz intracelular. O soro utilizado no meio de células *in vitro* também tem demonstrado dar uma meia-vida curta, de minutos ou horas ao siRNA. Para estabilizar siRNA no soro, modificações químicas podem ser feitas no siRNA, conferindo resistência aos mesmos (Akhtar & Benter, 2007; Reischl & Zimmer, 2009), ou estratégias de encapsulamento lipídico também podem proteger os vetores de siRNA da degradação da resposta imune do hospedeiro (Tokatlian & Segura, 2010).

### **2.4.2 Escape da ação dos siRNA**

Após a internalização do siRNA, um dos primeiros endossomos formados é acompanhado por acidificação do lúmen vesicular, que continua em compartimentos endossomais tardios e lisossomal, atingindo um pH final de aproximadamente 4,5 no lisossoma perinuclear (Akhtar & Benter, 2007; Takahashi *et al.*, 2009). Além disso, um potencial redox existe entre o espaço extracelular e o espaço intracelular devido à presença de moléculas como a glutathione (GSH) e tioredoxina dentro do endossoma (Jere *et al.*, 2009). Assim, estratégias para melhorar o escape endossomal têm explorados através da redução sensível do pH.

### 2.4.3 Efeito off- target

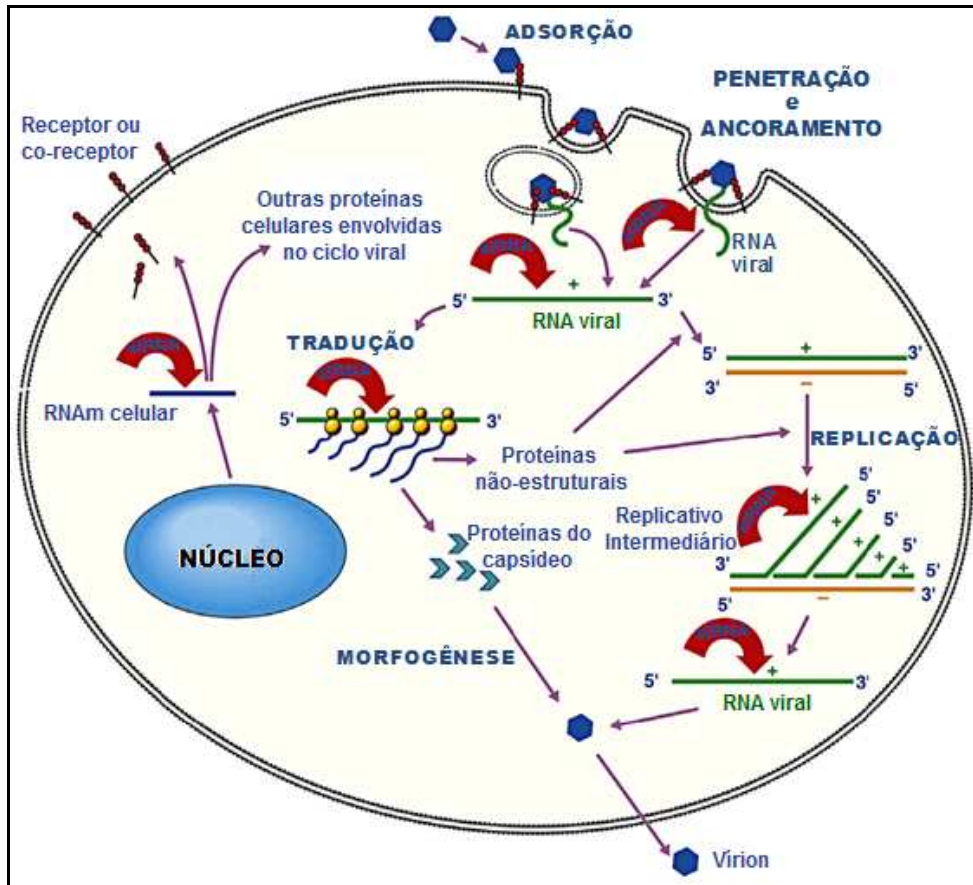
Para a aplicação terapêutica do siRNA é necessário o reconhecimento específico e vinculativo do siRNA no citossol para a degradação específica do RNAm e efetivo silenciamento do gene em estudo. Efeito off- target ocorre quando genes específicos, que não são alvos no estudo, apresentam uma resposta alterada da ação dos siRNA (Sledz & Williams, 2005). Esses efeitos incluem (mas não estão limitados) inflamação, incluindo resposta do interferon, toxicidade celular, a saturação da via do RNAm endógeno, além de efeitos indesejados sobre o alvo gene (Aigner, 2006b). Diversas pesquisas tem demonstrado que modificações químicas da fita guia do siRNA podem ser usadas para aumentar a especificidade do alvo RNAm e reduzem efeitos fora do alvo (Rao *et al.*, 2009).

## 2.6 Aplicações do siRNA em virologia

Atualmente, existem diversas viroses nas quais se utilizam os siRNAs como alternativa de inibir a replicação viral, tais como: hepatite C (HCV) (Yokota *et al.*, 2003; Kronke *et al.*, 2004; Khaliq *et al.*, 2010); hepatite B (HBV) (McCaffrey *et al.*, 2003; Shlomai & Shaul, 2003; Weinberg & Arbuthnot, 2010) e HIV (Coburn & Cullen, 2002; Jacque *et al.*, 2002).

Com base nos inúmeros trabalhos da literatura sobre a capacidade do siRNA atuar contra patógenos virais pode-se concluir que a via de siRNA, na verdade, funciona como um sistema de defesa antiviral, permitindo que a célula hospedeira restrinja a replicação viral em nível pós-transcricional (Figura 2.4). Curiosamente, alguns vírus desenvolveram mecanismos para responder a esse sistema de defesa antiviral, codificando proteínas ou moléculas de RNA que funcionam como supressores de silenciamento de RNA para inibir diferentes etapas e componentes da via de siRNA e permitir a replicação viral com sucesso (Bivalkar-Mehla *et al.*, 2011). Alguns vírus humanos que já apresentaram esses mecanismos de supressão incluem o HIV (Qian *et al.*, 2009), vírus da gripe (de Vries *et al.*, 2009) HCV (Wang *et al.*, 2006; Ji *et al.*, 2008), vaccínia (Li *et al.*, 2004) e vírus ebola (Haasnoot *et al.*, 2007a). Os siRNA podem inibir diversos estágios do

ciclo replicativo viral (Figura 2.4), atuando em alvos virais desde a multiplicação a liberação viral como em alvos celulares (Colbere-Garapin *et al.*, 2005).



**Figura 2. 4:** Possíveis alvos de silenciamento do siRNA durante a replicação viral (Adaptado de Colbere-Garapin *et al.*, 2005)



- Atuação do siRNA no silenciamento de diferentes alvos celulares e virais.

### 3. Justificativa

A herpes simples 1 é uma doença viral recorrente, geralmente benigna, causada pelo vírus HSV-1, que afeta principalmente a mucosa da boca, mas complicações neurológicas graves são muito frequentes. Em alguns países, especialmente pobres, 90% das pessoas têm anticorpos contra o HSV-1, ainda que possam não ter tido sintomas. Na maioria dos casos o HSV-1, provoca lesões ao redor da boca (herpes labial, gengivoestomatite e faringite herpética). As infecções primárias pelo HSV-1 são doenças primariamente de crianças (OMS, 2008). O tratamento atual consiste em uso de antivirais orais. Eles oferecem excelentes resultados nas crises agudas, porém o maior problema dos antivirais, atualmente, é que eles podem induzir a resistência do vírus ao medicamento oral. Ainda não existe um tratamento totalmente eficaz para o tratamento da herpes. Para o diagnóstico laboratorial, o “padrão-ouro” continua sendo o isolamento viral, sendo que em muitos casos, devido aos baixos títulos virais, a cura de lesões ou lesões atípicas, o vírus não pode ser isolado. Outro método de escolha para o diagnóstico da infecção pelo HSV é a PCR, pois é um método altamente sensível e específico, além de permitir o diagnóstico com a coleta de diferentes materiais biológicos como sangue, líquor, swab e escovado da lesão e etc.

O objetivo deste trabalho foi otimizar a reação de PCR em tempo real para auxiliar o diagnóstico de detecção e quantificação do HSV-1 em pacientes infectados. Visa-se ainda isolar o vírus destes pacientes em cultura celular e avaliar a utilização do RNAi para inibir a replicação do HSV-1 *in vitro* como uma alternativa de terapia antiviral.

O sistema de detecção em cultura celular dos diferentes tipos de amostras nos permitirá mais facilmente prosseguir nos estudos de controle da infecção através da diminuição da replicação viral pela função da ribonucleotídeo redutase e fornecerá dados para o desenvolvimento de aplicações do RNAi *in vivo*.

## **4. Objetivos:**

### **4.1 Objetivo Geral**

Estabelecer um método para diagnosticar a infecção pelo HSV-1 por meio da detecção e quantificação do genoma viral e avaliar o uso do siRNA para inibição do ciclo replicativo do HSV-1 “*in vitro*”

### **4.2 Objetivos específicos:**

- Otimizar a técnica de PCR em tempo real para detecção e quantificação do HSV-1 em amostras de raspado da lesão mucocutânea, sangue e saliva.
- Avaliar o método mais eficiente para o diagnóstico da infecção HSV-1, por meio da comparação entre a detecção do HSV-1 por isolamento em cultura celular “padrão ouro” e a técnica de PCR em tempo real.
- Avaliar a aplicação do siRNA como um mecanismo inibidor contra o HSV-1 em amostras provenientes de cultura celular.



## 5. Materias e Métodos

### 5.1. Diagnóstico Laboratorial do vírus do HSV-1

Este projeto nº544/09 foi aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz CEP/FIOCRUZ conforme carta 011/10, de 30 de março 2010. (Anexo 1).

#### 5.11 Amostras estudadas

Para a realização da otimização do diagnóstico da infecção pelo HSV-1 foram utilizados amostras de soro, saliva e swab da lesão para detecção do vírus.

As amostras do estudo retrospectivo foram provenientes do banco de amostras de soro do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle. A distribuição dos casos estudados por ano de coleta, idade e sexo dos pacientes está apresentada na tabela 5.1. Foram utilizadas amostras de pacientes HIV positivos (n=21) coletados nos anos de 1988, 2000, 2003 e 2004.

As amostras de swab da lesão e da saliva de pacientes que apresentavam nas mucosas infecções de HSV-1 (n=6) do estudo prospectivo foram coletadas nos anos de 2009 e 2010 em pacientes não imunocomprometidos. As amostras de saliva foram coletadas com o coletor denominado de *Salivette* (Sarsdedt, Alemanha) e o swab da cavidade oral foi coletado pelo coletor *ChemBio* (Medford, New York). Após coletadas, era feito o isolamanto viral e PCR em tempo real das amostras de swab e saliva.

**Tabela 5. 1:** Distribuição dos pacientes infectados com HIV de acordo com o sexo, idade e ano de coleta da amostra.

<b>Sexo</b>	<b>1988</b>	<b>2000</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>
Feminino	1	1	2	4
Masculino	6	0	1	6
<b>Faixa Etária</b>				
10-19	1	-	-	-
20-29	-	-	1	3
30-39	-	-	-	2
40-49	2	-	-	3
50-59	3	1	1	-
60-69	1	-	1	1
70-79	-	-	-	1

Os dados epidemiológicos e laboratoriais dos pacientes foram coletados após consulta aos prontuários (estudo retrospectivo) e através do preenchimento de uma ficha epidemiológica (estudo prospectivo) (anexo 2). Neste estudo foram coletados somente dados referentes a variáveis sexo e idade, devido à natureza do estudo e objetivo do mesmo. Para o diagnóstico laboratorial confirmatório das infecções pelo HSV foram realizados o isolamento viral, ELISA e PCR em Tempo Real.

## 5.2 Isolamento Viral

O isolamento viral foi realizado através da inoculação de 100µl do material coletado dos pacientes em cultura de células Vero (em duplicatas), crescidas nos tubos de cultura celular 16 x 125 mm (Falcon®/Labware, Franklin Lakes, NJ, EUA) em 1mL de meio de cultura 199 com 2% de soro fetal bovino (SFB - Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e acrescida de antibióticos e antifúngicos. A cultura celular foi observada diariamente por duas semanas para análise da presença do efeito citopático (ECP) característico causado pelo HSV. Na ausência de ECP, passagens cegas foram feitas no 15º dia.

### **5.3 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos IgG anti-HSV .**

Para detecção de anticorpos IgG anti-HSV-1/anti-HSV-2 específica foi utilizado o kit ETI-HSVK-G Diasorin (Vercelli, Italy) de acordo com as instruções do fabricante.

#### **a) Procedimento**

A execução do teste para a detecção de anticorpos anti-HSV1/2 total no soro foi realizada de acordo com as instruções do fabricante: 10µL da amostra e 1 mL de diluente da amostra para obter uma diluição de 1:101 foram aplicados em cada orifício.

#### **b) Princípio do teste**

As cavidades da microplaca foram sensibilizadas com anticorpos humanos Ig G anti-HSV1/2 total. As amostras a serem testadas e o antígeno de HSV foram simultaneamente incubadas em cada cavidade. Essa reação foi incubada por uma hora a 37°C. Após a incubação, a amostra foi aspirada e as cavidades foram lavadas com tampão fosfato (PBS, pH 7,4). Adicionou-se então um conjugado enzimático anti-HSV-1/2 marcado com peroxidase. O antígeno se ligou ao complexo IgG/anticorpo em fase sólida e o anticorpo marcado com enzima se ligou ao complexo antígeno/IgG/anticorpo em fase sólida. Se a amostra contiver anti-HSV1/2 Ig G, depois de lavagens e incubação com o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e a substância reveladora Tetrametil Benzidina (TMB), há o aparecimento de cor. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico (1 mol/L).

Para a leitura espectrofotométrica utilizou-se um leitor multiskan para microplacas ELISA com filtro de 450nm (Organon Teknika). Os resultados foram calculados segundo o valor de corte calculado pela média dos calibradores utilizados no teste. Os valores acima de 20% do valor de corte são considerados positivos e os abaixo de 20% do valor de corte são considerados negativos. As amostras entre a faixa de ± 20% do valor de corte foram consideradas indeterminadas.

## 5.4 Extração do DNA

Para a extração do DNA viral foi utilizado o conjunto de reagentes comercial QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen, Valencia, CA, EUA), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. As amostras de lesão, saliva e soro foram submetidas ao mesmo protocolo. Primeiramente, as amostras foram descongeladas e homogeneizadas por 1 minuto (min). Em seguida, 20 µl de Proteinase K (QIAGEN) foram adicionados a 200 µl de cada amostra, sendo adicionados posteriormente 200µl de tampão de lise (*Buffer AL*) a cada tubo e vortexado por 15 segundos. Em seguida, as amostras foram incubadas a 56°C por 10 minutos. Após a incubação, foi adicionado 200 µl álcool etílico a 100% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), cada tubo foi homogeneizado por 1 minuto e a solução foi transferida para coluna. Após isso, as amostras foram centrifugadas a 8.000 rpm (6.000 x g) por 1 minuto em centrífuga Excelsa II (FANEM, São Paulo, Brasil). Ao fim de cada centrifugação, a solução resultante foi descartada, e o tubo coletor recolocado. Após esta etapa, foram adicionados 500 µl do tampão de lavagem *Washer buffer 1* (AW1), seguido de centrifugação a 8.000 rpm (6.000 x g) por 1 minuto. Após a centrifugação, foi realizada mais uma lavagem com 500 µl de tampão *Washer buffer 2* (AW2) por 14.000 rpm (20.000 x g) durante 3min . Ao final desta etapa, os tubos coletores foram descartados e substituídos por tubos de poliestireno de 1,5 mL devidamente identificados. Foram adicionados 200 µl de água livre de nucleases nas colunas que sofrerão uma última centrifugação a 8.000 rpm (6 000 x g) por 1min para eluição do DNA. Posteriormente, as colunas foram descartadas e os tubos de poliestireno contendo o DNA viral foram estocados a -70°C até o momento da análise por PCR em tempo real.

