



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LILIAN YUMI HATTORI

**HERPES SIMPLEX:**  
ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO CITOPATOLÓGICA E  
SENSIBILIDADE AOS ANTIVIRAIS

LILIAN YUMI HATTORI

**HERPES SIMPLEX:**  
ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO CITOPATOLÓGICA E  
SENSIBILIDADE AOS ANTIVIRAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Carlos M. Nozawa

Londrina  
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

H366h	<p>Hattori, Lilian Yumi. Herpes simplex : isolamento, caracterização citopatológica e sensibilidade aos antivirais / Lilian Yumi Hattori. – Londrina, 2011. 69f: il.</p> <p>Orientador: Carlos Mitihiko Nozawa. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) □ Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2011. Inclui bibliografia.</p> <p>1. Vírus do herpes – Teses – Herpes simplex – Citopatologia – Teses. 3. Vírus – Isolamento – Teses. 4. Agentes antivirais – Teses. 5. Virologia médica – Teses. I. Nozawa, Carlos Mitihiko. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 578.7</p>
-------	--

LILIAN YUMI HATTORI

**HERPES SIMPLEX: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO  
CITOPATOLÓGICA E SENSIBILIDADE AOS ANTIVIRAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação, em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Carlos M. Nozawa  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dr. Luciano Ap. Panágio  
UEL – Londrina – PR

---

Profa. Dra. Juliana G. Castilho Kawai  
UEL – Londrina – PR

Londrina, 28 de março de 2011.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que realiza todas as minhas obras, aos meus antepassados. Agradeço a toda a minha família e em especial a meu pai Kenji Hattori, minha mãe Maria A. de Sá Hattori, minhas irmãs Denise S. Hattori, Jaqueline H. Hattori, Marcela Y. Hattori e meus cunhados pelo amor e apoio em todos os momentos. Aos meus avós Tokiko Hattori e Kaoru Hattori e meus tios Izaltina D. Hattori e Sussumu Hattori por todo o amor e cuidados na ausência de meus pais.

A meu noivo, Rafael Henrique Salvati, por todo o carinho, amor e compreensão.

A professora Daniele de Oliveira, Dra Lucy Megumi Yamauchi Lioni, Dra Rosa Elisa C. Linhares pelos ensinamentos e incentivos.

Ao meu orientador Prof<sup>o</sup> Carlos M. Nozawa pela paciência e ensinamentos.

Aos meus amigos do Laboratório de Virologia da UEL: Lígia C. F. Galhardi, Vinícius P. Rincão, Nayara Lopes, Kristie A. Yamamoto, Ana L. S. Bernardi, Daniele Albuquerque, Érika S. Czernisz, Samantha F. Espada, Wesley A. Bonfim e à laboratorista Valdelice dos Santos que colaboraram para a realização deste trabalho.

A todos os meus amigos, que mesmo distantes nunca deixaram de me apoiar e as minhas amigas sempre presentes Rosiane V. da Silva e Alane T. P. Moralez, pelo companheirismo, força e carinho.

A Tereza S. Yamamura pela amizade, carinho e pelos ensinamentos da Seicho-No-Ie.

Ao secretário da Pós Graduação Luiz Ricardo Alves.

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

*O ser humano nem sempre consegue realizar tudo o que pretende, mas infalivelmente realiza aquilo que tem a convicção de ser capaz de fazer.*

*Massaharu Taniguchi*

HATTORI, Lilian Yumi. **Herpes simplex**: Isolamento, caracterização citopatológica e sensibilidade aos antivirais. 2011. 69f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi isolar o vírus herpes simplex (HSV) de amostras clínicas provenientes de pacientes acometidos de lesões clinicamente diagnosticadas como herpes simplex e adaptá-las em cultura de células HEp-2, através de sucessivas passagens, com a observação do efeito citopático (ECP). As culturas de células infectadas foram estudadas quanto às características citopatológicas, incluindo o desenvolvimento de plaques. Avaliamos também a sensibilidade dos isolados (inibição viral) aos anti-herpesvirais comercialmente disponíveis, aciclovir (ACV), foscarnet (PFA), arabino citosina (Ara-C) e trifluridina (F3T), através do ensaio de plaque ou dose infectante em cultura de células. Vinte isolados foram obtidos a partir de vinte e duas amostras clínicas. As amostras desenvolveram ECP representado por arredondamento das células, aumento do volume celular e refringência, formação de grumos celulares, 24-48 h após a inoculação. Este efeito foi, inicialmente, detectado de forma focal no tapete celular e posteriormente, com o comprometimento de toda monocamada celular e desprendimento das células 72-96 h após a inoculação. A presença de sincícios foi observada 48 h após a inoculação e coloração com hematoxilina-eosina (HE). Das vinte amostras adaptadas, seis desenvolveram plaques. Os isolados S1-S4 produziram plaques predominantemente grandes com diâmetro médio de 1.0 mm e os isolados S5 e S6 produziram plaques predominantemente pequenos de 0.4 mm de diâmetro. Onze isolados S1-S11 foram testados frente aos antivirais ACV, PFA, Ara-C, F3T e foram considerados sensíveis. A porcentagem de inibição viral variou entre 61-100%. Portanto, no presente trabalho nós estudamos os isolados selvagens circulantes de HSV, bem como tentamos uma abordagem ao conceito de antivirograma, considerado um instrumento importante no tratamento e controle da infecção pelo HSV.

**Palavras-chave:** HSV. Isolamento. Citopatologia. Sensibilidade a antivirais.

HATTORI, Lilian Yumi. **Herpes simplex**: Isolation, characterization cytopathologic and sensitivite to antivirals 2011. 69p. Dissertation (Master in Microbiology) - Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina.

### **ABSTRACT**

This work presents the results of the isolation of herpes simplex virus (HSV) from clinical specimens whose patients were suffering mostly with oral lesions and secondly with genital lesions. The isolation and HSV adaptation was carried out in HEp-2 cell culture through successive passages monitored by the development of the cytopathic effect (CPE). Cultures infected with isolates were studied under cytopathological ground and plaque forming features. We also evaluated the sensitivity of the isolates (viral inhibition) to commercially available anti-HSV drugs, such as, acyclovir (ACV), foscarnet (PFA), arabinofuranosylcytosine (Ara-C) and trifluridine (F3T) based in the assay of antiviral activity, monitored by plaque assay and tissue culture infectious dose. From 22 clinical specimens we could isolate and adapt twenty strains. Overall, the CPE was mostly detected 24-48 h post-infection (p.i.), represented by focally rounding and increased refringence of the infected cells and later with the spread of the effect. Total destruction of the cell monolayer was observed at 72-96 h p.i. The presence of syncytia was remarkable 48 h p.i. observed after cell staining. Out of 20 isolates six developed plaques. The plaques of the isolates S1-S4 were predominantly large with diameter of 1.0 mm and isolate S5 and S6 produced mostly small plaques of 0.4 mm size. Eleven isolates S1-S11 were sensitive to ACV, PFA, Ara-C and F3T antiviral tested. The percentage of virus inhibition (%VI) ranged from 61-100%. Therefore, in this work we studied the circulating wild strains of HSV, as well as, tried an approach to the concept of antivirogram, as a useful tool for the treatment and the control of HSV infections.

**Key words:** HSV. Isolation. Cytopathology. Sensitivite to antivirals.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estrutura e genoma do HSV .....	15
<b>Figura 2</b> – Determinantes moleculares de entrada do HSV nas células.....	17
<b>Figura 3</b> – Ativação da expressão de genes IE .....	18
<b>Figura 4</b> – Esquema representativo da montagem do capsídeo e empacotamento do genoma do HSV .....	19
<b>Figura 5</b> – Esquema representativo da formação do envelope por duplo envelopamento e liberação das partículas virais do HSV da célula hospedeira.....	19
<b>Figura 6</b> – Latência e reativação do HSV .....	20
<b>Figura 7</b> – Manifestações clínicas do herpes orolabial .....	22
<b>Figura 8</b> – Manifestações clínicas do herpes neonatal.....	24
<b>Figura 9</b> – Manifestações clínicas do herpes ocular .....	26
<b>Figura 10</b> – Manifestações clínicas do paranócio herpético .....	27
<b>Figura 11</b> – Manifestações clínicas do eczema herpético .....	28
<b>Figura 12</b> – Reconhecimento do HSV via TLR.....	29
<b>Figura 13</b> – Modelo de evasão da resposta imune mediada por gC e gE .....	32

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ACV	Aciclovir
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
Ara-A	Vidarabina
BVDU	Bromovinildeoxiuridina
CDs	Células dendríticas
CDV	Cidofovir
DNA	cido desoxirribonucleico
DNA pol	DNA polimerase
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
E (P)	Precoce tardio
EBV	Epstein-Barr
ECP	Efeito citopático
EH	Eczema herpético
F3T	Trifluridina
FCV	Fanciclovir
GACV	Ganciclovir
gB	Glicoproteína B
gC	Glicoproteína C
gD	Glicoproteína D
gE	Glicoproteína E
gG	Glicoproteína G
gH	Glicoproteína H
gI	Glicoproteína I
gJ	Glicoproteína J
gK	Glicoproteína K
gL	Glicoproteína L
gM	Glicoproteína M
h	Hora
hpi	Hora ps-infecção
HCF	Proteína estabilizadora de fator de transcrição
HCMV	Citomegalovírus
HE	Hematoxilina-eosina

HHV-6	Herpesvírus humano tipo 6
HHV-7	Herpesvírus humano tipo 7
HHV-8	Herpesvírus humano tipo 8
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HS	Heparan sulfato
HSV	Herpes simplex vírus
HSE	Encefalite herpética
HSV-1	Herpes simplex tipo 1
HSV-2	Herpes simplex tipo 2
HVEM	Mediador de entrada de herpesvírus
ICP	Proteína de célula infectada
ICTV	Comitê internacional de taxonomia dos vírus
IDU	Iodo-desoxiuridina
IE (a)	Precoce imediato
IFN tipo I	Interferons tipo I
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
kb	Kilobase
kbp	Kilo pares de base
KSHV	Sarcoma de Kaposi associado ao herpesvírus
L (δ)	Tardio
LATs	Transcritos associados a latência
LTC	Linfócitos T citotóxicos
MAC	Complexo de ataque a membrana
MHC I	Moléculas do complexo de histocompatibilidade maior classe I
MHC II	Moléculas do complexo de histocompatibilidade maior classe II
mm	Milímetro
NK	Natural killer
nm	Nanômetro
OCT-1	Octâmero 1
P	Properdina
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCV	Penciclovir

PFA	Foscarnet
RNA	Ácido ribonucléico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
TAP	Transportador associado com o processamento do antígeno
Th1	Células T helper tipo 1
Th2	Células T helper tipo 2
TLR	Receptores semelhantes a toll
TNF	Fator de necrose tumoral
TQ	Timidino quinase
UI	Sequência única longa
Us	Sequência única curta
VACV	Valaciclovir
VGACV	Valganciclovir
VHS	Proteína "bloqueadora" (da síntese) do hospedeiro
VP	Proteína viral
VZV	Varicela zoster
a-TIF	Fator indutor de transcrição de proteínas de fase a
%	Porcentagem
%IV	Porcentagem de inibição viral
3-OS HS	Heparan sulfato sulfatado

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	13
1.1	PROPRIEDADES GERAIS	14
1.2	REPLICAÇÃO	16
1.3	LATÊNCIA	20
1.4	PATOLOGIA	22
1.4.1	Herpes Labial	22
1.4.2	Herpes Genital	22
1.4.3	Herpes Neonatal	24
1.4.4	Encefalite e Meningite	25
1.4.5	Herpes Ocular	25
1.4.6	Panarício Herpético	26
1.4.7	Herpes Gladiatorum	27
1.4.8	Eczema Herpético	27
1.5	IMUNIDADE	28
1.5.1	Imunidade Inata	28
1.5.2	Imunidade Adquirida	29
1.5.3	Mecanismos de Evasão	30
1.6	TRANSMISSÃO VIRAL	32
1.7	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	33
1.8	TRATAMENTO	34
1.8.1	Aciclovir (ACV) e Valaciclovir (VACV)	34
1.8.2	Penciclovir(PCV) e Fanciclovir (FCV)	35
1.8.3	Ganciclovir (GACV) e Valganciclovir (VGACV)	36
1.8.4	Trifluridina (F3T)/Iodo-desoxiuridina (IDU)/Vidarabina (Ara-A)	36
1.8.5	Bromovinildeoxiuridina (BVDU)	37
1.8.6	Foscarnet (PFA)	37
1.8.7	Cidofovir (CDV)	37
1.9	VACINAS	38
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	40
2.1	GERAIS	40
2.2	ESPECÍFICOS	40

<b>3</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>ARTIGO</b>	<b>57</b>
4.1	INTRODUCTION	57
4.2	MATERIAL AND METHODS	58
4.2.1	Cells and Virus	58
4.2.2	Anti-herpes Virus Drugs	59
4.2.3	Clinical Specimens	59
4.2.4	Cell Culture Inoculation	59
4.2.5	Hematoxylin-Eosin (HE) Staining	60
4.2.6	Cytotoxic Assay of the Antivirals	60
4.2.7	Plaque Reduction Assay	60
4.2.8	Infectious Dose Reduction Assay by TCID50	61
4.3	RESULTS	61
4.4	DISCUSSION AND CONCLUSION	65
4.5	REFERENCES	67

## 1 INTRODUÇÃO

Os herpesvírus são vírus envelopados com diâmetro do vírion superior a 100 nm (PELLETT; ROIZMAN, 2007). O genoma é constituído de DNA dupla-fita linear (125-240 kb) e de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), pertencem à ordem *Herpesvirales*, à família *Herpesviridae*, constituída por três subfamílias: *Alphaherpesvirinae*, responsáveis pelos vírus que causam lesões na pele e mucosas, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*, constituídos pelos vírus que ocasionam manifestações sistêmicas (PELLETT; ROIZMAN, 2007). Podem infectar mamíferos, aves e répteis (DAVISON et al., 2009). Os patógenos humanos de grande importância médica são: o vírus herpes simplex tipo 1 e 2 (HSV-1, HSV-2), vírus varicela zoster (VZV), citomegalovírus humano (HCMV), herpesvírus humano 6 (HHV-6), herpesvírus humano tipo 7 (HHV-7), herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV) e o vírus Epstein-Barr (EBV) (KELLY et al., 2009). Outras características comuns da biologia dos herpesvírus incluem uma alta incidência de infecções assintomáticas, estabelecimento de infecções líticas, latentes e/ou persistentes em gânglios nervosos sensitivos ou em leucócitos por toda a vida no hospedeiro (SPEAR; LONGNECKER, 2003).

Os primeiros herpesvírus humanos a serem descritos foram os herpes simplex virus (HSV), os quais têm sido estudados por mais de 25 séculos em relação à classificação, epidemiologia e características moleculares. Hipócrates (460/377 a.C.), médico da Grécia antiga, documentou as lesões, denominando-as herpes (derivado do grego *herpein* = rastejar, réptil), em referência ao aparecimento das vesículas na pele. O historiador Heródoto (484/425 a.C.) descreveu a doença como capaz de causar febre e pequenas vesículas na boca e ulcerações nos lábios, denominando-a *herpes febrilis*. A associação e ocorrência da doença em órgãos genitais somente foi atribuída a John Astruc por volta de 1736, conhecido então por herpes genital. Fournier descreveu sobre o diagnóstico e o tratamento do herpes genital. Coube a Vidal, em 1873, a comprovação de que o herpes era infeccioso e podia ser transmitido entre pessoas. Gruter realizou estudos em coelhos mostrando, inequivocamente, o isolamento e transmissão do vírus, publicando os resultados em 1924. Em 1930, a infecção foi mais bem caracterizada em relação às recorrências, por Andrews e Carmichael (ROIZMAN; WHITLEY, 2001).

Entre 1920 e 1960, os estudos sobre as manifestações biológicas das doenças causadas por esses vírus tiveram expansão devido à descoberta de uma grande variedade de hospedeiros laboratoriais, ratos, camundongos, coelhos, cobaias, aves e

posteriormente, o estabelecimento da infecção em cultura de células fibroblásticas, epiteliais, nervosas e ovos embrionados possibilitaram novas abordagens ao estudo das doenças (WIGG & MIRANDA, 2008). Em 1968, Nahmias e Dowdle demonstraram que havia dois tipos de herpesvírus incluídos no gênero *Simplexvirus*, com base em suas diferenças antigênicas e biológicas (ROIZMAN; WHITLEY, 2001).

O HSV-1 é principalmente associado com infecções orofaciais, enquanto que o HSV-2 é geralmente associado com infecções anogenitais (BEAUMAN, 2005). Embora o herpes genital seja classicamente considerado como causado pelo HSV-2, nos últimos anos, uma proporção crescente dos casos genitais têm sido atribuído ao tipo 1 (ENGELBERG et al., 2003). Os HSV-1 e HSV-2 causam uma variedade de infecções normalmente benignas, mas também podem causar doença disseminada em infecções neonatal envolvendo vários órgãos viscerais (KIMBERLIN, 2007). Em indivíduos imunocomprometidos pode ocorrer também a propagação da infecção em múltiplos órgãos viscerais (CHILUKURI; ROSEN, 2003), além de contribuírem para a transmissão do vírus da imunodeficiência humana (COREY et al., 2004).

## 1.1 PROPRIEDADES GERAIS

O vírion do herpes simplex é constituído de quatro componentes estruturais, o genoma de DNA dupla-fita linear (152 kb), o capsídeo, tegumento e um envelope (ROIZMAN; SEARS, 1996) (Figura 1A).