## 5.5 PCR em tempo real

### 5.5.1 Quantificação absoluta

Os oligonucleotídeos sense (5'-CGGCCGTGTGACACTATCG-3') e anti-sense (5'- CTCGTAAAATGGCCCCTCC -3') foram utilizados para amplificar um fragmento de 70 bp da região gD do vírus, de acordo com Weidmann *et al.*, 2008 . O método

de quantificação absoluta foi utilizado para a detecção e quantificação do DNA do HSV-1 nos diferentes tipos de amostras através do sistema SYBR Green Real Time Mix PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para a construção da curva padrão foi utilizado um preparado viral com título inicial de  $10^8$  cópias/mL em diluição seriada ( $10^1$ - $10^7$ ). As condições de termociclagem consistiram de 40 ciclos a 95°C por 1 minuto, 95°C por 15 segundos, 58°C por 15 segundos e 72°C por 40 segundos.

## **5.6 Inibição do ciclo replicativo do HSV-1 utilizando siRNA**

### **5.6.1 Amostras de cultura celular**

Células Vero CCL-81 (células de rim do macaco verde africano *Cercopithecus aethiops*) foram cultivadas em meio 199 (Sigma, St. Louis, MO, EUA), contendo 2,5% (meio de manutenção) ou 10% (meio de crescimento) de SFB (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) 0,1  $\mu$ M de tampão HEPES (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e 2,5  $\mu$ g/mL de gentamicina (GIBCO®/Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Durante as passagens, para o desprendimento da monocamada, as células foram tratadas inicialmente com tampão fosfato-salino (PBS pH 7,4), concentrado 1X, contendo 137 mM de cloreto de sódio (NaCl), 10 mM de fosfato e 2.7 mM de cloreto de sódio (NaCl) pH 7.2 e ,posteriormente, tratada com EDTA/tripsina a 0,25% (Reagen/GIBCO/Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

### **5.6.2 Preparo e titulação do vírus**

A cepa de HSV-1 KOS (Andrighetti-Frohner *et al.*, 2005), foi gentilmente cedida pela Dr<sup>a</sup>. Márcia Wigg do Departamento de Virologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e foi diluída em meio MEM sem SFB e multiplicadas em células Vero, utilizando-se uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1 (Lagrotta *et al.*, 1994; Esquenazi *et al.*, 2002). Em 48 horas pós - inoculação (p.i.), as células foram lisadas por ciclos de congelamento e descongelamento. O conteúdo foi centrifugado a 400x g por 20 minutos a 4°C e o título viral foi dosado pelo método de ensaio de placa (Kuo *et al.*, 2001).

Células Vero distribuídas em placas de 6 cavidades ( $3 \times 10^5$  células/mL) foram infectadas com diferentes diluições de HSV-1 por 1h a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, o inóculo viral foi retirado e as monocamadas cobertas com meio 199 com 5% de SFB e 1% de metilcelulose (Fluka). Após 72 horas, as monocamadas de células foram fixadas e coradas em solução de formaldeído 10% e cristal violeta 0,1%. Em seguida as placas virais foram contadas e o título viral determinado de acordo com o número de unidades formadoras de placas (UFP/mL).

### 5.6.3 Sequências de siRNA

Neste estudo foram utilizadas quatro sequências de siRNA. Três sequências foram específicas para região UL39 do genoma do HSV-1, previamente descritas por Zhe e colaboradores (2008) (Quadro 5.1), e uma sequência não-específica de origem comercial (RNAi#1) como controle negativo foram usadas nos ensaios. As sequências específicas sense e antisense foram adquiridas separadamente, liofilizadas a uma concentração de 40 nanomoles (nmol). Todas as sequências foram sintetizadas pela Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA).

**Quadro 5. 1:** Sequências nucleotídicas dos siRNA específicos utilizados descritas por Zhe *et al.*, 2008.

siRNA	Sequência Nucleotídica (Sense e anti-sense) 5' → 3'	Posição no genoma
siRNA1	CUGCACCAUGAUGAUCGACdTdT GUCGAUGAUGAUGGUGCAGdTdT	232–250
siRNA2	AUCGGCCCUGAAGUAUGAGdTdT CUCAUACUUCAGGGCCGAUUG	1,483–1,501
siRNA3	CCAUAGCCAAUCCAUGACCdTdT GGUCAUGGAUUGGCUAUGGUC'	3,214–3,232

As sequências foram ressuspensas inicialmente em 200 µl de água livre de nucleases, a uma concentração final de 100 µM cada. Antes da transfecção, as sequências foram diluídas em tampão de hibridização em água livre de nucleases nas concentrações de 5 micromolar (µM), 10 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM e 35 µM, e hibridizadas por incubação a 90°C por 1 minuto, seguido de 37°C por 1 hora, em termociclador (TC-312, Nova Analítica, São Paulo, SP, Brasil). Todas as diluições foram realizadas em tubos de poliestireno de 0,5 mL (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e armazenadas a -70°C.

A sequência não específica RNA#1 foi adquirida hibridizada a uma concentração inicial de 50µM, sendo diluída a concentração de 2 µM em água livre de nucleases de acordo com as instruções do fabricante.

#### **5.6.4 Transfecção e plaqueamento**

Vinte e quatro horas antes da transfecção, culturas celulares de Vero com 80% a 90% de confluência foram tripsinizadas e ressuspensas em 40 mL de meio de manutenção 199, em seguida, contadas em câmara de Neubaur e utilizando azul de tripan a 1% (Sigma, St. Louis, MO, USA). Aproximadamente 10<sup>4</sup> células foram plaqueadas em placas de cultura de vinte e quatro cavidades (Falcon®/Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) em um total de 400 µl de meio 199 por cavidade.

Para a transfecção, foi utilizado o kit comercial siPORT™ Amine (Ambion/Applied Biosystems, Foster city, CA, USA), que consiste de poliaminas catiônicas que se agregam as sequências de siRNAs facilitando a penetração através da membrana plasmática celular. Seguindo o protocolo do fabricante, 1.0 µl do agente de transfecção foi diluído em 25 µl de meio OPTIMEM® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Simultaneamente, 1µl de cada uma das sequências de siRNA também foi diluído em 25 µl de meio OPTIMEM, em seguida ocorreu uma incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. Após incubação, as sequências diluídas foram misturadas ao agente de transfecção e incubadas por mais 10 minutos para a formação dos complexos de transfecção. Durante os períodos de incubação, o meio de

manutenção das células já plaqueadas foi retirado e as mesmas lavadas com PBS pH 7,0 1X. Em seguida, 2 µl dos complexos de transfecção de cada uma das sequências foram colocados em cada cavidade. As sequências foram transfectadas isoladamente (Seq. 1, Seq. 2, Seq. 3 e RNA#1) e em suas combinações (Seq 1+ Seq2, Seq1+ Seq3, Seq2+Seq3 e Seq1+ Seq 2 + Seq3), e incubadas durante 4 horas em 100 µl/cavidade de meio OPTIMEM<sup>®</sup>. Como controle positivo utilizamos amostras não transfectadas, mas que foram infectadas com HSV-1 como descrito mais adiante. Cada sequência e combinações de sequências foram transfectadas em cinco poços. Cada experimento foi repetido em duplicata. Após quatro horas, o meio foi retirado e as células novamente lavadas com PBS1X. As cavidades foram infectadas com 20 µl de HSV-1 (10<sup>8</sup> cópias/ml) por cavidade e incubadas por 1 hora para adsorção do vírus. Após 1 hora o vírus foi retirado e as células cultivadas por 48 horas em meio de manutenção 199 a 2% de SFB. A cada dia, as células foram lisadas com 180 µl de tampão de lise ATL do kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen, Valencia, CA, USA). As amostras foram recolhidas em tubos de poliestireno de 1.5 mL (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) devidamente identificados e armazenadas a -70°C até o momento da extração do DNA.

Para realização da curva dose-dependente, a transfecção foi realizada para cada uma das sequências isoladamente nas concentrações de 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM e 35 µM e incubadas durante 48 horas, sendo que as concentrações finais transfectadas foram 3 nM, 6 nM, 9 nM, 12 nM, 15 nM, 18 nM e 21 nM, respectivamente.

#### **5.6.5 Análise da inibição do siRNA por plaqueamento.**

Para análise da inibição da replicação por siRNA, células Vero foram cultivadas conforme descrito previamente (item 5.6.4). Aproximadamente 10<sup>5</sup> células foram plaqueadas em placas de cultura de seis cavidades (Falcon<sup>®</sup>/Labware, Franklin Lakes, NJ, EUA) em um total de 2,5 mL de meio 199 por poço. A transfecção foi realizada conforme descrito previamente (item 5.6.4), porém, as concentrações foram ajustadas para o uso em placa de 6 cavidades. Cinco microlitros do agente de transfecção foram diluídos em 100 µl de meio



OPTIMEM<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. Simultaneamente 7,5 µl de cada uma das sequências de siRNA também foram diluídas em 100 µl de meio OPTIMEM<sup>®</sup> e incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente. Após incubação, as sequências diluídas foram misturadas ao agente de transfecção e incubadas por mais 10 minutos para a formação dos complexos de transfecção. Durante os períodos de incubação, o meio de manutenção das células já plaqueadas foi retirado e as mesmas lavadas com PBS 1X (pH 7,0). Em seguida, 33 µl dos complexos de transfecção de cada uma das sequências foram colocados em cada cavidade. As sequências foram transfectadas isoladamente e em suas combinações e incubadas durante 4 horas em 100 µl/cavidade de meio OPTIMEM<sup>®</sup>. Após este período, o inoculo viral foi retirado e as monocamadas cobertas com meio 199 com 5% de SFB e 1% de metilcelulose (Fluka). Após 48h as monocamadas de células foram fixadas e coradas em solução de formaldeído 10% e cristal violeta 0,1%. Em seguida as placas virais foram contadas e o título viral determinado de acordo com o número de unidades formadoras de placas (UFP/mL).

#### **5.6.6 Análise da viabilidade celular após transfecção**

Para análise da viabilidade celular após transfecção, células Vero foram cultivadas conforme descrito previamente (item 5.6.4) e o ensaio de viabilidade celular foi realizado utilizando MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (sódio 3'-[1-(fenilaminocarbonil)-3,4-tetrazólio]).

Este ensaio avalia a capacidade de células metabolicamente ativas de reduzirem o MTT, convertendo os sais amarelos de tetrazolium em cristais de formazan, de cor púrpura. Após a solubilização dos cristais, a quantificação é realizada por leitura em um espectrofotômetro a 540 e 620 nm.

Aproximadamente  $10^3$  células foram plaqueadas em 100 µl de meio 199 em placas de cultura de 96 cavidades (Falcon<sup>®</sup>/Labware, Franklin Lakes, NJ, EUA). Após 24 horas, o meio foi retirado e as células lavadas com PBS 1X (pH 7,0). Duas colunas permaneceram com apenas a cultura celular (controle positivo), duas foram infectadas com o HSV-1 ( $10^8$  cópias RNA/mL), duas transfectadas seguindo a metodologia descrita no item 5.6.4. Contudo, utilizamos apenas a sequência UL39 Seq 1. As duas colunas restantes foram transfectadas somente com o kit

comercial siPORT™ Amine (Ambion/Applied Biosystems, Foster city, CA, USA kit). As placas foram armazenadas a 37°C em atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub> por 72 horas a 37°C. Após esse período, foi adicionado MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a 5 mg/mL. Após 4h de incubação a 37°C foi adicionado 100 µl da solução de 10% de SDS, 0,01N de HCl e mantidos por 24 horas.

### 5.6.7 PCR em tempo real

#### 5.6.7.1 Quantificação relativa

Para quantificação relativa do HSV DNA das amostras extraídas foi analisadas utiliza a quantificação relativa da PCR em tempo real (Schmutzhard *et al.*, 2004) de acordo com as instruções do fabricante. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de Cycle Thershold (C<sub>T</sub>). Este ponto permite a quantificação exata baseada na fluorescência. A quantificação relativa realiza uma comparação entre os C<sub>T</sub>s, tendo o controle endógeno RNA18s como normalizador da reação. Dessa forma, os resultados foram analisados baseados na metodologia do  $\Delta\Delta CT$  comparativo. Nesta metodologia, cada amostra (transfectada e não transfectada) é quantificada tanto para o HSV-1 quanto para o controle endógeno, e a diferença entre os valores de C<sub>T</sub>s gerados para ambos os alvos dará os valores de  $\Delta\Delta CT$ . No caso do estudo realizado, foi gerado uma amostra calibradora por dia de infecção realizado. Os valores finais para análise (RQ) com os respectivos valores de desvio padrão foram gerados automaticamente ao final de cada corrida e a silenciamento *knockdown* foi calculada utilizando a fórmula:

$$\% \text{ de silenciamento} = 100 - 2^{-\Delta\Delta ct} (\text{RQ})$$

Todas as amostras geradas foram analisadas segundo o calibrador de cada dia com a amostra não transfectada infectada. Um controle endógeno ideal é o que não apresenta grandes variações de quantificação entre as amostras tratadas com siRNA e não tratadas com siRNA. Com isso, para padronizar o controle endógeno empregado no ensaio, foi utilizada a diferença entre as médias dos C<sub>T</sub>s das amostras transfectadas em relação às amostras não transfectadas. Neste estudo, a

média dos CTs das amostras transfectadas e das não transfectadas foi de 30,1 e 35,2, respectivamente. A mistura para a reação foi composta por 12 µL de Mix PCR SYBR Green (Roche, New Jersey, EUA), 1 µl de cada oligonucleotídeo (10 pmol) e 6,0 µl de água livre de RNase. As misturas para amplificar a região UL-39 do vírus e para o controle endógeno (RNA 18s) foram preparadas utilizando-se oligonucleotídeos descritos por Zhe e colaboradores (2008) (Quadro 5.2). Cada mistura foi distribuída em duplicata em placas de 96 cavidade (Falcon®/Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) em um volume de 20 µl/cavidade e, posteriormente, foi adicionado 5 µl do HSV DNA por cavidade. As amostras foram analisadas em duplicadas para cada solução de reagentes.

**Quadro 5. 2:** Oligonucleotídeos para a reação de PCR em tempo real (Zhe *et al.*, 2008)

Oligonucleotídeo	UL-39	RNA 18s
Sense	5'-GGCTGCAATCGGCCCTGAAGTA-3'	5'CCTGGATACCGCAGCTAGGA-3'
Anti-sense	5'GGTGGTCGTAGAGGCGGTGGAA3'	5'-GCGGCGCAATACGAATGCCCC-3'

## 5.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se os programas “GraphPad Prism” 5.0 e Excel 2003. Os dados foram relatados como média ± desvio padrão (DP) e os níveis de significância foram avaliados utilizando os teste t de student e ANOVA. As diferenças foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ .

## 6.1 Resultados

### 6.2 Estudo retrospectivo e prospectivo

Devido à natureza e característica do estudo retrospectivo, as amostras de soro foram selecionadas aleatoriamente da soroteca de HIV/AIDS do banco de dados do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. Neste estudo, foram avaliadas 21 amostras de pacientes HIV positivos a fim de diagnosticar a infecção pelo HSV-1 por métodos sorológicos (ELISA) e molecular (PCR em tempo real). Dentre os 21 pacientes, 90,48% pacientes foram positivos para a presença de anticorpos anti-HSV por ELISA e em 100% dos pacientes foi possível a detecção do HVS-1 por PCR em tempo real, demonstrando a excelente sensibilidade e especificidade desta técnica. Os títulos séricos de HSV-1 variaram de  $2,32 \times 10^4$  a  $3,08 \times 10^7$  cópias/ml nas amostras de pacientes HIV+.

**Tabela 6. 1:** Resultados da detecção de anticorpos contra o HSV-1 e do genoma viral.

<i>Amostras HSV/HIV</i>	<i>Detecção de Ac anti-HSV-1</i>	<i>Detecção do HSV-DNA (cópias/mL)</i>
1/88	Positivo	$4,77 \times 10^4$
2/88	Positivo	$3,08 \times 10^7$
3/88	Positivo	$1,82 \times 10^7$
4/88	Positivo	$1,09 \times 10^7$
5/88	Positivo	$3,07 \times 10^4$
6/88	Positivo	$4,99 \times 10^6$
7/88	Positivo	$9,56 \times 10^6$
8/00	Positivo	$5,52 \times 10^5$
9/03	Positivo	$9,77 \times 10^6$
10/03	Positivo	$1,66 \times 10^5$
11/03	Positivo	$4,57 \times 10^4$
12/04	Negativo	$2,32 \times 10^4$
13/04	Negativo	$2,40 \times 10^6$
14/04	Positivo	$5,52 \times 10^5$
15/04	Positivo	$4,73 \times 10^5$
16/04	Positivo	$3,17 \times 10^5$
17/04	Positivo	$1,34 \times 10^7$
18/04	Positivo	$8,05 \times 10^5$
19/04	Positivo	$3,91 \times 10^6$
20/04	Positivo	$6,80 \times 10^3$
21/04	Positivo	$2,86 \times 10^6$

O estudo prospectivo teve por objetivo comparar a detecção do HSV-1 em pacientes que apresentaram lesões clínicas características desta virose, por meio da técnica de isolamento viral e PCR em tempo real. Durante o estudo, foi possível acompanhar 6 pacientes que apresentaram lesões na mucosa oral e/ou genital. Neste estudo, foram analisados 5 pacientes do sexo feminino e 1 paciente do sexo masculino. Os pacientes estudados apresentavam idade variando de 25 a 60 anos.

Na avaliação entre as técnicas de isolamento viral e a PCR em tempo real, 100% das amostras provenientes do swab da lesão foram positivas tanto para o isolamento viral como para a PCR em tempo real. Nas amostras de saliva 50% apresentaram-se positivas para o isolamento viral e 100% foram positivas para o PCR em tempo real. Para a PCR em tempo real os títulos virais variaram de  $2,44 \times 10^3$  a  $1,54 \times 10^4$ , demonstrando a especificidade e sensibilidade desta técnica nas amostras de lesão e saliva.

**Tabela 6. 2:** Detecção do HSV-1 pelo isolamento viral e PCR em tempo real nas amostras de mucosa oral e/ou genital.

<b>Pacientes</b>	<b>Amostras</b>	<b>Isolamento Viral</b>	<b>Detecção do HSV DNA (cópias/mL)</b>
Paciente 1	Lesão	Positivo	$7,16 \times 10^3$
	Saliva	Negativo	$4,72 \times 10^3$
Paciente 2	Lesão	Positivo	$9,38 \times 10^3$
	Saliva	Negativo	$9,78 \times 10^3$
Paciente 3	Lesão	Positivo	$3,85 \times 10^3$
	Saliva	Negativo	$2,440 \times 10^3$
Paciente 4	Lesão	Positivo	$1,10 \times 10^4$
	Saliva	Positivo	$1,54 \times 10^4$
Paciente 5	Saliva *	Positivo	$8,18 \times 10^3$
Paciente 6	Saliva *	Positivo	$9,96 \times 10^3$

\*nas amostras 5 e 6 não foi possível fazer a coleta de material biológico a partir das lesões de mucosa.

### **6.3 Inibição do ciclo replicativo do HSV-1 utilizando RNA de interferência.**

Para avaliar a viabilidade celular foi realizada a metodologia MTT, através dos cálculos das médias da densidade ótica (D.O) das amostras após 72 horas de cultivo celular. Para este estudo foi considerado apenas as cavidades que continham somente células. A média foi utilizada como referência, sendo consideradas 100% de células viáveis para efeito comparativo. As células não infectadas apresentaram média de D.O de 0.209 (100%) com desvio padrão de 8,588 e as células com conjunto de reagentes de transfecção apresentaram uma média de D.O de 0.191 (91%) com desvio padrão de 8,628, o que caracterizou uma redução de 9% da viabilidade celular. As células com o conjunto de reagentes de transfecção e siRNA obtiveram uma média de D.O de 0.164 com desvio padrão de 8,306 (86%), o que caracterizou uma morte celular de 14%. Os resultados apresentaram significância estatística ( $p < 0,002$ ) quando comparados ao meio contendo somente células (Figura 6.1)

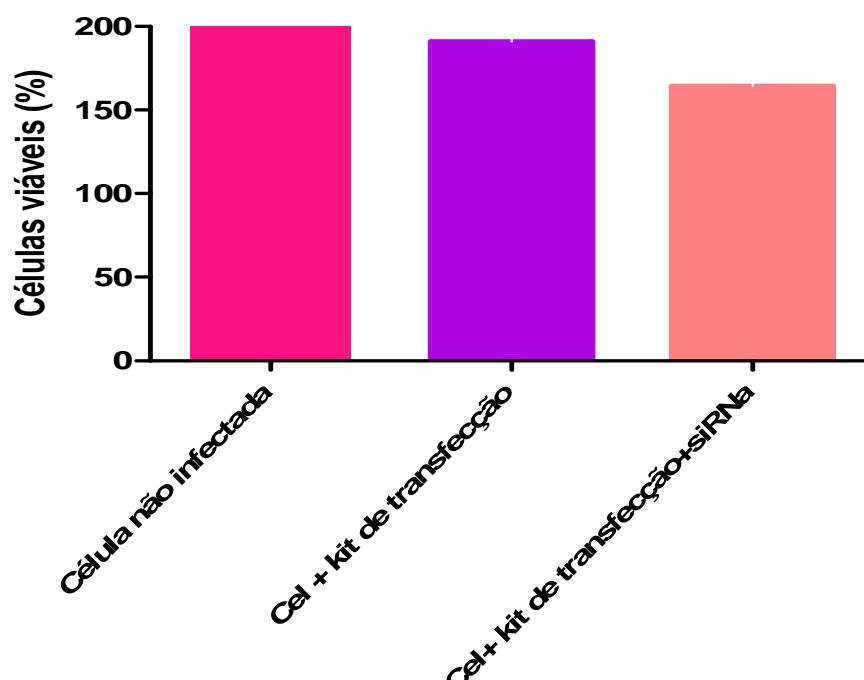
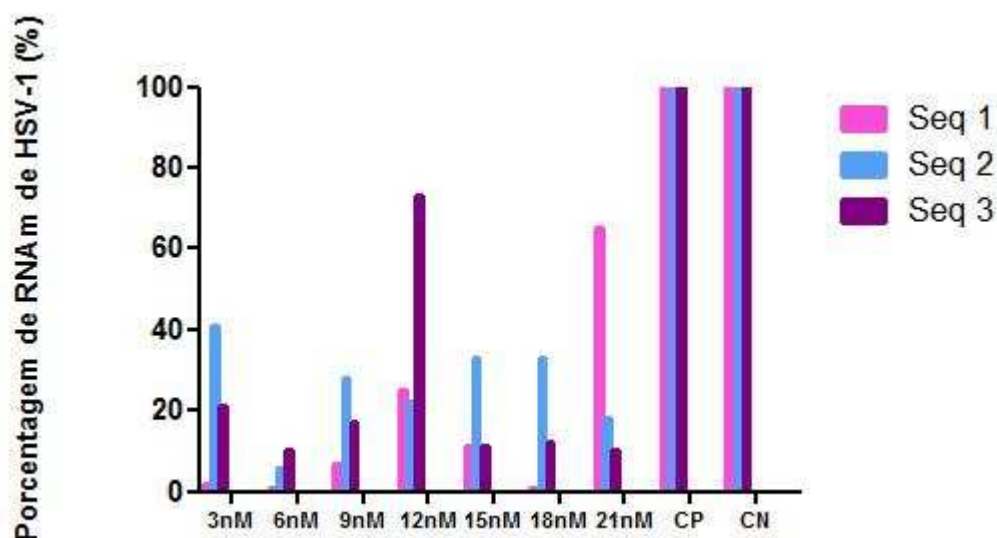


Figura 6. 1: Células viáveis após transfecção com siRNA.

#### 6.4 Curva Dose Dependente

Para avaliar a melhor concentração de siRNA no estudo *in vitro* do HSV-1 foi realizado a construção de uma curva dose dependente com as concentrações de 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  e 35  $\mu\text{M}$ , que corresponderam as concentrações finais em nM de 3nM, 6nM, 9nM, 12nM, 15nM, 18nM e 21nM. A concentração que apresentou o maior grau de silenciamento foi a de 10 $\mu\text{M}$  (6nM) (figura 6.2). Após a definição da melhor concentração de siRNA seguiu-se os experimentos complementares para a verificação silenciamento.



**Figura 6. 2:** Curva dose - dependente demonstrando a melhor concentração de siRNA (CN- Controle negativo/ CP- Controle positivo).

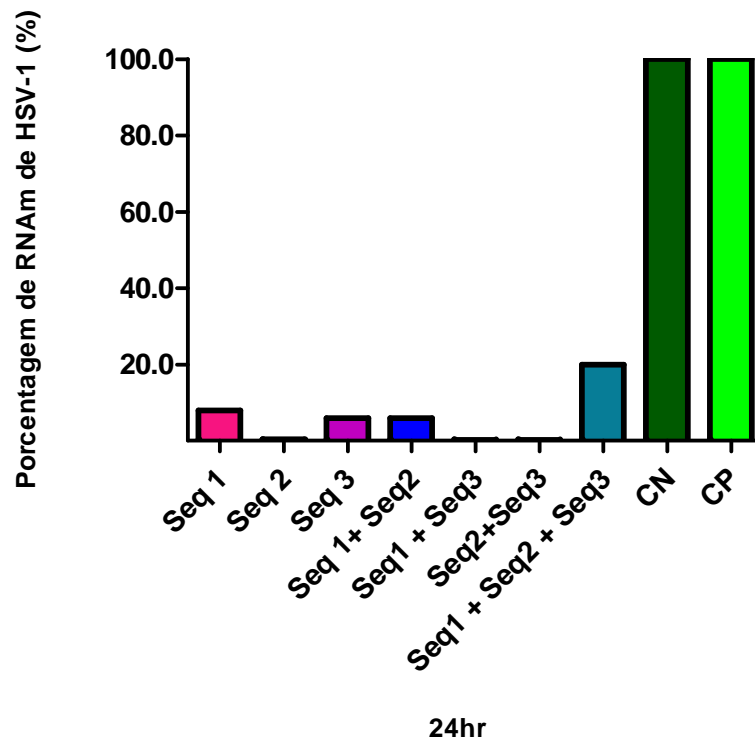
## 6.5 Análise do silenciamento por PCR em tempo real

Para a avaliação do silenciamento no ciclo replicativo do HSV-1 foram utilizadas três sequências específicas de HSV-1 para inibir a replicação viral pela função da ribonucleotideo redutase (UL-39). Para efeito de comparação foi analisada uma sequência não específica (controle negativo) e foi considerada como controle positivo amostras infectadas não transfectadas. Este controle para análise da quantificação relativa da PCR em tempo real serviu como amostra calibradora. Todas as amostras foram comparadas relativamente ao controle positivo e normalizadas pelo controle endógeno. Com isso, avaliamos a porcentagem de replicação remanescente e, conseqüentemente, o grau de silenciamento produzido pelas sequências, isoladamente e em diferentes combinações.

Para o estudo do melhor tempo de transfecção as amostras foram analisadas a cada 24 horas no total de 72 horas que corresponde ao ciclo replicativo do HSV-1 *in vitro*. No primeiro dia pós-infecção verificou-se a capacidade de silenciamento do HSV-1 com todas as sequências utilizadas. Neste primeiro dia verificou-se que a combinação de duas sequências foi mais efetiva no silenciamento do que as sequências analisadas isoladamente. A combinação das sequências 2 e 3 e a combinação das sequências 1 e 3 obtiveram uma inibição da



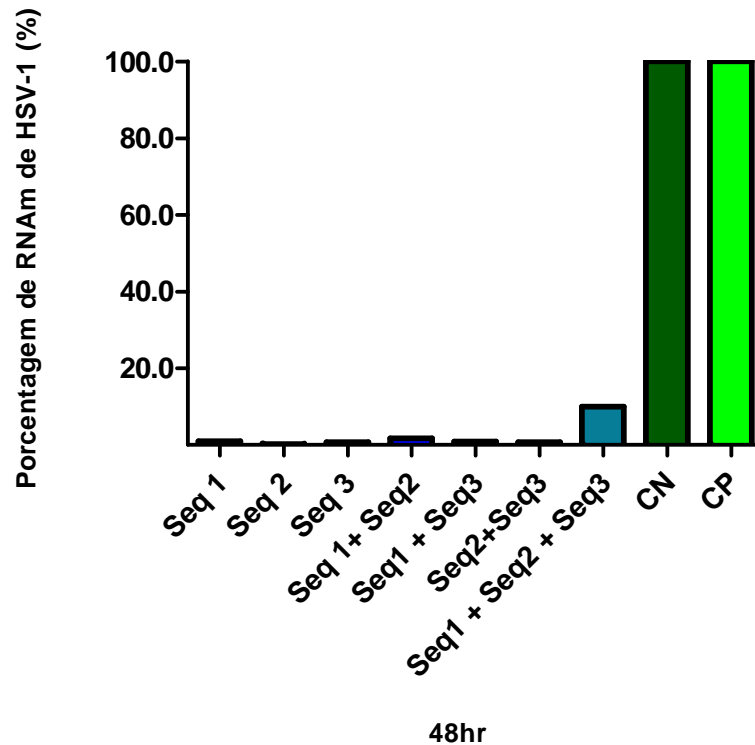
replicação do HSV-1 de 99,8%, porém a combinação das sequências 1, 2 e 3 apresentou uma redução na taxa de inibição de 80%. A combinação das sequências 1e 2 resultou em taxa de inibição de 94%. Na análise isolada das sequências verificou-se que a sequência 2 apresentou uma inibição bastante representativa (99,6%). As sequências 1 e 3 isoladamente apresentaram taxas de inibição de 92% e 94%, respectivamente. Em todas as sequências analisadas foi possível a inibição da replicação do HSV-1 quando comparadas as células infectadas e não transfectadas (controle-positivo) e ao controle negativo (Figura 6.3).