O DNA do HSV consiste em dois componentes covalentemente ligados, com seqüências únicas - UL (única longa) ou US (única curta), flanqueadas por regiões repetidas invertidas (TRL-IRL e IRS-TRS) (WATANABE, 2010). Há uma única cópia da seqüência 'a' em cada terminal e entre as junções IRL e IRS (TAYLOR et al., 2002) (Figura 1B). Os dois componentes podem se inverter um para o outro, criando 4 diferentes tipos de moléculas de DNA que diferem somente na orientação da seqüência de DNA (WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

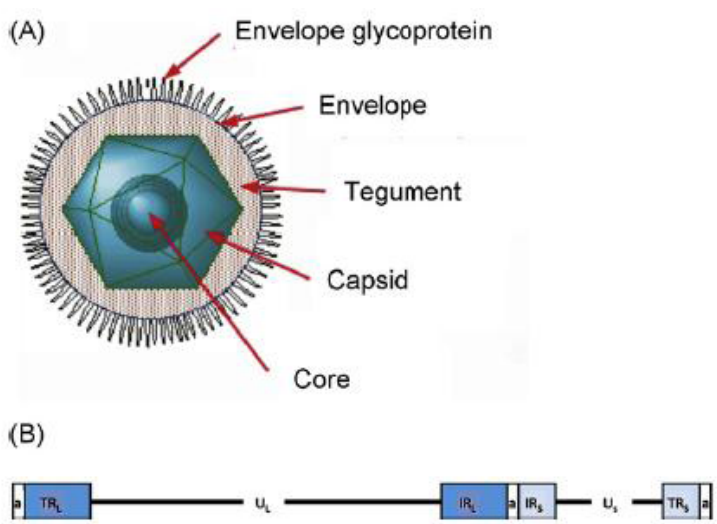
O capsídeo icosaédrico envolve o genoma e consiste de seis proteínas externas a UI6, UI18 (VP23), UI19 (VP5), UI25, UI35 (VP26) e UI38 (VP19C) (ROIZMAN & SEARS, 1996). Entre o capsídeo e o envelope há uma camada amorfa denominada tegumento que contém 22 proteínas que incluem UI4, UI11, UI13, UI14, UI16, UI17, UI21, UI36 (VP1/2), UI37 (VP11/12), UI41, UI46, UI47 (VP13/14), UI48 (VP16), UI49 (VP22), UI51, UI56, Us2, Us3, Us10, Us11, ICP0 e ICP4 (METTENLEITER, 2004). O envelope

contém 5 proteínas, UL20, UL43, UL45, UL49A e US9 juntamente com 11 glicoproteínas UL1 (gL), UL10 (gM), UL22 (gH), UL27 (gB), UL44 (gC), UL53 (gK), Us4 (gG), Us5 (gJ), Us6 (gD), Us7 (gI) e Us8 (gE) (METTENLEITER, 2004).

O genoma consiste de 84 possíveis sequências de leitura aberta que codificam as proteínas estruturais e funcionais (ROIZMAN et al., 2007). Os RNAs, transcritos no núcleo da célula, são denominados de precoce imediato (IE ou a), precoce tardio (E ou P) e tardio (L ou ô), que codificam proteínas regulatórias da replicação, incluindo a timidino-quinase (TQ) e a DNA polimerase (DNA pol) e proteínas estruturais como gB, ICP5 e gC (ROIZMAN; KNIPE, 2001). Os RNAs precoce imediatos são detectados na primeira meia hora pós-infecção (hpi), os precoce tardios de 2-3 hpi e os tardios, pelo menos após 12 hpi (SU et al., 2008).

BOEHMER e LEHMAN (1997) demonstraram que após a infecção, o genoma linear circulariza-se e a replicação do DNA é iniciada em um sítio denominado origem de replicação. A replicação do DNA ocorre pelo mecanismo de círculo rolante que produz concatâmeros de alto peso molecular e a clivagem destes, em unidades monoméricas, está relacionada ao empacotamento do DNA no capsídeo (STRANG; STOW, 2005).

**Figura 1** – Estrutura e genoma do HSV.



(A) O vírion consiste em quatro componentes: DNA dupla-fita linear, capsídeo, tegumento e um envelope. (B) Genoma do HSV. O genoma é constituído por duas estruturas com sequências únicas, designadas UL e US, flanqueadas por regiões repetidas invertidas (TRL-IRL e IRS-TRS) (WATANABE, 2010).

## 1.2 REPLICAÇÃO

A replicação do HSV em condições naturais ocorre em células epiteliais da pele e mucosas, neurônios e células do sistema imunológico (SPEAR et al., 2006). O HSV se liga ao sulfato de heparan (HS), que são componentes essenciais da superfície da célula e matriz extracelular (OH et al., 2010). Na ausência de HS, o sulfato de condroitina pode ser usado como receptor na superfície da célula hospedeira (MARDBERG et al., 2002).

A fusão vírus-célula (e célula-célula) requer a participação de gB, gC, gD, gH e gL (PERTEL et al., 2001). A interação inicial na superfície da célula é mediada pela interação da gC e/ou gB com HS (SHUKLA; SPEAR, 2001) (Figura 2). Embora gC não seja essencial para a entrada viral, sua ausência diminui a eficiência da adsorção à célula (SPEAR; LONGNECKER, 2003).

A ligação da gD com receptores celulares é crucial para a iniciação do processo de fusão (TAYLOR et al. 2007). A gD pode interagir com três famílias de receptores que incluem, receptor de nectina-1 e 2, ambos membros da superfamília de imunoglobulinas, (mediadores de entrada de herpesvirus - HVEM), membro da família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF), além de uma forma modificada do HS, conhecida como sulfato de heparan sulfatado (3-O HS) (PERTEL et al., 2001) (Figura 2). Estes receptores são expressos em diferentes células e tecidos, determinando um importante papel na definição da preferência viral para invadir células e tecidos específicos (TIWARI et al., 2005). Por exemplo, HVEM é expresso em muitos tecidos humanos fetais e adultos, incluindo pulmão, fígado, rim e tecidos linfóides (TIWARI et al., 2005). Por outro lado, o receptor nectina-1 é expresso em células humanas de origem epitelial e neuronal, assim como na córnea humana, enquanto o receptor nectina-2 é expresso em muitos tecidos humanos, mas com somente uma expressão limitada em células neuronais e em queratinócitos (TIWARI et al., 2008). Já o receptor 3-OS HS é expresso em muitas linhagens de células humanas, como células neuronais e endoteliais (TIWARI et al., 2007).

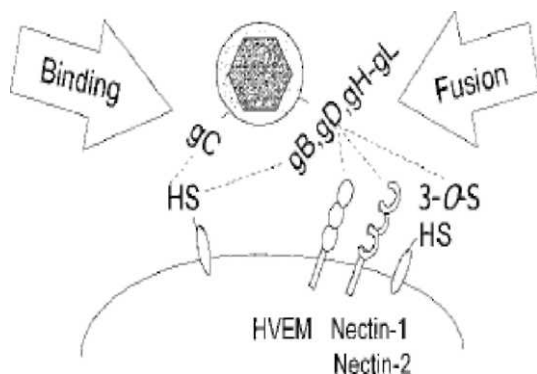
A fusão celular induzida pelo HSV-1 pode resultar na formação de células gigantes multinucleadas, sincícios, resultantes da fusão de células infectadas com adjacentes células não infectadas (JONES; GERAGHTY, 2004). Os sincícios são observados em lesões induzidas por HSV e pode representar um mecanismo de morte celular durante a infecção (PERTEL; SPEAR, 1998).

Após a penetração no citoplasma, o nucleocapsídeo viral é transportado pelo citoesqueleto através dos microtúbulos até as proximidades do núcleo (SODEIK et al., 1997).

O DNA viral é liberado no núcleo através do poro nuclear e o capsídeo vazio é deixado no citoplasma (MIYAMOTO; MORGAN, 1971). O genoma é acompanhado da proteína  $\alpha$ -TIF também denominada de VP16 ou Vmw65, que funciona como ativadora da transcrição de genes IE virais via fatores de transcrição celulares (WYSOCKA; HERR, 2003). A proteína "bloqueadora" (da síntese) do hospedeiro (VHS) permanece no citoplasma, onde causa a desagregação de polirribossomas e a degradação de RNAs celulares, parando a síntese de proteínas celulares (READ et al., 1993).

A transcrição de genes virais, replicação do DNA, encapsidação e a saída do vírion ocorrem no núcleo da célula infectada (ROIZMAN et al., 2007). Assim, a infecção produtiva pelo HSV remodela a estrutura do núcleo da célula hospedeira, através de uma série de mudanças estruturais que aumenta a infecção produtiva do vírus e bloqueia a resposta celular do hospedeiro, como, por exemplo, a formação de corpos intranucleares eosinofílicos ou Cowdry tipo A (WHITLEY, 2002).