**Figura 6. 3:** Silenciamento da replicação do HSV-1 24 h.p.i com sequências de siRNA e controles (CN- Controle negativo; CP- Controle positivo).

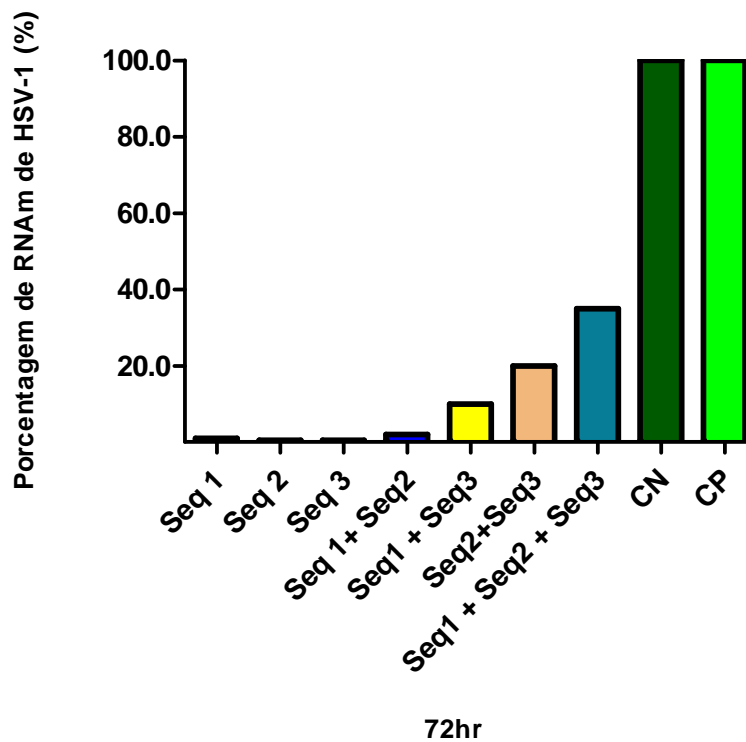
No segundo dia pós-infecção pode-se observar uma efetiva inibição da replicação, tanto nas seqüências isoladas como na combinação de sequências. Todos os resultados demonstraram altas taxas de inibição, variando entre 90% e 99% de silenciamento. As sequências 1 e 2 isoladamente obtiveram taxas de inibição de 99% e a sequência 3 um silenciamento de 99,3 %. As combinações de sequências seq 1+2, seq 1+3, seq 2+3, seq. 1+2+3 obtiveram taxas de inibição de 98,3%, 99,1%, 99,3% e 90% respectivamente. Em todas as sequências analisadas

a inibição da replicação do HSV-1 foi comparada com controles positivos e negativos (Figura 6.4).



**Figura 6. 4:** Silenciamento da replicação do HSV-1 48 h.p.i com seqüências siRNA e controles (CN- Controle negativo; CP-Controle positivo).

No último dia após infecção (72 horas) verificou-se que as seqüências isoladas apresentaram as maiores taxas de inibição quando comparadas a combinação das seqüências. As seqüências 1, 2 e 3 apresentaram taxas de inibição de 99%, 99,05% e 99% respectivamente, e a combinação das seqüências 1 e 2, 1 e 3, 2 e 3, 1,2 e 3 apresentaram taxas de inibição de 98%, 90%, 80%, 65% respectivamente (Figura 6.5).



**Figura 6. 5:** Silenciamento da replicação do HSV-1 72 h.p.i com sequências de siRNA e controles (CN- Controle negativo; CP-Controle positivo).

### 6.6 Análise da inibição da replicação por plaqueamento.

Após a análise das sequências de siRNA para a inibição do ciclo replicativo de HSV-1 por PCR em tempo real, analisamos a redução da infecção por meio da técnica de plaqueamento. Para este estudo todas as sequências foram analisadas em concentração de 10  $\mu$ M e as placas de cultura celular foram coradas com cristal violeta 48 horas pós-infecção.

Todas as sequências analisadas foram comparadas com o controle positivo, representada por uma amostra infectada, porém, não transfectada. Os resultados foram relatados como média  $\pm$  desvio padrão (DP) e o teste utilizado para a determinação da inibição foi o teste t, com valor de p menor que 0,05 sendo considerado significativo.

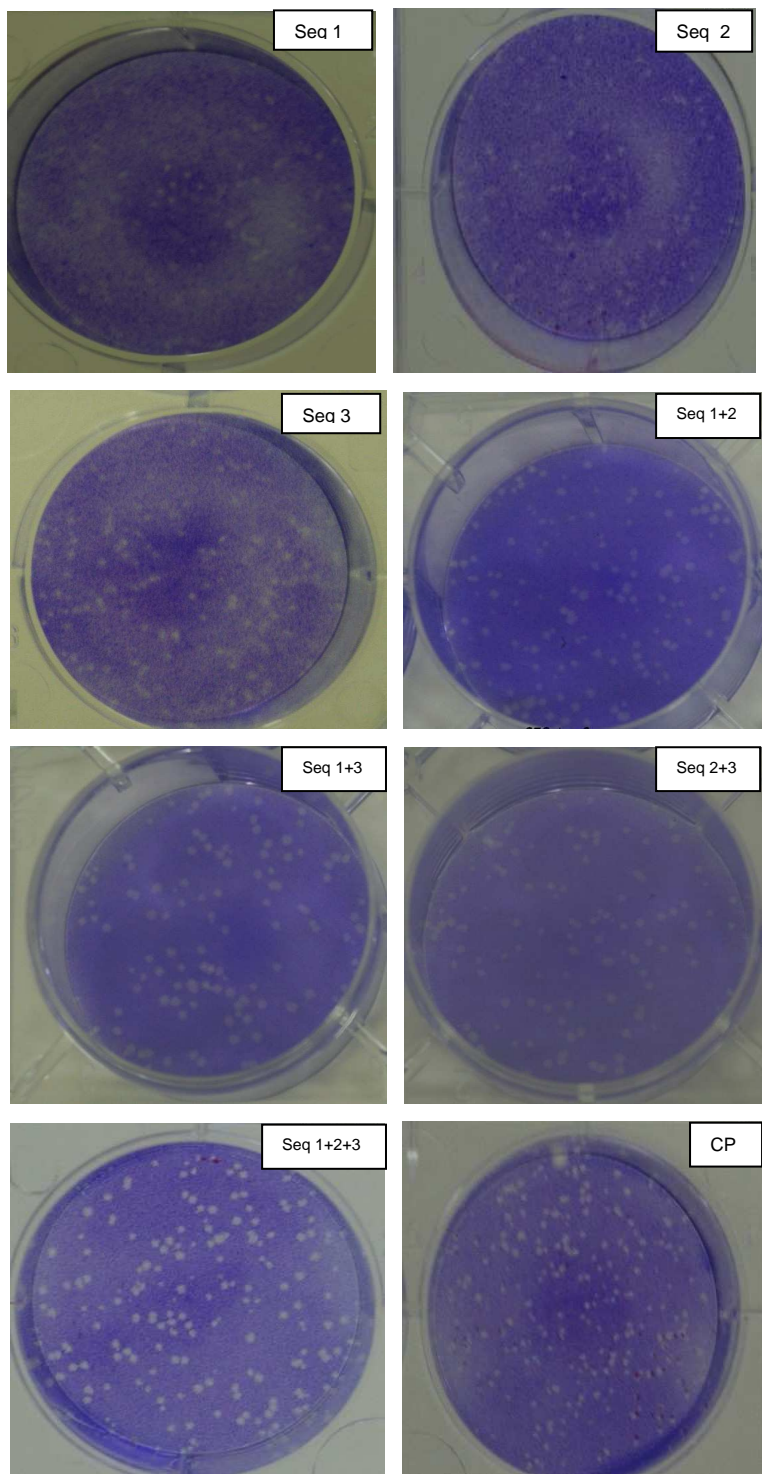
Na análise do efeito de redução do ciclo replicativo do HSV-1 observou-se uma significativa redução de unidades formadoras de placas (PFU) quando foram comparadas ao controle positivo do estudo, as placas infectadas com 210 PFU/mL. A sequência 1 foi a que apresentou resultados mais significantes, com taxa de

silenciamento de 79,17%. As sequências 2 e 3 apresentaram taxas de silenciamento homogêneas, de 57% e 59%, respectivamente. Foi possível observar que a utilização de sequências isoladas de siRNA foi mais efetiva no silenciamento do ciclo replicativo do HSV-1 do que a combinação das sequências. As sequências 1+2, 1+3, 2+3 e 1+2+3 apresentaram taxas de inibição de 46,3%, 42%, 47% e 17% respectivamente (Tabela 6.3).

**Tabela 6. 3:** Análise da taxa da inibição da replicação do HSV-1 utilizando siRNA por plaqueamento (S- Sequência / CP- Controle Positivo).

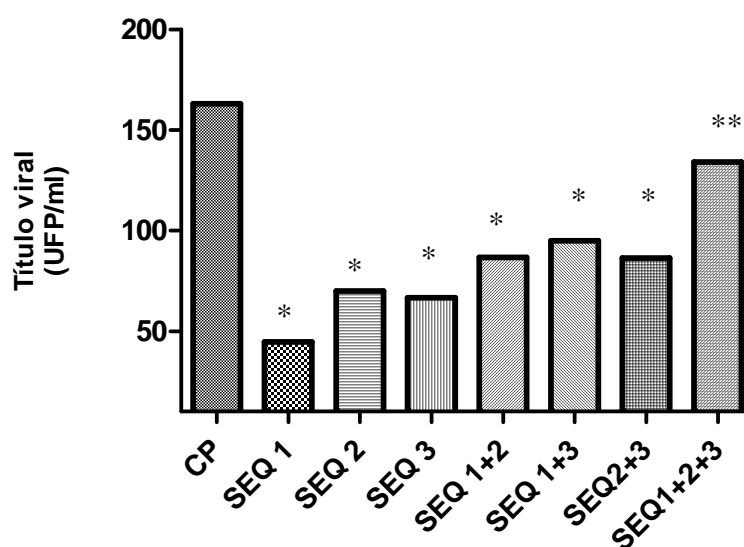
Seq.	Título Viral	Silenciamento (%)
CP	162.7 ± 13.53	0
S1	44.67 ± 4.807	72
S2	70.00 ± 17.62	57
S3	66.67 ± 17.84	59
S1+2	86.67 ± 31.86	46
S1+3	95.00 ± 14.73	42
S2+3	86.33 ± 14.24	47
S1+2+3	134.0 ± 2.000	17

Os siRNAs específicos (Seq 1, Seq 2 e Seq 3) foram capazes de inibir a infecção pelo HSV-1 em monocamadas de células Vero após transfecção, fato este que não ocorreu com as monocamadas de células somente infectadas com o HSV-1 (Fig.6.6 ).



**Figura 6. 6:** Análise do silenciamento por plaqueamento em células Vero transfectadas e infectadas com o HSV-1. Células Vero transfectadas com a sequência 1, sequência 2, sequência 3, sequências 1+2, sequências 1+3, sequências 2+3 e sequências 1+2+3, respectivamente, e células Vero infectadas, mas, não transfectadas (CP).

As diferenças observadas nos títulos virais obtidos pela utilização das sequências isoladas (Seq 1, Seq 2 e Seq 3) e da combinação das sequências (Seq 1+2, Seq 1+3, Seq 2+3) foram significantes estatisticamente ( $P < 0,05$ ), porém, não o foi quando a combinação de sequências 1+2+3 foi utilizada ( $P > 0,05$ ).



**Figura 6. 7:** Títulos virais (PFU/ml) obtidos em células Vero após transfecção com siRNA (CP, controle positivo). \* Significativo para  $p < 0,05$  no teste *t* de Student \*\* Não significativo ( $p > 0,05$ ) no teste *t* student.

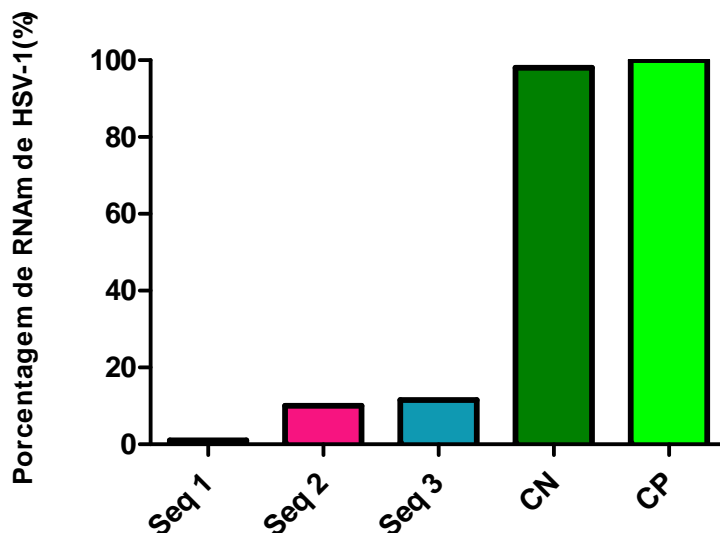
### 6.7 Análise da eficiência do silenciamento gênico em HSV-1 isolado de paciente

Após o estabelecimento das condições do silenciamento em cultura celular, uma amostra de paciente infectado com HSV-1 diagnosticado no estudo prospectivo, foi escolhida para avaliação da eficiência do silenciamento gênico (amostra 2, swab). Esta avaliação foi realizada através da PCR em tempo real e plaqueamento.

A concentração de 10  $\mu$ M e o tempo de 48 horas pós-infecção já estabelecidos anteriormente foram utilizadas. Todas as amostras foram infectadas com 25 PFU/ml.