**Figura 2** – Determinantes moleculares de entrada do HSV nas células.



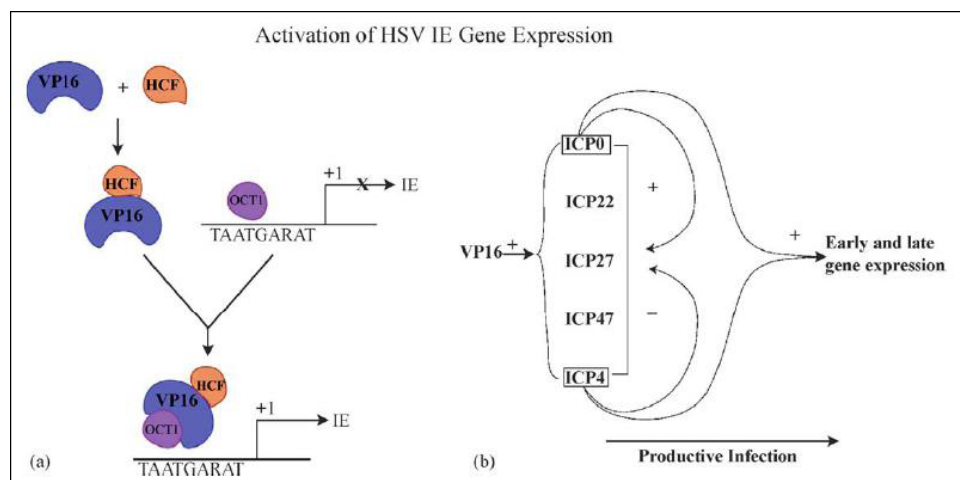
A ligação inicial do vírus às células é mediada pela interação da gC e/ou gB com HS. A gD pode interagir com três famílias de receptores: nectina-1 e 2, HVEM e 3-O HS para iniciação do processo de fusão (SPEAR et al., 2000).

Uma cascata altamente ordenada regula a expressão de genes do HSV (ROIZMAN; KNIPE, 2001). Um elemento chave envolvido na iniciação da cascata lítica é a VP16, que, em conjunto com duas proteínas celulares do hospedeiro, octâmero 1 (OCT-1) e HCF (*host fator cell*) se ligam às sequências alvo específicas TAATGARAT, localizadas nos promotores dos cinco primeiros genes IE: ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 e ICP47 (WYSOCKA; HERR, 2003). O recrutamento de VP16/OCT-1/HCF forma um potente complexo trimérico de ativação de transcrição dos genes (EFSTATHIOU; PRESTON, 2005) (Figura 3).

A ICP0 atua estimulando a expressão de genes do HSV pertencentes a todas as três classes temporais (fases  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$ ) durante a infecção lítica (HANCOCK et al., 2006).

Também ativa a transcrição de genes virais em sinergia com ou independente de ICP4 (HAGGLUND; ROIZMAN, 2004). A ICP4 é um regulador essencial positivo e negativo da expressão gênica (ROIZMAN; KNIPE, 2001). É uma proteína ligante de DNA que interage com fatores de transcrição, para ativar a maioria dos genes de fase P e  $\delta$ , e reprimir a transcrição de certos genes de fase  $\alpha$  (OLESKY et al., 2005). A ICP27 reprime a expressão de certas proteínas de fase  $\alpha$ , e P e induz a expressão de proteínas de fase  $\delta$  (OLESKY et al., 2005). É requerida indiretamente para a replicação do DNA viral por aumento de níveis de RNA mensageiro (RNAm) de produtos de genes E essenciais para a síntese de DNA viral (ROIZMAN et al., 2007). A ICP22 é necessária para uma expressão eficiente de genes de fase P, assim como um subconjunto de genes de fase  $\delta$  (O TOOLE et al., 2003). A ICP47 se liga a TAP não permitindo o transporte de peptídeos virais para o retículo endoplasmático, para eventual apresentação na superfície da célula (LACAILLE; ANDROLEWICZ, 1998). Os genes E estão envolvidos na síntese do DNA viral e no metabolismo de nucleotídeos tais como UI52 e UI23 (BOEHMER; LEHMAN, 1997). Uma vez que o DNA tenha sido sintetizado, genes L são ativados que codificam proteínas necessárias para produzir progênie virais, principalmente proteínas estruturais, tais como gB e gD, são subdivididos em  $\gamma_1$  e  $\gamma_2$  genes, de acordo com seu grau de dependência na replicação de DNA para sua expressão (SU et al., 2008).

**Figura 3** – Ativação da expressão de genes IE.

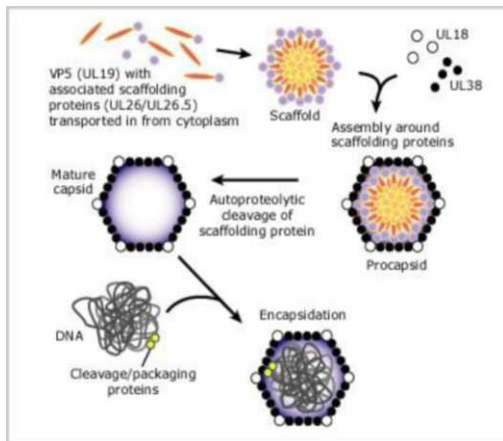


(a) A expressão de genes IE é ativada por um complexo trimérico que consiste em OCT-1, VP16 e HCF. (b) Como consequência da expressão de genes IE subsequentes classes de genes são expressos para facilitar a infecção produtiva do vírus (EFSTATHIOU & PRESTON, 2005).

A formação do capsídeo ocorre quando a VP5 se associa às proteínas de suporte (*scaffolding*) e a outras proteínas (ROIZMAN et al., 2007). Ocorre a autoclivagem

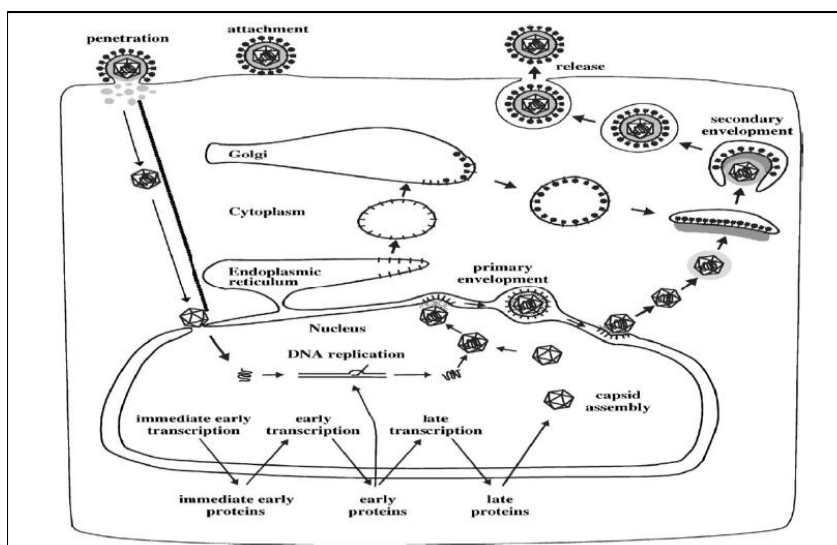
proteolítica das proteínas *scaffolding*, liberando o capsídeo vazio (ROIZMAN et al., 2007) e a seguir o DNA viral é empacotado dentro do capsídeo (NEWCOMB et al., 1996) (Figura 4). A primeira etapa de maturação ocorre na membrana nuclear interna que fornece ao nucleocapsídeo um envelope primário (METTENLEITER, 2004). O envelopamento secundário é frequentemente observado nas proximidades do aparelho de Golgi, onde tem sido proposto a partir de evidências bioquímicas e morfológicas que as vesículas na qual ocorre o brotamento são derivadas do aparelho de Golgi (METTENLEITER et al., 2006) (Figura 5). A liberação da progénie viral causa lise da célula e destruição final da célula infectada (PEÑA et al., 2009).

**Figura 4** –Esquema representativo da montagem do capsídeo e empacotamento do genoma do HSV



(WIGG & MIRANDA, 2008).

**Figura 5** –Esquema representativo da formação do envelope por duplo envelopamento e liberação das partículas virais do HSV da célula hospedeira

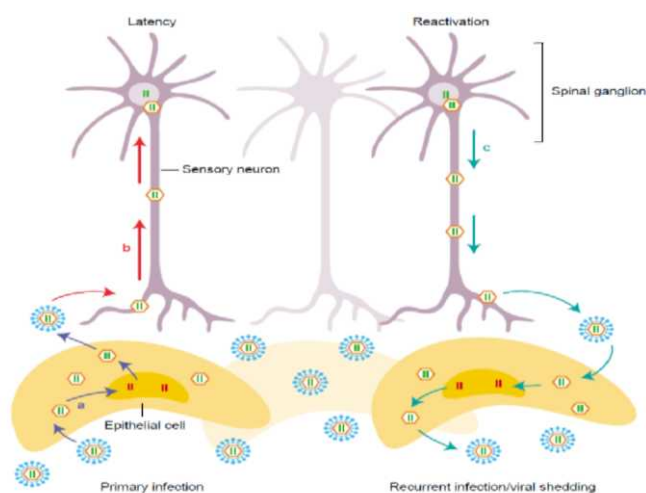


(METTENLEITER, 2004).

### 1.3 LATÊNCIA

A latência é estabelecida em neurônios sensoriais no sítio primário de infecção (EFSTATHIOU; PRESTON, 2005). Após a replicação primária do HSV-1 na mucosa oral, o vírus ganha acesso ao nervo sensorial terminal, seguido por transporte em sentido retrógrado ao estímulo nervoso para o núcleo dos neurônios no gânglio trigêmeo, onde a latência é estabelecida e no caso do HSV-2 ocorre um processo similar resultando no estabelecimento da latência no gânglio sacral (BEAUMAN, 2005). Em ambos os casos, periódicas reativações podem ocorrer resultando na replicação produtiva do vírus, seguidas pelo transporte antiretrógrado para o sítio inicial de infecção ou próximo a este (WHITLEY; ROIZMAN, 2001) (Figura 6). Nesta fase, o vírus causa uma infecção assintomática (*shedding*), mas pode resultar no aparecimento de lesões na mucosa oral ou genital (MELL, 2008). Uma variedade de estímulos, como, exposição à luz ultravioleta, trauma ou estresse emocional podem resultar na reativação dos vírus latentes (WOO; CHALLACOMBE, 2007).

**Figura 6** – Latência e reativação do HSV.



The herpes simplex virus life cycle

(a) Ciclo lítico do HSV em células epiteliais; (b) Transporte axonal retrógrado para o estabelecimento de latência; (c) Transporte axonal anteretrógrado para a reativação do vírus (LACHMAN, 2003).

Durante a infecção latente o genoma do vírus é mantido, mas sem a replicação viral (KHANNA et al., 2004). A transcrição durante a latência é restrita aos transcritos associados à latência (LATs) (LACHMANN, 2003). Os LATs compreendem uma série de íntrons estáveis de 2.0 e 1.5 kbp, denominados de LATs maior, no qual estão unidos a partir de transcritos primários menos abundantes de 8.3 kbp denominados de LATs menor (CLIFFE et al., 2009). LATs maior estão acumulados no núcleo de neurônios e proporcionam

um marcador útil para a detecção de neurônios latentemente infectados (PROENÇA et al., 2008).

Durante a infecção aguda nos gânglios, no local da inoculação, duas populações distintas de neurônios foram identificadas - uma expressando genes do ciclo lítico e outra expressando apenas LATs, sugerindo que as vias de expressão gênica lítica e latente divergem-se uma da outra, imediatamente, após a infecção do neurônio (LACHMAN, 2003). Estudos indicam que os LATs são transcritos em apenas uma fração (5-33%) de todas as células latentemente infectadas (SAWTELL, 1997). A quantidade de DNA do vírus dentro de cada neurônio pode variar de 1 a 100 cópias na maioria das células, com raros neurônios contendo mais de 1000 cópias (THOMPSON; SAWTELL, 2000).

A função dos LATs não é clara, tem sido demonstrado por JONES (2003) que os LATs inibem a apoptose das células infectadas *in vivo* e *in vitro*. Também podem estar relacionados com a capacidade de regular negativamente a expressão de genes do ciclo lítico nos neurônios, favorecendo o estabelecimento e manutenção da latência (PERNG, 2000).

Algumas mudanças ocorrem na organização do genoma viral, que podem influenciar na expressão gênica viral, como a presença do genoma na forma de episoma circular e associação do genoma com histonas celulares, portanto, existe como cromatina nos neurônios latentemente infectados (PAULUS et al., 2010).

De acordo com KNIPE e CLIFFE (2008) a cromatina possui um importante papel no ciclo lítico e latente do HSV. Em células epiteliais, VP16 localiza-se no núcleo e promove a formação eucromatina em genes IE promovendo assim a expressão de genes do ciclo lítico e por outro lado, em células neuronais LATs são expressos promovendo a formação de heterocromatina.

Um mecanismo proposto por PRESTON (2000) para explicar a latência está relacionado a uma baixa expressão do fator nuclear OCT-1 no sistema nervoso e que outras proteínas da família OCT são expressas preferencialmente. Na maioria dos tecidos, a proteína do tegumento viral a-TIF interage preferencialmente com a proteína OCT-1 e esta ligação é estabilizada pelo fator HCF proporcionando a formação do complexo de pré-iniciação do genoma do HSV, iniciando a transcrição de genes de fase a e consequente infecção produtiva (WYSOCKA; HERR, 2003).

## 1.4 PATOLOGIA

### 1.4.1 Herpes Labial

Mais de 85% da população mundial é soropositiva para HSV-1 (YEUNG-YUE et al., 2002). A infecção primária pode ser inaparente ou manifestar sinais e sintomas, tais como, febre, lesões vesiculares e ulcerativas, gengivoestomatite, edema, linfadenopatia localizada, anorexia e mal-estar (MELL, 2008) (Figura 7A). O período de incubação é de 2 a 12 dias (MELL, 2008). Se a primoinfecção ocorrer mais tardiamente, é comum a faringite herpética, associada a manifestação semelhante à mononucleose (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007).

As lesões orolabiais recorrentes apresentam sintomas prodrômicos de dor, queimação, coceira ou formigamento (SIEGEL, 2002). As vesículas persistem por aproximadamente 48 h, progredindo para pústula e crosta em 72 a 96 h (YEUNG-YUE et al., 2002) (Figura 7B). A infecção primária é rara em crianças com menos de 6 meses de idade, pois os anticorpos maternos conferem proteção (STOOPLER, 2005). A incidência de infecção primária por HSV-1 atinge um pico entre 2 e 3 anos de idade (GREENBERG, 2003).

**Figura 7** – Manifestações clínicas do herpes orolabial



(A): Gengivoestomatite herpética primária em criança, apresentando intensa inflamação gengival e múltiplas úlceras na mucosa labial. (B): Herpes labial (fase de crosta) (FATAHZADEH & SCHWARTZ, 2007).

### 1.4.2 Herpes Genital

O HSV-2 é a principal causa de herpes genital transmitida por contato sexual (KUMAR et al., 2001). A prevalência do HSV-2 aumenta com o início da atividade sexual na adolescência (STOOPLER, 2005). Cerca de 10-20% das infecções genitais são causadas pelo HSV-1 (LIPPELT et al., 2002), particularmente, no Reino Unido

(STANBERRY et al., 1999). Este aumento provavelmente é resultado do atraso na exposição ao HSV-1 oral, em países desenvolvidos e, portanto, estes indivíduos permanecem susceptíveis a infecção por HSV-1 genital, no início da atividade sexual (XU et al., 2006). O aumento do HSV-1 genital é também atribuído ao aumento de sexo oral entre jovens (HALPERN-FELSHER et al., 2005).

As mulheres são mais susceptíveis à infecção pelo HSV-2 que os homens, em uma proporção aproximada de quatro vezes (WALD et al., 2001), possivelmente, pelas diferenças anatômicas (por exemplo, diferenças no epitélio genital), maior exposição ao inóculo e uma maior taxa de reativação viral em homens que em mulheres (WALD et al., 2002).

A prevalência sorológica do HSV-2 varia de 7-40% em mulheres grávidas, de 60-95% em pessoas infectadas com HIV e prostitutas (GUPTA et al., 2007). As infecções assintomáticas são mais frequentes e a manifestação clínica clássica primária do HSV-1 ou HSV-2 genital é caracterizada por agrupamentos bilaterais de pápulas eritematosas e vesículas na genitália externa, geralmente 6 dias após o contato sexual (BEAUMAN, 2005).

Quase 40% dos homens e 70% das mulheres apresentam febre, cefaléia, mal-estar e mialgias (GUPTA et al., 2007). Nas mulheres as úlceras podem ocorrer no meato uretral, lábios, períneo e nos homens as úlceras geralmente aparecem na glande e corpo do pênis (BEAUMAN, 2005). Em homossexuais a protite herpética é comum (KRONE et al., 2000). Em ambos os homens e mulheres, as lesões podem aparecer na região perianal, nas coxas, ou nádegas (LAUTENSCHLAGER; EICHMANN, 2001). Durante 2-3 semanas, 75% dos pacientes têm novas lesões e algumas lesões progridem para vesículas, pústulas, crostas e úlceras (GUPTA et al., 2007). As complicações incluem meningite asséptica, lesões extragenitais e disfunção autonômica, incluindo a retenção urinária (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007).

HSV-2 é a segunda principal causa na prevalência de doenças virais sexualmente transmissíveis (MARSHALL et al., 2001). Estudos epidemiológicos sugerem que as doenças sexualmente transmissíveis (DST) facilitam a disseminação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (WALD; LINK, 2002). Neste contexto, o HSV-2 tem sido apontado como um cofator importante na aquisição e transmissão do HIV (CELUM, 2004). O HSV-2 causa úlceras e microulcerações, frequentemente assintomáticas, porém, são portas de entrada para o HIV (CELUM, 2004). Lesões por HSV-2 mobilizam números substanciais de linfócitos T CD4+, alvos do HIV (CELUM et al., 2004). Pacientes infectados por HIV possuem alto risco de reativação do HSV latente (PATEL, 2002). As infecções por HSV em

imunocomprometidos são graves, crônicas e, muitas vezes com extensas lesões de mucosas que tendem a ser mais invasivas, a cicatrização mais lenta e prolongado o período de excreção viral (SNOECK, 2000).