A análise por PCR em tempo real demonstrou que a amostra infectada e transfectada com a seq. 1 apresentou uma taxa de silenciamento de 99%, a

sequência 2 apresentou uma taxa de silenciamento de 90% e a sequência 3 uma taxa de silenciamento de 88,5% (Figura 6.8)

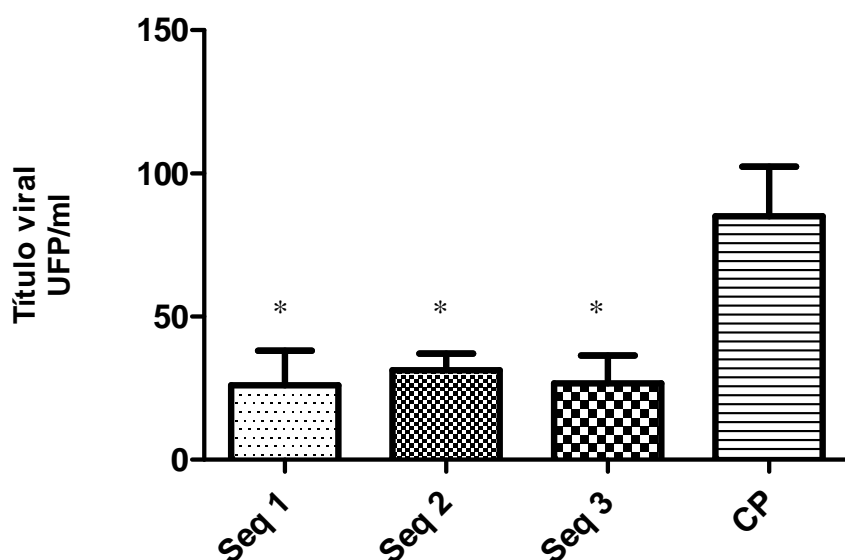


**Figura 6. 8:** Análise do silenciamento gênico em HSV-1 isolado de paciente por PCR em tempo real (CN- controle negativo; CP- controle positivo)

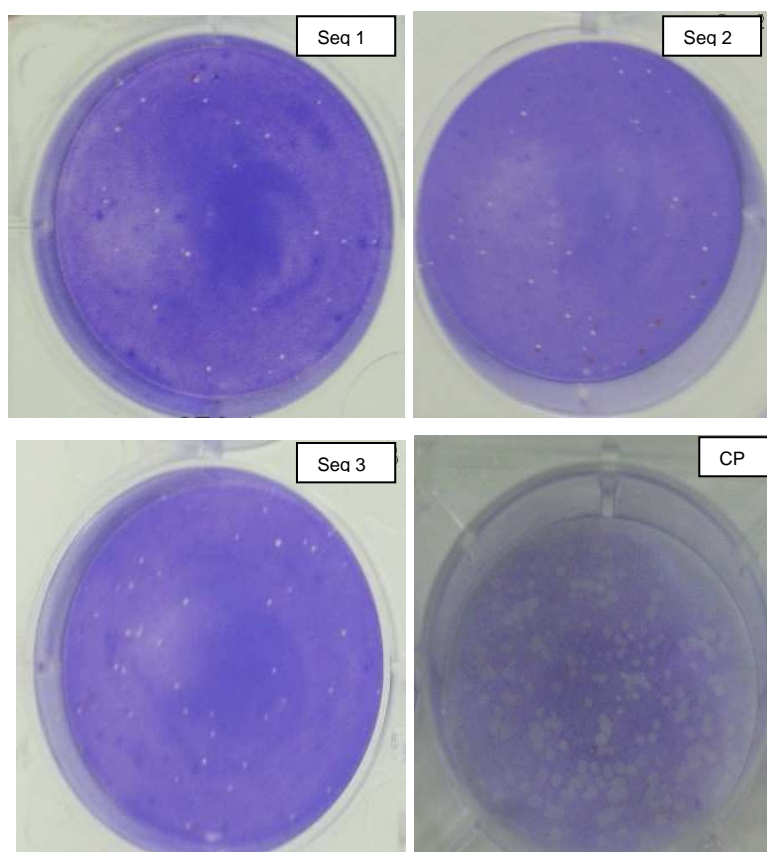
Por meio da análise por plaqueamento, a sequência 1 foi a que apresentou maior taxa de inibição com 69,4%. A sequência 2 teve uma taxa de inibição de 63,1% e a sequência 3 de 68,6%. As sequências 1 e 3 apresentaram poucas diferenças em relação às taxas de inibição. Todos os resultados tiveram significância estatística com  $p < 0,05$  (Tabela 6.4).

**Tabela 6. 4:** Taxa da inibição da replicação do HSV-1 proveniente do paciente positivo (amostra 2 , swab) por plaqueamento em células Vero (S- Sequência / CP- Controle Positivo).

Seq	Título Viral	Silenciamento (%)
CP	85.00 ± 10.00	0
S1	26.00 ± 7.000	69,4
S2	31.33 ± 3.333	63,1
S3	26.67 ± 5.667	68,6



**Figura 6. 9**: Comparação do número de unidades formadoras de placas (PFU) observadas na ausência (controle) e presença dos siRNA. \* Significativo para  $p < 0,05$  no teste  $t$  de Student \*\* Não significativo para  $p > 0,05$  no teste  $t$  student.



**Figura 6. 10**: Plaqueamento para análise da inibição da replicação com siRNA. Células Vero tranfectadas com a seq 1, seq 2, seq 3 respectivamente e células Vero infectada e não tranfectada (CP).



## 7 Discussão

### 7.1 Diagnóstico do HSV-1

A infecção pelos HHVs, seja do tipo 1 ou do tipo 2 é uma das mais prevalentes em todo o mundo. A cada ano 640.000 novos casos de herpes genital são diagnosticados no Brasil, e tanto o HSV-1 como o HSV-2 são relevantes para a saúde pública brasileira. Estudos recentes mostram que a prevalência de anticorpos anti-HSV-1 na população brasileira é de 67,2% e de HSV-2 é de 11,3%, sendo esta última mais predominante em adolescente e jovens (Clemens & Farhat, 2010).

No estudo retrospectivo deste trabalho não foi possível traçar o perfil do grupo estudado devido ao número de amostras estudadas e a aleatoriedade deste trabalho. No entanto, o objetivo do nosso estudo foi otimizar o diagnóstico do HSV-1 em diferentes tipos de amostras biológicas. As amostras de soro do estudo retrospectivo tiveram como característica apresentarem a co-infecção com o HIV. O Brasil já contabiliza 592.914 casos de HIV/AIDS registrados desde 1980 (Ministério da Saúde, 2010).

Infecções oportunistas têm sido reconhecidas como complicações mais comuns da infecção pelo HIV/AIDS devido à deficiência imunológica, sendo a principal razão das internações e substancial morbidade nestes pacientes. Praticamente toda a mortalidade relacionada ao HIV é precedida por uma infecção oportunista (Brooks *et al.*, 2009). Dentre as infecções virais mais comuns em pacientes HIV positivos estão aquelas por CMV, HSV-1 e HSV-2, VZV e EBV (Roberts *et al.*, 2009). Estes vírus são, geralmente, adquiridos na infância ou na idade adulta jovem, estabelecem um estado de latência assintomática e podem, eventualmente, reativar com o aparecimento dos sintomas clínicos nas idades mais avançadas ou devido a infecção pelo HIV (Chakraborty *et al.*, 2010).

Em pacientes infectados com HIV/AIDS, coinfeções com HSV-1 e HSV-2 são comuns e a prevalência pode ser até três vezes maior do que na população não infectada pelo HIV (Strick *et al.*, 2006). Além disso, um diagnóstico eficiente e rápido destas viroses em pacientes imunocomprometidos auxilia o início imediato do tratamento, evitando a cronicidade destas viroses nestes pacientes.

Neste trabalho comparamos a eficiência do teste sorológico imunoenzimático (Diasorin, Vercelli, Italy) e do PCR em tempo real através do sistema SYBR Green. Das 21 amostras analisadas neste estudo 90,48%, foram anti-HSV positivas e 100% dos pacientes foram positivos para o HSV-1 por PCR em tempo real. Neste contexto, concluímos que a PCR em tempo real é uma ferramenta útil para detecção da co-infecção HIV/HSV. O teste sorológico (ELISA) permitiu a identificação de somente a presença de anticorpos anti-HSV nas amostras estudadas, não possibilitando a diferenciação entre HSV- 1 e HSV-2. O PCR em tempo real possibilitou a análise quantitativa destas amostras, sendo a quantificação viral importante para o diagnóstico e tratamento das infecções por HSV e VZV em pacientes imunossuprimidos (Schmutzhard *et al.*, 2004).

No estudo prospectivo fizemos a comparação entre as técnicas de isolamento viral, considerada “padrão- ouro” para a identificação do HSV-1 e a PCR em tempo real através do sistema SYBR Green, em amostras de raspado das lesões mucocutâneas (swab) e saliva. O isolamento viral é uma técnica que requer habilidade, pois para a sua coleta o espécime precisa ser “a fresco” com o vírus viável (Schalasta *et al.*, 2000). O método da cultura celular é uma importante alternativa para detecção do HSV, apesar de um ser uma técnica trabalhosa e pouco sensível (Aurelius *et al.*, 1991).

Neste estudo 100% das amostras do raspado das lesões de pacientes infectados com HSV-1 foram positivas tanto segundo a técnica do isolamento viral quanto para a PCR em tempo real. Para as amostras de saliva somente 50% foram positivas por isolamento viral e 100% foram positivas pelo PCR em Tempo Real. Estudos anteriores já demonstraram que o HSV DNA em amostras de saliva é relativamente difícil de ser isolado em cultura celular (Chichili *et al.*, 2003; Robert *et al.*, 2003). Contudo, neste estudo foi possível isolar o HSV-1 da saliva de pacientes infectados.

Utilizando a técnica de PCR em tempo real todas as amostras foram positivas, demonstrando que mesmo na presença de baixa carga viral é possível a detecção do HSV-DNA em diferentes tipos de amostras, como lesões mucocutâneas, saliva e soro.

Um aumento na detecção de HSV DNA utilizando a PCR em Tempo Real já foi descrito anteriormente (Robert *et al.*, 2003).

Este estudo possibilitou a otimização da PCR em tempo real em diferentes tipos de amostras, o que foi particularmente importante para a detecção de HSV-1 na saliva, pois a maioria dos indivíduos infectados com este vírus, apesar de serem indivíduos assintomáticos, permanecem produzindo partículas virais (Liljeqvist *et al.*, 2009), o que caracteriza uma das formas de transmissão desta virose (Scott *et al.*, 1997).

Em relação ao sistema SYBR Green utilizado nestes estudos, além de ser um sistema relativamente mais barato em relação a outros sistemas de PCR em tempo real, possui a vantagem da análise pela curva *melting* que possibilita a fácil discriminação entre produtos de PCR específicos e não específicos (Schalasta *et al.*, 2000).

Em relação aos títulos virais as amostras de pacientes com coinfeção HIV/HSV apresentaram títulos virais variando de  $2,32 \times 10^4$  a  $3,08 \times 10^7$ . Nas amostras de pacientes monoinfectados com HSV-1 os títulos virais nas amostras de lesões mucocutâneas variaram de  $3,85 \times 10^3$  a  $1,10 \times 10^4$  e nas amostras de saliva variaram entre  $9,96 \times 10^3$  a  $2,44 \times 10^3$ . Estes resultados mostraram-se bastante satisfatórios em relação á especificidade e sensibilidade da PCR em tempo real.

## 7.2 Silenciamento do HSV-1 utilizando siRNA

A habilidade de pequenos RNAs (siRNA) promoverem um eficiente silenciamento de genes específicos pode constitui uma nova terapia baseada em siRNA (Convertine *et al.*, 2010). Esses siRNA já foram observados como potentes antivirais na estratégia de defesa de plantas, porém, o impacto destes em células de mamíferos como supressores de hospedeiros patógenos naturais das células ainda é bastante controverso (Wu *et al.*, 2009).

O siRNA vem sendo desenvolvido para diversas viroses como uma nova modalidade terapêutica antiviral (Bhuyan *et al.*, 2004). Dentre as muitas viroses nas quais foram utilizados siRNA contra patógeno humanos *in vitro* estão incluídas as infecções por HIV/AIDS, poliovírus, HCV, HPV, vírus da dengue e vírus da hepatite Delta (Adelman *et al.*, 2002; Capodici *et al.*, 2002; Gitlin *et al.*,

2002; Jiang & Milner, 2002; McCaffrey *et al.*, 2002; Novina *et al.*, 2002; Chang & Taylor, 2003; Jia & Sun, 2003).

Neste estudo foi avaliada a eficiência da inibição da replicação do HSV-1 *in vitro* utilizando três sequências específicas para a região UL-39 sendo este gene codificante de uma subunidade da ribonucleotideo redutase. O HSV-1 não pode utilizar a ribonucleotideo redutase celular e, portanto, está dependente da sua própria redutase para replicação. Tem sido demonstrado que a enzima viral pode ser necessária para o crescimento do vírus dentro das células e para a patogênese e reativação viral a partir de latência em hospedeiros infectados em estudos com modelos animais (Zhe *et al.*, 2008). Além disso, para se estudar o potencial terapêutico do siRNA vários fatores são necessários: modo de entrega do siRNA na célula, eficiente transfecção do siRNA e citotoxicidade gerada na célula hospedeira ou alvo (Convertine *et al.*, 2010).

Neste estudo foi utilizado o conjunto de reagentes siPORT™ Amine (Ambion/Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), que é baseado em poliaminas que agem de forma semelhante aos lipídios catiônicos. São nanopartículas de carga positiva que formam complexos com os siRNAs tipicamente carregados de carga negativa, facilitando a penetração destes através da membrana plasmática (Kim & Kim, 2009). O tempo de transfecção, que pode variar 4 horas a 48 horas e a citotoxicidade podem variar de acordo com a linhagem de células utilizada (Ambion, 2007).

A fim de avaliar, a citotoxicidade do conjunto de reagentes, a análise da viabilidade celular foi realizada. Foi observada uma perda de viabilidade celular de 9% no controle (célula e conjuntos de reagentes) e de 14% na presença de siRNA, demonstrando que a perda de viabilidade celular não foi significativa. Estudos anteriores de Grayson e colaboradores (2006) demonstraram a cinética e eficácia de seis conjuntos de reagentes de transfecção comerciais. O conjunto de reagentes siPORT™ Amine (Ambion/Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) produziu nas linhagens de células utilizadas um excelente silenciamento e revelou que a citotoxicidade é linhagem celular dependente, com silenciamento a partir das 12 horas de transfecção .

Em nosso estudo, o melhor tempo de transfecção foi observado em 48 horas corroborando estudo prévio (Zhang *et al.*, 2008). Longos períodos de

transfecção podem diminuir a viabilidade celular pela citotoxicidade inerente aos componentes do conjunto de reagentes, levando à diminuição dos complexos de transfecção com o passar do tempo (Capodici *et al.*, 2002).

A utilização do meio OPTIMEM<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), que contém baixas concentrações de soro fetal bovino, foi considerada ideal, uma vez que baixas concentrações de soro provavelmente asseguram a internalização eficiente sem prejudicar o crescimento celular (Akhtar & Benter, 2007).

Através da construção da curva-dose dependente foi comprovado, que para nossas condições de estudo, a melhor concentração de siRNA utilizada foi a de 10 $\mu$ M, que correspondeu a concentração final de 6 nM. Nos estudos de silenciamento gênico em células de mamíferos, observa-se o uso de uma variedade de concentrações de siRNAs, que tipicamente variam de 20 nM (Semizarov *et al.* 2003) a 200 nM (Wu *et al.* 2003). Porém, outros estudos já demonstraram que concentrações acima de 10nM já são suficientes para um silenciamento efetivo (Bhuyan *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2010).

Além disso, o controle endógeno utilizado neste estudo (RNA 18s) se mostrou ideal para o estudo da quantificação relativa na PCR em tempo real, pois não houve grandes variações entre a média dos CTs das amostras analisadas. Segundo Nystrom e colaboradores (2004), entre diversos genes de silenciamento utilizado para medir a razão de transcrição em células infectadas com o HSV-1, o RNA 18s foi aquele que apresentou um protocolo de normalização mais aplicável para o protótipo de silenciamento gênico.

Estudos anteriores já comprovaram que a ação de siRNA é curva dose dependente (Huang *et al.*, 2010), sendo esta essencial para o estabelecimento da magnitude da concentração de siRNA necessária para o silenciamento viral (Bhuyan *et al.*, 2004).

Neste estudo, a sequência 1 apresentou a maior taxa de silenciamento em todas as condições analisadas (PCR em tempo real e plaqueamento). Nos estudos de Zhe e colaboradores (2008) a sequência que apresentou a maior taxa de silenciamento foi a seq 2 nas condições analisadas. A diferença da taxa de silenciamento entre as sequências de siRNA pode ter ocorrido por fatores relacionados com as condições de transfecções realizada, cepa viral e tipo de

célula utilizada. Além disso, no estudo realizado anteriormente, a transfecção foi realizada com a utilização de vetores plasmidiais. A vantagem da utilização de vetores plasmidiais é que estes permitem um efeito não transitório dos siRNAs que serão expressos continuamente, porém, a construção destes é bastante trabalhosa (Peng *et al.*, 2007; Hajeri & Singh, 2009).