### 1.4.3 Herpes Neonatal

A infecção neonatal por HSV é uma doença devastadora com uma mortalidade elevada se não tratada (BRADY; BEIRSTEIN, 2004). Sessenta a setenta por cento das infecções são causadas por HSV-2 e o restante dos casos por HSV-1 (KIMBERLIN et al., 2001).

O HSV neonatal é adquirido em um dos três distintos tempos: em 5% há infecção in útero e em 85% a infecção ocorre no momento do parto e 10% pós-parto (KIMBERLIN et al., 2007). O quadro grave é denominado de doença disseminada do recém nato e envolve vários órgãos, incluindo o pulmão, fígado, glândula adrenal, pele, olhos e cérebro (KIMBERLIN et al., 2001) (Figura 8).

As mulheres que adquirem o HSV no final gravidez, mas são soronegativas possuem pelo menos, dez vezes mais probabilidade de transmitir o HSV para o bebê que mulheres que adquirem HSV antes da gravidez ou que possuam herpes genital recorrente (GUPTA et al., 2007). A prevenção concentra-se em proteger a criança das secreções vaginais durante o parto, sendo assim, a cesariana a medida de prevenção recomendada (BROWN et al., 2003). No entanto, na maioria dos casos o herpes neonatal é adquirido no momento do parto de mães com infecção genital assintomática (ANZIVINO et al., 2009).

**Figura 8** – Manifestações clínicas do herpes neonatal



(GUPTA et al., 2007).

#### 1.4.4 Encefalite e Meningite

O HSV tem sido reconhecido como um patógeno que afeta também o sistema nervoso central, devido à sua natureza neurotrópica (ALTUGLU et al., 2006). A encefalite herpética (HSE) tem sido relatada principalmente como sendo causada pelo HSV-1, com mais de 90% dos casos em adultos, porém, HSE neonatal é mais frequentemente associado com o HSV-2 (WILSON, 2009). É associada com 70% de mortalidade em pacientes não tratados e uma elevada incidência de sequelas neurológicas severas e permanentes em casos tratados (WHITLEY, 2006).

A incidência anual é calculada de 1-4 por 1 milhão de pacientes (SAUERBREI et al., 2000). A HSE pode ocorrer como consequência de infecções primárias ou recorrentes, resultando em necrose focal do lobo frontal e/ou lobo temporal do cérebro e pode ocorrer com menor frequência encefalites leves e subagudas, meningite ou mielite (SAUERBREI et al., 2000). O HSV-2 pode provocar encefalite hemorrágica necrosante em recém-nascidos de mães com herpes genital (KIMBERLIN, 2004).

A meningite linfocitária (meningite de Mollarets) tem sido associada com recorrentes infecções por HSV-2 (BACHMEYER et al., 1996). Há o envolvimento do nervo sacral com disfunção do sistema nervoso autônomo, dormência, dor pélvica, formigamento, retenção urinária, constipação, cefaléia, febre, leve fotofobia, pleocitose linfocítica do líquido cefalorraquidiano e os sintomas geralmente desaparecem em poucos dias, mas em alguns casos, danos neurológicos levam de semanas a meses para desaparecerem, eventualmente, tornando-se permanentes (MARQUES; STRAUS, 2000). São relatados também raros casos de mielite transversa e Síndrome de Guillain-Barré, após a infecção HSV (MARQUES; STRAUS, 2000).

#### 1.4.5 Herpes Ocular

HSV é uma importante causa de doenças oculares (LIESEGANG, 2001). Infecções sintomáticas primárias por HSV-1 envolvem principalmente a orofaringe e raramente o olho (menos de 1% dos casos) (LABETOULLE et al., 2000). Em contraste, sintomas oculares relacionadas à reativação viral são frequentes, afetando 21 em 100.000 pessoas, por ano, nos países da Europa Ocidental (LIESEGANG, 2001). Também é a causa mais comum de cegueira nos Estados Unidos com cerca de 300.000 casos de infecções oculares diagnosticados anualmente (WHITLEY; ROIZMAN, 2001). Doenças oculares

primárias ou recorrentes causadas pelo HSV causam blefarite, conjuntivite, ceratite epitelial, ceratite estromal, iridociclite ou retinite (ARDUINO; PORTER, 2008).

A córnea é o sítio mais frequente da doença herpética ocular (LABETOULLE et al., 2003). As observações clínicas sugerem que, infecção primária por HSV-1 na mucosa oral pode levar a latência em diferentes tipos de neurônios, o que pode explicar os vários tipos de doenças oculares herpéticas (LABETOULLE et al., 2003)

A ceratite herpética continua sendo uma das principais causas de morbidade visual (WILHELMUS, 2000) (Figura 9). HSV-1 é a causa de 78-98% dos casos de ceratite herpética (PEPOSE et al., 2006). A doença bilateral ocorre em 1.3-12% dos casos em jovens e tende a ser mais grave (KAYE; CHOUDHARY, 2006).

**Figura 9** – Manifestações clínicas do herpes ocular.



Ceratite herpética no olho esquerdo 3 meses após o diagnóstico (BODAGHI et al., 2000).

#### 1.4.6 Panarício Herpético

O panarício herpético é uma rara manifestação de HSV na falange distal em um ou mais dedos e tipicamente ocorre depois da autoinoculação, em pacientes com lesões herpéticas orais ou genitais ou em profissionais da saúde (SZINNAI et al., 2001).

Em crianças é causada quase que exclusivamente por HSV-1, durante a gengivoestomatite herpética primária (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007). Crianças geralmente de 1-3 anos de idade são afetadas (WU; SCHWARTZ, 2007) (Figura 10). Em adultos a infecção pode ser causada pelo HSV-1 ou HSV-2 (RUBRIGHT; SHAFRITZ, 2011). As lesões aparecem após um período de incubação de 2 a 20 dias após a inoculação e está associada com dor intensa (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007). Febre e sintomas sistêmicos são raros (RUBRIGHT; SHAFRITZ, 2011). As lesões regridem normalmente em 3-4 semanas, mas podem ocorrer recorrências (SIMMONS, 2002). As taxas de recidivas são inferiores aos observados nas infecções oral ou genital (BRADY; BERNSTEIN, 2004).

**Figura 10** – Manifestações clínicas do parâncio herpético.



Panarício herpético no dedo médio de uma criança de 2 anos de idade apresentando eritema, erupções vesiculares e ulcerações, em crostas, nos dígitos afetados (FATAHZADEH & SCHWARTZ, 2007).

#### 1.4.7 Herpes Gladiatorum

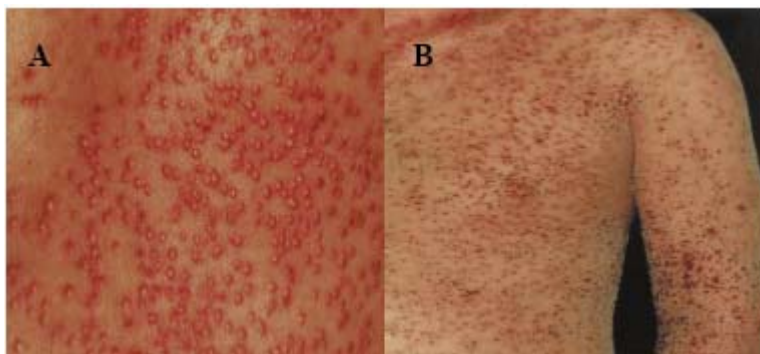
Herpes gladiatorum refere-se a infecções por HSV-1 entre os atletas, em esportes de contato, como luta livre e rugby (BELONGIA et al., 1991). Infecções primárias e recorrentes são caracterizadas por erupções cutâneas na face, orelhas e pescoço (ESMANN, 2001). O uso profilático de antivirais durante a época desportiva tem sido útil em tais casos (SIMMONS, 2002).

#### 1.4.8 Eczema Herpético

Eczema herpético (EH) é o termo aplicado às infecções disseminadas por HSV em pacientes com dermatite atópica e é frequentemente associada com sintomas sistêmicos (KHAN et al., 2005).

Clinicamente, os pacientes com EH disseminado, apresentam erupções em forma de vesículas (Figura 11A), acompanhada por febre, mal estar e linfadenopatia (ARDUINO; PORTER, 2008). A cabeça, pescoço e tronco são mais comumente afetados (WOLLENBERG et al., 2003). Após duas semanas, há formação de crostas (Figura 11B) e as lesões geralmente regridem dentro de 2-6 semanas (WOLLENBERG et al., 2003). Complicações associadas incluem ceratoconjuntivite e viremia, envolvendo múltiplos órgãos, levando a meningite e encefalite, com taxa de mortalidade de aproximadamente 75% (FORTUNO et al., 2002).

**Figura 11** – Manifestações clínicas do eczema herpético.



(A): EH, estágio vesiculopustular. Erupções disseminadas com formação de bolhas e pústulas na pele (B): EH em fase de crosta (WOLLENBERG et al., 2003).

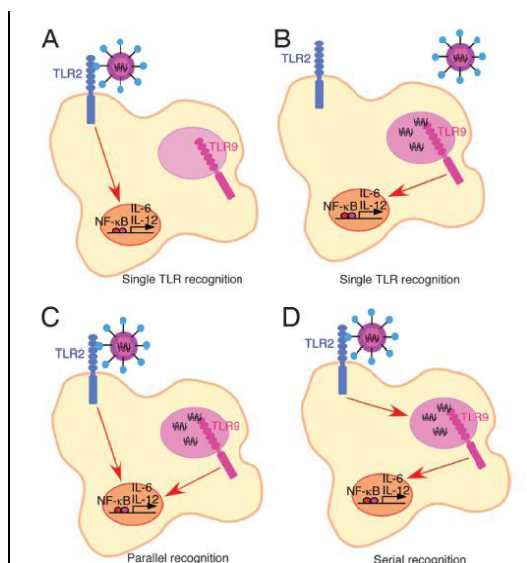
## 1.5 IMUNIDADE

### 1.5.1 Imunidade Inata

Interferons tipo I (IFN I) são a primeira linha de defesa inata do hospedeiro contra a infecção viral (GARCIA et al., 2006). Certos tipos de células, tais como células dendríticas (CDs) geram níveis elevados de IFN I (LIU, 2005). A ação biológica dos IFN I é autócrina ou parácrina e, assim, a célula infectada secreta moléculas de IFN que agirão em outras células vizinhas, não infectadas, protegendo-as da infecção viral (CONRADY et al., 2009).

Padrões moleculares associados ao patógenos (PAMPs) são reconhecidos pelo hospedeiro com frequência através de proteínas TLR (receptores semelhantes a toll) (TAKEDA; AKIRA, 2005). Os TLR alertam o hospedeiro na presença de um patógeno iniciando eventos de sinalização intracelular através do recrutamento de proteínas adaptadoras (FINBERG et al., 2007). No caso do HSV, diferentes PAMPs são reconhecidos por mais de um TLR, essa interação com a célula hospedeira é capaz de levar a ativação de TLR2, supostamente através de sua gD e de TLR9, através de seu DNA genômico (MORRISON, 2004).

Vários mecanismos podem ser postulados para o reconhecimento de HSV via TLR por CDs (Figura 12) no entanto, as contribuições desses TLR no reconhecimento do HSV e indução de citocinas pró-inflamatórias nas DCs permanecem obscuras (SATO et al., 2006).

**Figura 12** – Reconhecimento do HSV via TLR.

O mais simples é a ativação do TLR2 ou TLR9 nas CDs (Figura A e B). Alternativamente, HSV pode ativar ambas TLR2 e TLR9 nas CDs com pelo menos duas possibilidades, a primeira é o reconhecimento do HSV por duas vias distintas (Figura C). Na segunda possibilidade, o HSV é detectado em sequência, primeiro por TLR2 na superfície da célula, e, posteriormente, via TLR9 intracelular na CD (Figura D) (SATO et al., 2006).

### 1.5.2 Imunidade Adquirida

A imunidade celular é o principal mecanismo para o controle de infecções iniciais e recorrentes causadas por HSV. Em particular, linfócitos T citotóxicos (LTC), natural killer (NK), macrófagos e IFN $\gamma$  e IL-2 podem ser particularmente importante na contenção das infecções por HSV (WOO; CHALLACOMBE, 2007).

Células infectadas por vírus comumente apresentam uma diminuição da expressão do complexo de histocompatibilidade maior classe I (MHC I) (ORANGE et al., 2002). Dessa forma a baixa expressão de MHC I em células infectadas permite o reconhecimento dessas células pelas células NK sem que haja o engajamento dos receptores inibitórios, levando à ativação das células NK (MOCIKAT et al., 2003). O reconhecimento de peptídeos virais via MHC I, por LTC é um evento chave na eliminação de células infectadas por vírus (HANSEN; BOUVIER, 2009). As células NK e os LTC contêm enzimas proteolíticas (granzimas) e perforinas em grânulos intracelulares que causam a destruição da célula alvo (LANIER, 2008).

As CDs são essenciais para ativação de células T e diferenciação em células T helper tipo 1 (Th1), células T helper tipo 2 (Th2) e LTC (POLARA et al., 2004). São recrutadas para o local da infecção, amplificando a produção local de IFN e induz a produção de LTC (POLARA et al., 2004).

As glicoproteínas do envelope, gB, gH e gL induzem a formação de anticorpos neutralizantes (MITCHELL & STEVENS, 1996). Os HSV possuem a capacidade de disseminação célula a célula (COCCHI et al., 2000). Essa disseminação do vírus célula a célula em tecidos epiteliais envolve o movimento de partículas virais através de junções celulares, sem atingir o meio extracelular (JOHNSON et al., 2001). Esse processo provavelmente explica por que os níveis de anticorpos neutralizantes não diminuem a gravidade das lesões por HSV ou impedem infecções recorrentes (COREY; SPEAR, 1986).

### 1.5.3 Mecanismos de Evasão

O HSV desenvolveu várias estratégias de evasão da resposta imune do hospedeiro tendo como alvo proteínas do complemento, células NK, moléculas do MHC I ou complexo de histocompatibilidade maior classe II (MHC II) e anticorpos (FAKIOGLU et al., 2008).

Uma defesa do hospedeiro é a apoptose em resposta aos distúrbios da maquinaria celular pelas proteínas virais ou do sistema imune (ROIZMAN; PELLET, 2001). O HSV bloqueia a apoptose por pelo menos três proteínas, Us3, gJ, e gD causada por lesão celular específica (WHITLEY & ROIZMAN, 2001).

O HSV-1 bloqueia a ativação de LTC, impedindo a apresentação de antígenos via MHC I (HILL et al., 1995). O HSV-1 codifica o gene IE ICP47, que impede o transporte de peptídeos antigênicos pela TAP para o retículo endoplasmático e impedindo assim a apresentação de antígenos via MHC I (HEWITT, 2003). A ICP47 se liga ao sítio de ligação do peptídeo da TAP e impede a ligação de outros peptídeos que são substratos adequados para a TAP (AHN et al., 1996). Também induz uma mudança conformacional da TAP, que pode ser suficiente para desestabilizá-la e inativá-la (LACAILLE; ANDROLEWICZ, 1998; HANSEN; BOUVIER, 2009). A ICP47 efetivamente encerra o fluxo TAP-dependente de peptídeos para o retículo endoplasmático comprometendo severamente a montagem de moléculas do MHC I e como resultado, a apresentação e o reconhecimento de antígenos do HSV por células T CD8<sup>+</sup> são restritas, permitindo que o vírus persista por mais tempo na célula infectada (LACAILLE; ANDROLEWICZ, 1998).

Citocinas com atividade antiviral e anticorpos contra as proteínas virais são induzidos por moléculas MHC II, na presença de epítomos virais (SIEVERS et al., 2002). Estas funções são mediadas por células T CD4<sup>+</sup>, que ativam células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas que são específicas contra células infectadas por vírus (WIERTZ et al., 2007). Ao contrário das

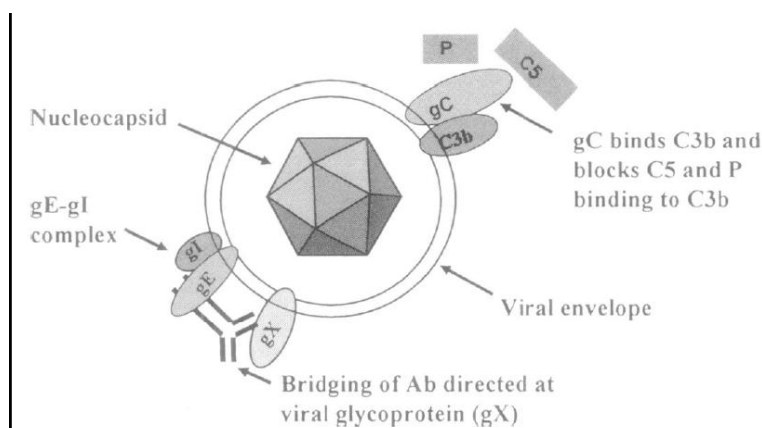
moléculas MHC I que usam a degradação citoplasmática como fonte de peptídeos, o MHC II adquire peptídeos antigênicos em compartimentos endossomais/lisossomais (NEUMANN et al., 2003). O HSV-1 inibe a capacidade de células B linfoblásticas de estimular linfócitos T CD4+ (BARCY; COREY, 2001). Por interferir com etapas específicas na via biossintética de processamento do MHC II, o vírus pode manipular a apresentação de polipeptídeos via MHC II (NEUMANN et al., 2003).

A gE e gI do HSV-1 formam um complexo heterodímero com alta afinidade para o receptor Fc da imunoglobulina G (IgG) (FAVOREEL et al., 2003). O domínio Fab do anticorpo IgG liga-se ao seu antígeno alvo, enquanto a região Fc se liga ao complexo gE-gI, que bloqueia as atividades mediadas pelo domínio Fc da IgG, incluindo a ativação do complemento e da citotoxicidade celular dependente de anticorpo (JUDSON et al., 2003) (Figura 13).