Apesar das três sequências serem homólogas ao RNAm da região UL 39 do HSV-1, estas diferem na sua eficácia de silenciamento. A variação deste silenciamento tem sido relatada previamente (Khvorova *et al.*, 2003), indicando que a diferença na eficácia não pode ser atribuída somente às diferenças na eficácia da transfecção. Os motivos para as diferenças na eficácia dos siRNA não são bem compreendidos, mas foi postulado que podem ser devidas as diferenças nas propriedades termodinâmicas dos siRNAs (Khvorova *et al.*, 2003), bem como a estrutura secundária e terciária do RNA que dificulta o seu reconhecimento pelo siRNA (Bhuyan *et al.*, 2004).

Após o estabelecimento das condições ideais para o silenciamento da cepa do HSV-1 adaptada em cultura celular, foi testada a eficiência destas sequências para inibir a replicação do HSV-1 em uma amostra de paciente infectado somente com HSV-1 e alta carga viral (amostra 2, swab). Nesta análise, a seq 1 apresentou a maior taxa de silenciamento (99%). Estudos anteriores utilizando isolados de amostras clínicas de pacientes infectados com HSV-1 também apresentaram expressivas taxas de silenciamento (Bhuyan *et al.*, 2004). O melhor tempo de transfecção foi detectado 48 p.i, sendo observado que 24 p.i já era demonstrado silenciamento nas amostras provenientes da cepa KOS. Estudos anteriores com HSV-1 utilizando siRNA já tinham observado tal cinética de silenciamento (Bhuyan *et al.*, 2004; Mallanna *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008).

Em relação á combinação das sequências utilizadas, verificou-se que a utilização das sequências isoladas revelou a maior taxa de silenciamento (99%-99,6%) do que a combinação das sequências. Pela PCR em tempo real a combinação das sequências apresentou excelentes taxas de silenciamento em 48 horas p.i, que variaram entre 65% e 99,8%. Por plaqueamento viral a utilização de duas sequências resultou em taxas de silenciamento inferiores em relação ao PCR em tempo real sendo que as três sequências combinadas não obtiveram resultados estatisticamente significantes por plaqueamento.

A diferença nas taxas de silenciamento entre a PCR em tempo real e o plaqueamento se deve ao fato que o siRNA não é propagado ou perpetuado nos mamíferos e, portanto, cada divisão celular dilui a quantidade de siRNA por célula e, por conseguinte o efeito inibitório (Bhuyan *et al.*, 2004). Sugere-se que esta perda possa ter impacto sobre as diferentes taxas de inibição observadas entre a PCR em tempo real e o plaqueamento. A PCR em tempo real é bastante sensível e possui rápida capacidade de quantificar as taxas de transcrição de uma gama de genes em várias ordens de magnitude (Nystrom *et al.*, 2004).

O HSV-1 possui muitos supressores de respostas antivirais, incluindo ICP 47, gC e gE (Fries *et al.*, 1986; Dubin *et al.*, 1991; Fruh *et al.*, 1995; Gitlin *et al.*, 2002) e muitos mecanismos de escape do sistema siRNA em diversos processos biológicos. Entretanto, nosso estudo e prévios com HSV-1 (Bhuyan *et al.*, 2004) não revelaram a interferência de tais mecanismos.

Em estudo prévio a combinação de mais de uma sequência de siRNA para HSV-1 não demonstrou aumento do sinergismo do silenciamento para HSV-1 (Zhang *et al.*, 2008). Os siRNAs muitas vezes podem apresentar um impacto direto ou indireto sobre processos biológicos em células eucarióticas (Czech & Hannon, 2011). Em nosso estudo, porém isto foi verificado através do plaqueamento, sendo a seq 1 a mais eficiente com redução de 72,84% das células infectadas com a cepa KOS e 69,4% das células infectadas com o isolado de pacientes. Já com relação as sequências 2 e 3, as mesmas apresentaram taxas de silenciamento semelhantes, tanto na técnica de PCR em tempo real como por plaqueamento.

O desenvolvimento de siRNAs mediando terapia antiviral traz importantes perspectivas, principalmente para populações infectadas com cepas resistentes aos antivirais convencionais. Nos últimos anos, o número de cepas resistentes aos tratamentos convencionais contra o HSV-1 tem crescido bastante, principalmente em pacientes imunocomprometidos (Coen, 1996; Kimberlin & Whitley, 1996).

A descoberta de pequenos RNAs de interferência (siRNA), que podem eficientemente silenciar genes específicos e inibir a expressão de proteínas através da seletiva degradação do RNAm, pode trazer uma revolução para os tratamentos baseados em siRNA. A efetiva entrega intracelular dos siRNAs ainda

significa um obstáculo antes de usá-los na prática clínica (Bahadori, 2008; White, 2008; Convertine *et al.*, 2010).

Os resultados encontrados neste trabalho foram satisfatórios, tendo sido possível estabelecer a PCR em tempo real como ferramenta adequada para a quantificação absoluta e relativa do HSV-1. A otimização destas técnicas permitiu a realização do diagnóstico molecular do HSV-1 e mensurar a taxa de inibição da replicação do HSV-1 utilizando siRNA. Além disso, foi possível inibir em até 99% o silenciamento gênico do HSV-1 *in vitro*, mostrando que o siRNA pode ser utilizado como uma alternativa de terapia antiviral futura. Contudo, uma das perspectivas deste projeto é avaliar a utilização da combinação das sequências de siRNA em amostras de isolados de pacientes infectados com HSV-1 *in vitro* e realizar a tentativa do silenciamento do HSV-1 em modelos *in vivo*.



## 8. Conclusões

- A técnica de PCR em tempo real foi eficiente para detecção do HSV-1 tanto nas amostras (soro) do estudo retrospectivo como nas amostras do estudo prospectivo (lesões mucocutâneas e saliva).
- A otimização da PCR em tempo real para detecção e quantificação do HSV-1 em cultura celular, lesão, soro, saliva foi satisfatória, principalmente em amostras de saliva, que geralmente apresentam baixa carga viral.
- A utilização da PCR em tempo real possibilitou a detecção da coinfeção do HSV-1 em pacientes infectados com HIV e foi mais sensível quando comparado com o isolamento viral e do que a detecção dos anticorpos anti-HSV por ELISA.
- A concentração ideal de siRNAs para inibição da replicação do HSV-1 *in vitro* foi de 10  $\mu$ M (concentração final de 6nM) e o melhor tempo de tranfecção foi estabelecido em 48 horas após a infecção.
- O siRNA mostrou resultados bastante satisfatórios, gerando inibição tanto na infecção pelo o HSV-1 (cepa KOS) como na infecção de isolados de amostras clínicas de pacientes infectados.

## 9. Bibliografia

- Abrantes JL. Estudo da atividade anti-HSV-1 de terpenos isolados de algas pardas marinhas. [dissertação], Niterói (RJ), Universidade Federal Fluminense, **2006**.75pp.
- Adelman ZN , Sanchez-Vargas I , Travanty EA , Carlson JO , Beaty BJ , Blair CD , Olson KE. RNA silencing of dengue virus type 2 replication in transformed C6/36 mosquito cells transcribing an inverted-repeat RNA derived from the virus genome. *J Virol.* **2002**;76(24):12925-12933.
- Agrawal N , Dasaradhi PV , Mohmmmed A , Malhotra P , Bhatnagar RK , Mukherjee SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev.* **2003**;67(4):657-685.
- Aigner A. Delivery systems for the direct application of siRNAs to induce RNA interference (RNAi) in vivo. *J Biomed Biotechnol.* **2006a**;2006(4):71659.
- Aigner A. Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: strategies based on the direct application of siRNAs. *J Biotechnol.* **2006b**;124(1):12-25.
- Akhtar S , Benter IF. Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. *J Clin Invest.* **2007**;117(12):3623-3632.
- Ambion. siRNA Screening Guide. Disponível em: [www.ambion.com/RNAi](http://www.ambion.com/RNAi). **2007**
- Andrighetti-Frohner CR , Sincero TC , da Silva AC , Savi LA , Gaido CM , Bettega JM Mancini M , de Almeida MT , Barbosa RA , Farias MR , Barardi CR , Simoes CM. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. *Fitoterapia.* **2005**;76(3-4):374-378.
- Antinori A , Cingolani A , Lorenzini P , Giancola ML , Uccella I , Bossolasco S , Grisetti S , Moretti F , Vigo B , Bongiovanni M , Del Grosso B , Arcidiacono MI , Fibbia GC , Mena M , Finazzi MG , Guaraldi G , Ammassari A , d'Arminio Monforte A , Cinque P , De Luca A. Clinical epidemiology and survival of progressive multifocal leukoencephalopathy in the era of highly active antiretroviral therapy: data from the Italian Registry Investigative Neuro AIDS (IRINA). *J Neurovirol.* **2003**;9 Suppl 1:47-53.
- Aravin A , Gaidatzis D , Pfeffer S , Lagos-Quintana M , Landgraf P , Lovino N Morris P , Brownstein MJ , Kuramochi-Miyagawa S , Nakano T , Chien M , Russo JJ , Ju J , Sheridan R , Sander C , Zavolan M , Tuschl T. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature.* **2006**;442(7099):203-207.
- Aravin AA , Lagos-Quintana M , Yalcin A , Zavolan M , Marks D , Snyder B , Gaasterland T , Meyer J , Tuschl T. The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell.* **2003**;5(2):337-350.

Ashley R , Cent A , Maggs V , Nahmias A , Corey L. Inability of enzyme immunoassays to discriminate between infections with herpes simplex virus types 1 and 2. *Ann Intern Med.* **1991**;115(7):520-526.

Aurelius E , Johansson B , Skoldenberg B , Staland A , Forsgren M. Rapid diagnosis of herpes simplex encephalitis by nested polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. *Lancet.* **1991**;337(8735):189-192.

Bahadori M. New Advances in RNAs. *Arch Iran Med.* **2008**;11(4):435-443.

Baker BF , Monia BP. Novel mechanisms for antisense-mediated regulation of gene expression. *Biochim Biophys Acta.* **1999**;1489(1):3-18.

Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* **2009**;136(2):215-233.

Bhattarakosol P , Visaprom S , Sangdara A , Mungmee V. Increase of genital HSV-1 and mixed HSV-1 and HSV-2 infection in Bangkok, Thailand. *J Med Assoc Thai.* **2005**;88 Suppl 4:S300-304.

Bhuyan PK , Kariko K , Capodici J , Lubinski J , Hook LM , Friedman HM , Weissman D. Short interfering RNA-mediated inhibition of herpes simplex virus type 1 gene expression and function during infection of human keratinocytes. *J Virol.* **2004**;78(19):10276-10281.

Bioinformática course virology (2003) <http://bioinformatica.upf.edu/2003/projectes03/4.5.1/genomas.gif>

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

Boehmer PE , Lehman IR. Herpes simplex virus DNA replication. *Annu Rev Biochem.* **1997**;66:347-384.

Bohnsack MT , Czaplinski K , Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA.* **2004**;10(2):185-191.

Borchert GM , Lanier W , Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* **2006**;13(12):1097-1101.

Bower M , Palmieri C , Dhillon T. AIDS-related malignancies: changing epidemiology and the impact of highly active antiretroviral therapy. *Curr Opin Infect Dis.* **2006**;19(1):14-19.

Brady RC , Bernstein DI. Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Res.* **2004**;61(2):73-81.

- Brennecke J , Aravin AA , Stark A , Dus M , Kellis M , Sachidanandam R , Hannon GJ. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell*. **2007**;128(6):1089-1103.
- Brooks JT , Kaplan JE , Holmes KK , Benson C , Pau A , Masur H. HIV-associated opportunistic infections--going, going, but not gone: the continued need for prevention and treatment guidelines. *Clin Infect Dis*. **2009**;48(5):609-611.
- Capodici J , Kariko K , Weissman D. Inhibition of HIV-1 infection by small interfering RNA-mediated RNA interference. *J Immunol*. **2002**;169(9):5196-5201.
- Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)* **2005**; 109(4): 365-79.
- Carrozza MJ , DeLuca NA. Interaction of the viral activator protein ICP4 with TFIID through TAF250. *Mol Cell Biol*. **1996**;16(6):3085-3093.
- Carthew RW , Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. **2009**;136(4):642-655.
- Celum C , Levine R , Weaver M , Wald A. Genital herpes and human immunodeficiency virus: double trouble. *Bull World Health Organ*. **2004**;82(6):447-453.
- Chakraborty N , Bhattacharyya S , De C , Mukherjee A , Bhattacharya D , Santra S , Sarkar RN , Banerjee D , Guha SK , Datta UK , Chakrabarti S. Incidence of multiple Herpesvirus infection in HIV seropositive patients, a big concern for Eastern Indian scenario. *Virol J*. **2010**;7:147.
- Chang J , Taylor JM. Susceptibility of human hepatitis delta virus RNAs to small interfering RNA action. *J Virol*. **2003**;77(17):9728-9731.
- Chayavichitsilp P , Buckwalter JV , Krakowski AC , Friedlander SF. Herpes simplex. *Pediatr Rev*. **2009**;30(4):119-129; quiz 130.
- Chendrimada TP , Gregory RI , Kumaraswamy E , Norman J , Cooch N , Nishikura K , Shiekhattar R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. **2005**;436(7051):740-744.
- Chichili GR , Athmanathan S , Farhatullah S , Gangopadhyay N , Jalali S , Pasricha G , Sharma S. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of herpes simplex virus, varicella-zoster virus and cytomegalovirus in ocular specimens. *Curr Eye Res*. **2003**;27(2):85-90.
- Choudhuri S. Lesser known relatives of miRNA. *Biochem Biophys Res Commun*. **2009**;388(2):177-180.
- Clemens SA , Farhat CK. Seroprevalence of herpes simplex 1-2 antibodies in Brazil. *Rev Saude Publica*. **2010**;44(4):726-734.

Clifford DB , Yiannoutsos C , Glicksman M ,Simpson DM ,Singer EJ ,Piliero PJ Marra CM , Francis GS , McArthur JC , Tyler KL , Tselis AC , Hyslop NE. HAART improves prognosis in HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology*. **1999**;52(3):623-625.

Coburn GA , Cullen BR. Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. *J Virol*. **2002**;76(18):9225-9231.

Coen DM. Antiviral drug resistance in herpes simplex virus. *Adv Exp Med Biol*. **1996**;394:49-57.

Colbere-Garapin F , Blondel B , Saulnier A , Pelletier I , Labadie K. Silencing viruses by RNA interference. *Microbes Infect*. **2005**;7(4):767-775.

Convertine AJ , Diab C , Prieve M , Paschal A , Hoffman AS , Johnson PH , Stayton PS. pH-Responsive Polymeric Micelle Carriers for siRNA Drugs. *Biomacromolecules*. **2010**.

Corey L , Spear PG. Infections with herpes simplex viruses (1). *N Engl J Med*. **1986**;314(11):686-691.

Corey L , Wald A , Patel R , Sacks SL , Tyring SK , Warren T , Douglas JM, Jr., Paavonen J , Morrow RA , Beutner KR , Stratchounsky LS , Mertz G ,Keene ON , Watson HA , Tait D , Vargas-Cortes M. Once-daily valacyclovir to reduce the risk of transmission of genital herpes. *N Engl J Med*. **2004**;350(1):11-20.

Cook PD. Medicinal chemistry strategies for antisense research. *Antisense Research and Applications*,**1993**;149–188

Czech B , Hannon GJ. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat Rev Genet*. **2011**;12(1):19-31.

De Clercq E , Naesens L , De Bolle L , Schols D , Zhang Y , Neyts J. Antiviral agents active against human herpesviruses HHV-6, HHV-7 and HHV-8. *Rev Med Virol*. **2001**;11(6):381-395.

De Clercq E. Antivirals and antiviral strategies. *Nat Rev Microbiol*. **2004**;2(9):704-720.

de Vries W , Haasnoot J , Fouchier R , de Haan P , Berkhout B. Differential RNA silencing suppression activity of NS1 proteins from different influenza A virus strains. *J Gen Virol*. **2009**;90(Pt 8):1916-1922.

Denli AM , Tops BB , Plasterk RH , Ketting RF , Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. **2004**;432(7014):231-235.

Dixon RA , Schaffer PA. Fine-structure mapping and functional analysis of temperature-sensitive mutants in the gene encoding the herpes simplex virus type 1 immediate early protein VP175. *J Virol*. **1980**;36(1):189-203.

- Dolan A , Jamieson FE , Cunningham C , Barnett BC , McGeoch DJ. The genome sequence of herpes simplex virus type 2. *J Virol.* **1998**;72(3):2010-2021.
- Donahue RE , Clark SC. Granulocyte colony-stimulating factors as therapeutic agents. *Immunol Ser.* **1992**;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. Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J Exp Med.* **1992**;176(4):1125-1135.
- Dubin G , Socolof E , Frank I , Friedman HM. Herpes simplex virus type 1 Fc receptor protects infected cells from antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Virol.* **1991**;65(12):7046-7050.
- Dykxhoorn DM , Novina CD , Sharp PA. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2003**;4(6):457-467.
- Elbashir SM , Lendeckel W , Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* **2001**;15(2):188-200.
- Esquenazi D , Wigg MD , Miranda MM , Rodrigues HM , Tostes JB , Rozental S , da Silva AJ , Alviano CS. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Res Microbiol.* **2002**;153(10):647-652.
- Fatahzadeh M , Schwartz RA. Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J Am Acad Dermatol.* **2007**;57(5):737-763; quiz 764-736.
- Flakow. *Molecular Virology in Principles of Microbiology*, Ronald Atlas. McGraw-Hill Science/Engineering/Math; **1996**; 2nd edition
- Fire A , Xu S , Montgomery MK , Kostas SA , Driver SE , Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* **1998**;391(6669):806-811.
- Fries LF , Friedman HM , Cohen GH , Eisenberg RJ , Hammer CH , Frank MM. Glycoprotein C of herpes simplex virus 1 is an inhibitor of the complement cascade. *J Immunol.* **1986**;137(5):1636-1641.
- Fruh K , Ahn K , Djaballah H , Sempe P , Van Endert PM , Tampe R , Peterson PA, Yang Y. A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature.* **1995**;375(6530):415-418.
- Gilbert C , Bestman-Smith J , Boivin G. Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. *Drug Resist Updat.* **2002**;5(2):88-114.

Girard A , Sachidanandam R , Hannon GJ , Carmell MA. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*. **2006**;442(7099):199-202.

Gitlin L , Karelsky S , Andino R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature*. **2002**;418(6896):430-434.

Glazov E , Phillips K , Budziszewski GJ , Schob H , Meins F, Jr. , Levin JZ. A gene encoding an RNase D exonuclease-like protein is required for post-transcriptional silencing in *Arabidopsis*. *Plant J*. **2003**;35(3):342-349.

Gleave ME , Monia BP. Antisense therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*. **2005**;5(6):468-479.

Gong Y , Matthews B , Cheung D , Tam T , Gadawski I , Leung D , Holan G , Raff J , Sacks S. Evidence of dual sites of action of dendrimers: SPL-2999 inhibits both virus entry and late stages of herpes simplex virus replication. *Antiviral Res*. **2002**;55(2):319-329.

GOOGLE (2010) Disponível em [www.google.com.br](http://www.google.com.br)

Grayson AC , Ma J , Putnam D. Kinetic and efficacy analysis of RNA interference in stably and transiently expressing cell lines. *Mol Pharm*. **2006**;3(5):601-613.

Gu B , DeLuca N. Requirements for activation of the herpes simplex virus glycoprotein C promoter in vitro by the viral regulatory protein ICP4. *J Virol*. **1994**;68(12):7953-7965.

Guerrier-Takada C , Gardiner K , Marsh T , Pace N , Altman S. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*. **1983**;35(3 Pt 2):849-857.

Haasnoot J , de Vries W , Geutjes EJ , Prins M , de Haan P , Berkhout B. The Ebola virus VP35 protein is a suppressor of RNA silencing. *PLoS Pathog*. **2007a**;3(6):e86.

Haasnoot J , Westerhout EM , Berkhout B. RNA interference against viruses: strike and counterstrike. *Nat Biotechnol*. **2007b**;25(12):1435-1443.

Hajeri PB , Singh SK. siRNAs: their potential as therapeutic agents--Part I. Designing of siRNAs. *Drug Discov Today*. **2009**;14(17-18):851-858.

Hammond SM , Bernstein E , Beach D , Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. **2000**;404(6775):293-296.

Hancock MH, Corcoran JA, Smiley JR. Herpes simplex virus regulatory proteins VP16 and ICP0 counteract an innate intranuclear barrier to viral gene expression. *Virology*. **2006**;352(1):237-252.

- Hancock MH , Corcoran JA , Smiley JR. Herpes simplex virus regulatory proteins VP16 and ICP0 counteract an innate intranuclear barrier to viral gene expression. *Virology*. **2006**;352(1):237-252.
- Hill A , Jugovic P , York I , Russ G , Bennink J , Yewdell J , Ploegh H , Johnson D. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature*. **1995**;375(6530):411-415.
- Huang F , Zhou J , Yang Z , Cui L , Zhang W , Yuan C , Yang S , Zhu J , Hua X. RNA interference inhibits hepatitis E virus mRNA accumulation and protein synthesis in vitro. *Vet Microbiol*. **2010**;142(3-4):261-267.
- Hutvagner G , McLachlan J , Pasquinelli AE , Balint E , Tuschl T , Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*. **2001**;293(5531):834-838.
- Hutvagner G , Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*. **2002**;297(5589):2056-2060.
- Jacque JM , Triques K , Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature*. **2002**;418(6896):435-438.
- Jere D , Arote R , Jiang HL , Kim YK , Cho MH , Cho CS. Bioreducible polymers for efficient gene and siRNA delivery. *Biomed Mater*. **2009**;4(2):025020.
- Ji J , Glaser A , Wernli M , Berke JM , Moradpour D , Erb P. Suppression of short interfering RNA-mediated gene silencing by the structural proteins of hepatitis C virus. *J Gen Virol*. **2008**;89(Pt 11):2761-2766.
- Jia Q , Sun R. Inhibition of gammaherpesvirus replication by RNA interference. *J Virol*. **2003**;77(5):3301-3306.
- Jiang M , Milner J. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference. *Oncogene*. **2002**;21(39):6041-6048.
- Kanwar JR , Mahidhara G , Kanwar RK. MicroRNA in human cancer and chronic inflammatory diseases. *Front Biosci (Schol Ed)*. **2010**;2:1113-1126.
- Kawada J , Kimura H , Ito Y , Hoshino Y , Tanaka-Kitajima N , Ando Y , Futamura M , Morishima T. Comparison of real-time and nested PCR assays for detection of herpes simplex virus DNA. *Microbiol Immunol*. **2004**;48(5):411-415.
- Ketting RF , Fischer SE , Bernstein E , Sijen T , Hannon GJ , Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev*. **2001**;15(20):2654-2659.
- Khaliq S , Jahan S , Ijaz B , Ahmad W , Asad S , Hassan S. Inhibition of hepatitis C virus genotype 3a by siRNAs targeting envelope genes. *Arch Virol*. **2010**.



- Khvorova A , Reynolds A , Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. **2003**;115(2):209-216.
- Kichler A. Gene transfer with modified polyethylenimines. *J Gene Med*. **2004**;6 Suppl 1:S3-10.
- Kim DH , Longo M , Han Y , Lundberg P , Cantin E , Rossi JJ. Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. *Nat Biotechnol*. **2004**;22(3):321-325.
- Kim WJ , Kim SW. Efficient siRNA delivery with non-viral polymeric vehicles. *Pharm Res*. **2009**;26(3):657-666.
- Kimberlin D. Herpes simplex virus, meningitis and encephalitis in neonates. *Herpes*. **2004**;11 Suppl 2:65A-76A.
- Kimberlin DW , Whitley RJ. Antiviral resistance: mechanisms, clinical significance, and future implications. *J Antimicrob Chemother*. **1996**;37(3):403-421.
- Kimberlin DW. Herpes simplex virus infections of the central nervous system. *Semin Pediatr Infect Dis*. **2003**;14(2):83-89.
- Kimberlin DW , Whitley RJ. Neonatal herpes: what have we learned. *Semin Pediatr Infect Dis*. **2005**;16(1):7-16.
- Kronke J , Kittler R , Buchholz F , Windisch MP , Pietschmann T , Bartenschlager R, Frese M. Alternative approaches for efficient inhibition of hepatitis C virus RNA replication by small interfering RNAs. *J Virol*. **2004**;78(7):3436-3446.
- Kruger K , Grabowski PJ , Zaug AJ , Sands J , Gottschling DE , Cech TR. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell*. **1982**;31(1):147-157.
- 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(2):95-109.
- Lagrota MHC, Wigg MD, Santos MMG, Miranda MMFS, Câmara FP, Couceiro J. NSS, Costa SS. Inhibitory activity of extracts of *Althernantera brasiliiana* (Amaranthaceae) against the herpes simplex virus. *Phytother. Res.*, 8: 358-361.
- Leidner RS ,Aboulafia DM. Recrudescence Kaposi's sarcoma after initiation of HAART: a manifestation of immune reconstitution syndrome. *AIDS Patient Care STDS*. **2005**;19(10):635-644.
- Leuschner PJ , Ameres SL , Kueng S , Martinez J. Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep*. **2006**;7(3):314-320.

Leyland B , Kennedy MR , Wimberly YH , Levine BJ , Cherpes TL. Serologic detection of herpes simplex virus type 2 antibodies among pregnant women using a point-of-care test from Focus Diagnostics. *J Clin Virol.* **2009**;44(2):125-128.

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. Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2004**;101(5):1350-1355.

Liljeqvist JA , Tunback P , Norberg P. Asymptomatically shed recombinant herpes simplex virus type 1 strains detected in saliva. *J Gen Virol.* **2009**;90(Pt 3):559-566.

Lin C , Zhong Z , Lok MC , Jiang X , Hennink WE , Feijen J , Engbersen JF. Linear poly(amido amine)s with secondary and tertiary amino groups and variable amounts of disulfide linkages: synthesis and in vitro gene transfer properties. *J Control Release.* **2006**;116(2):130-137.

Lin C , Zhong Z , Lok MC , Jiang X , Hennink WE , Feijen J , Engbersen JF. Novel bio-reducible poly(amido amine)s for highly efficient gene delivery. *Bioconjug Chem.* **2007a**;18(1):138-145.

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

Lindberg A , Kreivi JP. Splicing inhibition at the level of spliceosome assembly in the presence of herpes simplex virus protein ICP27. *Virology.* **2002**;294(1):189-198.

Liu D , Ren T , Gao X. Cationic transfection lipids. *Curr Med Chem.* **2003**;10(14):1307-1315.

Liu J , Carmell MA , Rivas FV , Marsden CG , Thomson JM , Song JJ , Hammond SM , Joshua-Tor L , Hannon GJ. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science.* **2004**;305(5689):1437-1441.

Livak KJ. Detailed structure of the *Drosophila melanogaster* stellate genes and their transcripts. *Genetics.* **1990**;124(2):303-316.

Lupi O, Silva AG, Pereira Jr. AC. Herpes simples genital, uma doença sexualmente transmissível. *F Med (BR)* **1995**;110:77-98

Lupi O, Pereira Jr. AC. Herpes simples. In: Lupi O, Silva AG, Pereira Jr. AC. *Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento.* Rio de Janeiro: Medsi, **2000**:43-70

Mack GS. MicroRNA gets down to business. *Nat Biotechnol.* **2007**;25(6):631-638.

MacRae IJ , Ma E , Zhou M , Robinson CV , Doudna JA. In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2008**;105(2):512-517.

- Mallanna SK , Rasool TJ , Sahay B , Aleyas AG , Ram H , Mondal B , Nautiyal B , Premraj A , Sreekumar E , Yadav MP. Inhibition of Anatid Herpes Virus-1 replication by small interfering RNAs in cell culture system. *Virus Res.* **2006**;115(2):192-197.
- Manjunath N , Wu H , Subramanya S , Shankar P. Lentiviral delivery of short hairpin RNAs. *Adv Drug Deliv Rev.* **2009**;61(9):732-745.
- Mark HD , Nanda JP , Roberts J , Rompalo A , Melendez JH , Zenilman J. Performance of focus ELISA tests for HSV-1 and HSV-2 antibodies among university students with no history of genital herpes. *Sex Transm Dis.* **2007**;34(9):681-685.
- Markine-Goriaynoff N , Georgin JP , Goltz M , Zimmermann W , Broll H , Wamwayi HM , Pastoret PP , Sharp PM , Vanderplasschen A. The core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase-mucin encoded by bovine herpesvirus 4 was acquired from an ancestor of the African buffalo. *J Virol.* **2003**;77(3):1784-1792.
- Martinez J , Tuschl T. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev.* **2004**;18(9):975-980.
- Matranga C , Tomari Y , Shin C , Bartel DP , Zamore PD. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell.* **2005**;123(4):607-620.
- McCaffrey AP , Meuse L , Pham TT , Conklin DS , Hannon GJ , Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature.* **2002**;418(6893):38-39.
- McCaffrey AP , Nakai H , Pandey K , Huang Z , Salazar FH , Xu H , Wieland SF , Marion PL , Kay MA. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol.* **2003**;21(6):639-644.
- McCarthy AM , McMahan L , Schaffer PA. Herpes simplex virus type 1 ICP27 deletion mutants exhibit altered patterns of transcription and are DNA deficient. *J Virol.* **1989**;63(1):18-27.
- McGeoch DJ , Cook S , Dolan A , Jamieson FE , Telford EA. Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *J Mol Biol.* **1995**;247(3):443-458.
- McGeoch DJ , Dolan A , Ralph AC. Toward a comprehensive phylogeny for mammalian and avian herpesviruses. *J Virol.* **2000**;74(22):10401-10406.
- McGeoch DJ , Rixon FJ , Davison AJ. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res.* **2006**;117(1):90-104.
- Melancon JM , Foster TP , Kousoulas KG. Genetic analysis of the herpes simplex virus type 1 UL20 protein domains involved in cytoplasmic virion envelopment and virus-induced cell fusion. *J Virol.* **2004**;78(14):7329-7343.

Merdan T , Kopecek J , Kissel T. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* **2002**;54(5):715-758.

Mertz GJ , Rosenthal SL , Stanberry LR. Is herpes simplex virus type 1 (HSV-1) now more common than HSV-2 in first episodes of genital herpes? *Sex Transm Dis.* **2003**;30(10):801-802.

Mettenleiter TC. Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res.* **2004**;106(2):167-180.

Ministério da Saúde Brasil- Página consultada em 20 de dezembro de 2010, <<http://www.aids.gov.br/>>.

Miralles P , Berenguer J , Garcia de Viedma D , Padilla B , Cosin J , Lopez-Bernaldo de Quiros JC , Munoz L , Moreno S , Bouza E. Treatment of AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy with highly active antiretroviral therapy. *AIDS.* **1998**;12(18):2467-2472.

Miranda MMFS. *Viroses dermatópicas* In: *Introdução a virologia humana* (Santos, N.S.O., Romanos, M.T.V., Wigg, M.D.) **2002**.1ª edição. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro (RJ): 75 - 85.

Morfin F , Thouvenot D. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. *J Clin Virol.* **2003**;26(1):29-37.

Nahmias AJ, Dowdle WR. *Antigenic and biologic differences in herpesvirus hominis.* *Prog. Med Virol.*, **1968**..10:110-159.

Nahmias AJ, Lee FK, Beckmann-Nahmias F. Sero-epidemiological and sociological patterns of herpes simplex infections in the world. *Scand J Infect Dis Suppl.* **1990**;69:19-36

Novina CD , Murray MF , Dykxhoorn DM , Beresford PJ , Riess J , Lee SK , Collman RG , Lieberman J , Shankar P , Sharp PA. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med.* **2002**;8(7):681-686.

Nystrom K ,Biller M ,Grahn A ,Lindh M ,Larson G ,Olofsson S. Real time PCR for monitoring regulation of host gene expression in herpes simplex virus type 1-infected human diploid cells. *J Virol Methods.* **2004**;118(2):83-94.

Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO) (2010) - <http://www.who.int/en/>

Orban TI , Izaurralde E. Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA.* **2005**;11(4):459-469.

O´ Toole JM, Aubert M, Kotsakis A, Blaho JA. Mutation of the Protein Tyrosine Kinase Consensus Site in the Herpes Simplex Virus 122 Gene Alters ICP22 Posttranslational Modification. *Virology*, **2003**, 305.p.153- 16

Palella FJ, Jr. , Delaney KM , Moorman AC , Loveless MO , Fuhrer J , Satten GA, Aschman DJ , Holmberg SD. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med.* **1998**;338(13):853-860.

Passos MRL. Nosso compromisso e sua participação, 2 [editorial]. *J Bras Doencas Sex Transm.* **2002**;14(3):3.

Pellett PE, Roizman B. "The family Herpesviridae: A Brief introduction" in David M. Knipe and Peter M. Howley (Orgs.) *Fields Virology*, **2007** 15 ed., edition, volume 2. Wolters Kluwer Health 2479-2601

Peng Y , Lu JX , Shen XF. shRNA driven by Pol II/T7 dual-promoter system effectively induce cell-specific RNA interference in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **2007**;360(2):496-500.

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

Preston CM. Repression of viral transcription during herpes simplex virus latency. *J Gen Virol.* **2000**;81(Pt 1):1-19.

Qian S , Zhong X , Yu L , Ding B , de Haan P , Boris-Lawrie K. 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.* **2009**;106(2):605-610.

Quinn JP , Dalziel RG , Nash AA. Herpes virus latency in sensory ganglia--a comparison with endogenous neuronal gene expression. *Prog Neurobiol.* **2000**;60(2):167-179.

Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2007**;8(1):23-36.

Rand TA , Petersen S , Du F , Wang X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell.* **2005**;123(4):621-629.

Rao DD , Vorhies JS , Senzer N , Nemunaitis J. siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev.* **2009**;61(9):746-759.

Reischl D , Zimmer A. Drug delivery of siRNA therapeutics: potentials and limits of nanosystems. *Nanomedicine.* **2009**;5(1):8-20.

Robert PY , Adenis JP , Denis F , Alain S , Ranger-Rogez S. Herpes simplex virus DNA in corneal transplants: prospective study of 38 recipients. *J Med Virol.* **2003**;71(1):69-74.

Roberts MS , Boundy A , O'Hare P , Pizzorno MC , Ciuffo DM , Hayward GS. Direct correlation between a negative autoregulatory response element at the cap site of

the herpes simplex virus type 1 IE175 (alpha 4) promoter and a specific binding site for the IE175 (ICP4) protein. *J Virol.* **1988**;62(11):4307-4320.

Roberts S. "Herpes simplex virus: incidence of neonatal herpes simplex virus, maternal screening, management during pregnancy, and HIV." *Curr Opin Obstet Gynecol* **2009**; 21(2): 124-30.

Roizman B. The function of herpes simplex virus genes: a primer for genetic engineering of novel vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1996**;93(21):11307-11312.

Roizman, B. & Sears, A.E. *Herpes Simplex Viruses and Their Replication*. In: *Fields Virology* (Knipe, D. & Howley, P.), 3ª edição. **1996**. Editora Lippincott-Raven, Philadelphia (PA): 2231-2295.

Roizman B ,Whitley RJ. The nine ages of herpes simplex virus. *Herpes.* **2001**;8(1):23-27.

Sacks WR , Greene CC , Aschman DP , Schaffer PA. Herpes simplex virus type 1 ICP27 is an essential regulatory protein. *J Virol.* **1985**;55(3):796-805.

Sandri-Goldin RM , Mendoza GE. A herpesvirus regulatory protein appears to act post-transcriptionally by affecting mRNA processing. *Genes Dev.* **1992**;6(5):848-863.

Schalasta G , Arents A , Schmid M , Braun RW , Enders G. Fast and type-specific analysis of herpes simplex virus types 1 and 2 by rapid PCR and fluorescence melting-curve-analysis. *Infection.* **2000**;28(2):85-91.

Schirren H , Schirren CG , Schlupen EM , Volkenandt M , Kind P. [Exacerbation of Hailey-Hailey disease by infection with herpes simplex virus. Detection with polymerase chain reaction]. *Hautarzt.* **1995**;46(7):494-497.

Schmutzhard J , Merete Riedel H , Zwegberg Wirgart B , Grillner L. Detection of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2 and varicella-zoster virus in skin lesions. Comparison of real-time PCR, nested PCR and virus isolation. *J Clin Virol.* **2004**;29(2):120-126.

Schwartz RA. Kaposi's sarcoma: an update. *J Surg Oncol.* **2004**;87(3):146-151.

Science Photo (**2010**) <http://www.sciencephoto.com>,

Scott DA , Coulter WA , Lamey PJ. Oral shedding of herpes simplex virus type 1: a review. *J Oral Pathol Med.* **1997**;26(10):441-447.

Semizarov D, Frost L, Sarthy A, Kroeger P, Halbert DN, Fesik SW. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**; 100(11):6347-52.

- Sheldrick P , Berthelot N. Inverted repetitions in the chromosome of herpes simplex virus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **1975**;39 Pt 2:667-678.
- Shlomai A , Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology.* **2003**;37(4):764-770.
- Sledz CA , Williams BR. RNA interference in biology and disease. *Blood.* **2005**;106(3):787-794.
- Smith CA , Bates P , Rivera-Gonzalez R , Gu B , DeLuca NA. ICP4, the major transcriptional regulatory protein of herpes simplex virus type 1, forms a tripartite complex with TATA-binding protein and TFIIB. *J Virol.* **1993**;67(8):4676-4687.
- Smith JS , Herrero R , Bosetti C , Munoz N , Bosch FX , Eluf-Neto J , Castellsague X , Meijer CJ , Van den Brule AJ , Franceschi S , Ashley R. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst.* **2002**;94(21):1604-1613.
- Smith JS , Robinson NJ. Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review. *J Infect Dis.* **2002**;186 Suppl 1:S3-28.
- Sonntag KC. MicroRNAs and deregulated gene expression networks in neurodegeneration. *Brain Res.* **2010**;1338:48-57.
- Souret FF , Kastenmayer JP , Green PJ. AtXRN4 degrades mRNA in Arabidopsis and its substrates include selected miRNA targets. *Mol Cell.* **2004**;15(2):173-183.
- Spear PG , Eisenberg RJ , Cohen GH. Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology.* **2000**;275(1):1-8.
- Spear PG , Longnecker R. Herpesvirus entry: an update. *J Virol.* **2003**;77(19):10179-10185.
- Spear PG. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol.* **2004**;6(5):401-410.
- Spear PG , Manoj S , Yoon M , Jogger CR , Zago A , Myscofski D. Different receptors binding to distinct interfaces on herpes simplex virus gD can trigger events leading to cell fusion and viral entry. *Virology.* **2006**;344(1):17-24.
- Springer KL , Weinberg A. Cytomegalovirus infection in the era of HAART: fewer reactivations and more immunity. *J Antimicrob Chemother.* **2004**;54(3):582-586.
- Stephenson ML , Zamecnik PC. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1978**;75(1):285-288.
- Storch GA. Diagnostic virology. *Clin. Infect. Dis.*, 31: 739-51, **2001**.

Strick LB , Wald A , Celum C. Management of herpes simplex virus type 2 infection in HIV type 1-infected persons. *Clin Infect Dis*. **2006**;43(3):347-356.

Takahashi Y , Nishikawa M , Takakura Y. Nonviral vector-mediated RNA interference: its gene silencing characteristics and important factors to achieve RNAi-based gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. **2009**;61(9):760-766.

Tokatlian T , Segura T. siRNA applications in nanomedicine. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. **2010**;2(3):305-315.

Tufekci KU , Oner MG , Genc S , Genc K. MicroRNAs and Multiple Sclerosis. *Autoimmune Dis*. **2011**;2011:807426.

Vader P , Van der Aa LJ , Engbersen JF , Storm G , Schiffelers RM. Disulfide-Based Poly(amido amine)s for siRNA Delivery: Effects of Structure on siRNA Complexation, Cellular Uptake, Gene Silencing and Toxicity. *Pharm Res*. **2010**.

Vagin VV , Sigova A , Li C , Seitz H , Gvozdev V , Zamore PD. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science*. **2006**;313(5785):320-324.

Wadsworth S , Jacob RJ , Roizman B. Anatomy of herpes simplex virus DNA. II. Size, composition, and arrangement of inverted terminal repetitions. *J Virol*. **1975**;15(6):1487-1497.

Walder RY, Walder JA. Role of RNase H in hybrid-arrested translation by antisense oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1988**; 85(14):5011-5.

Wagner EK.. *The Homepage of Dr. Edward K. Wagner*. [serial online] Citado em 13 de dezembro de 2010. **2003** Disponível em: <http://darwin.bio.uci.edu/~faculty/wagner/index.html>

Wald A , Ashley-Morrow R. Serological testing for herpes simplex virus (HSV)-1 and HSV-2 infection. *Clin Infect Dis*. **2002**;35(Suppl 2):S173-182.

Wang Y , Kato N , Jazag A , Dharel N , Otsuka M , Taniguchi H , Kawabe T , Omata M. Hepatitis C virus core protein is a potent inhibitor of RNA silencing-based antiviral response. *Gastroenterology*. **2006**;130(3):883-892.

Weidmann M, Armbruster K, Hufert FT. Challenges in designing a Taqman-based multiplex assay for the simultaneous detection of Herpes simplex virus types 1 and 2 and Varicella-zoster virus. *J Clin Virol*. **2008**;42(4):326-334.

Weinberg MS , Arbuthnot P. Progress in the use of RNA interference as a therapy for chronic hepatitis B virus infection. *Genome Med*. **2010**;2(4):28.

Weir JP. Genomic organization and evolution of the human herpesviruses. *Virus Genes*. **1998**;16(1):85-93.

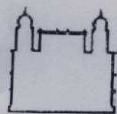


- Weiss H. Epidemiology of herpes simplex virus type 2 infection in the developing world. *Herpes*. **2004**;11 Suppl 1:24A-35A.
- White PJ. Barriers to successful delivery of short interfering RNA after systemic administration. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. **2008**;35(11):1371-1376.
- Whitley RJ. *Herpes Simplex Viruses*. In: *Fields Virology* (Knipe, D. & Howley, P.), **1996**. 3ª edição. Editora Lippincott- Raven, Philadelphia (PA): 2297-2342.
- Whitley RJ. Herpes simplex virus infection. *Semin Pediatr Infect Dis*. **2002**;13(1):6-11.
- Wood C , Harrington W, Jr. AIDS and associated malignancies. *Cell Res*. **2005**;15(11-12):947-952.
- Wu H, Hait WN, Yang JM. Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells. *Cancer Res.*, **2003**; 63(7):1515-9.
- Wu Z , Zhu Y , Bisaro DM , Parris DS. Herpes simplex virus type 1 suppresses RNA-induced gene silencing in mammalian cells. *J Virol*. **2009**;83(13):6652-6663.
- Yao Y , Wang C , Varshney RR , Wang DA. Antisense makes sense in engineered regenerative medicine. *Pharm Res*. **2009**;26(2):263-275.
- Yi R , Qin Y , Macara IG , Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. **2003**;17(24):3011-3016.
- Yokota T , Sakamoto N , Enomoto N , Tanabe Y , Miyagishi M , Maekawa S , Yi L , Kurosaki M , Taira K , Watanabe M , Mizusawa H. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep*. **2003**;4(6):602-608.
- Zamecnik PC , Stephenson ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1978**;75(1):280-284.
- Zamore PD. Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science*. **2002**;296(5571):1265-1269.
- Zhang YQ , Lai W , Li H , Li G. Inhibition of herpes simplex virus type 1 by small interfering RNA. *Clin Exp Dermatol*. **2008**;33(1):56-61.
- Zhao HF , L'Abbe D , Jolicoeur N , Wu M , Li Z , Yu Z , Shen SH. High-throughput screening of effective siRNAs from RNAi libraries delivered via bacterial invasion. *Nat Methods*. **2005**;2(12):967-973.

Zhe R , Mei-Ying Z , Kitazato K , Kobayash N , Qin-Chang Z , Pei-Zhuo Z , Zhi-Rong Y , Yi-Fei W. Effect of siRNA on HSV-1 plaque formation and relative expression levels of UL39 mRNA. *Arch Virol.* **2008**;153(7):1401-1406.

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. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature.* **2006**;441(7089):111-114.

# ANEXO I



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

Rio de Janeiro, 30 de março de 2010.

Carta: 011/10


De: CEP/FIOCRUZ

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

Prezados Senhores,

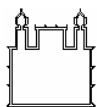
Estamos encaminhando o parecer do protocolo **544/09** intitulado "**Diagnóstico laboratorial do vírus da herpes simples tipo 1 e avaliação da infecção utilizando RNA de interferência**" com a deliberação de **APROVADO**.

Atenciosamente

  
Carla Dias Netto  
Secretária Geral  
CEP/Fiocruz

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

# ANEXO II



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
 Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia

**NÚMERO DA AMOSTRA**

## FICHA DO PACIENTE

### 1. IDENTIFICAÇÃO:

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Endereço: Rua, nº, complemento: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Município: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_

Data de Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ 1.6. Sexo: F  M

Tel: ( ) \_\_\_\_\_

### 2. DADOS CLÍNICOS :

2.1 Esteve doente nos últimos 2 meses: NÃO  SIM  Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

#### 2.2. Sintomas:

Coceira e ardência no local onde surgirão as lesões.

Aparecimento de bolhas agrupadas

Áreas avermelhada e inchada.

Febre

Outras: \_\_\_\_\_

2.3 Teve contato com alguém doente últimos 2 meses : NÃO  SIM

### Material Colhido:

Sangue

Saliva

Raspado da lesão (Swab)

Outras Observações:

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_