O sistema complemento atua contra a infecção viral em múltiplos mecanismos, como por exemplo, o complexo de ataque à membrana (MAC) medeia a lise osmótica das células infectadas criando um poro na bicamada lipídica (LEE et al., 2003). Várias proteínas do complemento (C3a, C4a e C5a), conhecidas como anafilatoxinas agem no sentido de recrutar leucócitos para o local da infecção, enquanto a opsonização pelo complemento de células infectadas por deposição de C3b pode levar à fagocitose por leucócitos (FAVOREEL et al., 2003).

A gC do HSV-1 medeia a evasão da resposta imune ao se ligar ao C3 e fragmentos C3b, iC3b e C3c e inibe a interação de C5 e properdina (P) com C3b, uma interação que é necessária para geração de C5 convertase e o MAC, bloqueando assim a ativação de ambas vias clássica e alternativa do complemento (HOOK et al., 2006) (Assim, a gC do HSV-1 impede a neutralização do vírus mediada pelo complemento e inibe a lise de células infectadas LUBINSKI et al., 1998).

**Figura 13** – Modelo de evasão da resposta imune mediada por gC e gE.



A gC se liga a C3b e bloqueia C5 e properdina (P) que se ligam ao C3b, inibindo a ativação do complemento. O domínio Fab da IgG se liga ao seu alvo (representado por gX) e Fc se liga a gE-gI, que bloqueia a ativação do complemento (FRIEDMAN, 2003).

## 1.6 TRANSMISSÃO VIRAL

O primeiro contato com o HSV-1 ocorre entre os seis primeiros meses a três anos de idade, através da saliva (ARDUINO; PORTER, 2008). O principal modo de aquisição do HSV é através de lesões da pele ou mucosas por exposição às secreções de um indivíduo com infecção ativa primária ou recorrente (BEAUMAN, 2005). A primeira replicação ocorre nas células epiteliais locais, seguida de disseminação pelas vias hematogênica e neurogênica, para os órgãos alvo (BERRINGTON et al., 2009). HSV-1 pode permanecer viável na pele, roupas, ou plásticos por breves períodos, facilitando a transmissão através de um contato direto, tais como beijos ou partilhas de utensílios de uso pessoal (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007).

O HSV-2 é transmitido sexualmente principalmente por secreções genitais (BEAUMAN, 2005). Deve ser levado em consideração uma série de fatores biológicos como: idade, gênero, raça, status sorológico do parceiro, uso de preservativos, frequência de contatos sexuais, duração dos relacionamentos (SACKS et al., 2004a). Os estudos mostram que apenas 10-25% das pessoas com anticorpos anti-HSV-2 são conscientes de que têm herpes genital (GUPTA et al., 2007). Além disso, a excreção viral sem sintomas ocorre frequentemente em indivíduos infectados (KOELLE; WALD, 2000) e é responsável por pelo menos 70% da transmissão (WALD et al., 2001). A excreção viral assintomática do herpes genital pode levar a transmissão do vírus para outras pessoas, sendo um risco significativo para a transmissão entre parceiros e de mãe para filho (SACKS et al., 2004b), assim como na infecção lábil, em infecções primárias ou recorrentes (WALD et al., 2004).

Foi descrito por COREY et al. (2004) que a terapia antiviral reduz a frequência e o grau de excreção viral.

## 1.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico para HSV pode ser realizado a partir de esfregaço do material da lesão, pelo isolamento do vírus, por técnicas imunocitoquímicas, como a imunofluorescência ou moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (MADHAVAN et al., 1999).

Algumas técnicas são utilizadas na caracterização do HSV, como a variação antigênica, diferença na formação de plaque, sensibilidade a temperaturas (por exemplo, o HSV-1 pode se replicar em temperaturas mais elevadas que o HSV-2), sensibilidade a heparina e a bromovinildeoxiuridina (BVDU) (BOWLES et al., 2008).

O vírus pode ser obtido das lesões vesiculares e, eventualmente, de lesões que já se apresentam na forma de crostas (SCOULAR, 2002). Assim, as amostras clínicas são coletadas por punção do líquido das vesículas ou por aplicação de suabe às lesões e, posteriormente, inoculação direta em cultura de células susceptíveis, após descontaminação do material (HUBER, 2003).

As alterações citológicas em células infectadas consistem em modificações da estrutura nuclear e marginalização da cromatina (ROIZMAN et al., 2007). São observados corpúsculos de inclusão intranucleares acidófilos de Cowdry tipo A, assim como a formação de sincícios (WHITLEY, 2002). O isolamento do vírus de lesões de pele e mucosa, em culturas de células, ainda é bastante utilizado, porém não permite a distinção entre os sorotipos 1 e 2 (PEÑA et al., 2009). Esta distinção pode ser feita por imunofluorescência, que é uma técnica rápida, porém, a sensibilidade é relativamente baixa (ABRAHAM et al., 2009).

A avaliação de anticorpos anti-HSV pode ser feita por vários métodos imunológicos sendo a reação de ELISA comumente utilizado (ASHLEY, 2002). Níveis elevados de imunoglobulina M (IgM) são coerentes com uma infecção primária, enquanto elevados níveis de IgG são sugestivos de uma infecção passada (NADELMAN & NEWCOMER, 2000). No entanto, a extensa reatividade cruzada entre o HSV-1 e HSV-2 faz com que seja impossível diferenciar infecções primárias e recorrentes (USTAÇELEBI, 2001). A maioria dos anticorpos anti-HSV são contra as glicoproteínas de superfície. Atualmente, nenhuma reatividade cruzada é mostrada entre as gG do HSV-1 e do HSV-2 (ASHLEY et al., 1998). Estudos têm mostrado que os testes de IgG como imunoenaios ou imunoblots são os

mais precisos para distinguir entre infecção com o HSV-1 ou HSV-2 (SAUERBREI & WUTZLER, 2004).

Por outro lado a PCR, permite o diagnóstico das infecções pelo HSV em até 24 horas, apresenta 100% de especificidade e 99% de sensibilidade (PEÑA et al., 2009). A incorporação de protocolos de PCR para diagnóstico de HSV tem sido facilitada pelo PCR em tempo real (WHILEY et al., 2004). A PCR em tempo real oferece um resultado rápido reduz o potencial de contaminação, em relação ao método de PCR convencional (WHILEY et al., 2001).

## 1.8 TRATAMENTO

Atualmente, mais de 40 antivirais foram licenciados para o uso clínico (DE CLERCQ; FIELD, 2006). Destes, 20 antivirais são utilizados no tratamento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e a outra metade utilizada no tratamento de infecções causadas por herpesvírus (HSV, VZV e HCMV), vírus da hepatite B, vírus da hepatite C ou infecções pelo vírus influenza. No entanto, esses fármacos apresentam graves restrições de uso, tais como reduzido espectro de atividade, utilidade terapêutica limitada e vários graus de toxicidade (DE CLERCQ, 2005a). Além disso, mutações na TQ ou DNA pol virais podem produzir cepas resistentes à droga (COEN; RICHMAN, 2007). Entre os antivirais utilizados no tratamento de indivíduos infectados pelo HSV se encontram:

### 1.8.1 Aciclovir (ACV) e Valaciclovir (VACV)

O ACV e VACV têm sido considerados seguros, pois causam efeitos secundários mínimos (SOUZA et al., 2008). O ACV foi o primeiro antiviral dotado de atividade seletiva e continua sendo o de escolha para tratamentos de infecções por HSV em pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos, mesmo, aproximadamente, trinta anos após sua descoberta (SAUERBREI et al., 2010). Continua sendo o tratamento de padrão ouro em relação aos outros medicamentos anti-HSV (CHILUKURI; ROSEN, 2003). É um análogo da guanosina que tem de ser fosforilada três vezes para se tornar ativa (STEIN, 1997). A primeira fosforilação é feita pela proteína viral TQ e a segunda e terceira fosforilações são realizadas pelas TQ celulares (FROBERT et al., 2008). O ACV trifosforilado atua por inibição competitiva da DNA polimerase viral e é um terminador de cadeia do DNA (SAIJO

et al., 2002). O ACV é cem vezes mais seletivo para a DNA pol viral do que para a enzima celular, possuindo, desta forma, baixa toxicidade (BRADY; BEIRNSTEIN, 2004).

O uso indiscriminado de ACV levou ao aparecimento de cepas de HSV resistentes, relatado pela primeira vez por COEN & SCHAFFER (1980). Infecções por HSV resistentes ao ACV são importantes em pacientes imunocomprometidos (CHIBO et al., 2004). Nesses pacientes, a prevalência de resistência é cerca de 5%, mas pode chegar a 14-30% em pacientes submetidos a transplantes de medula óssea (DE CLERCQ, 2004). Entre os pacientes imunocompetentes, a resistência ao ACV é rara, tendo sido avaliada em níveis abaixo de 1% na população (MORFIN; THOUVENOT, 2003). As cepas mutantes selecionadas dizem respeito às mutações na TQ (95% dos casos) ou na DNA pol viral (5% dos casos) (FROBERT et al., 2008).

O ACV pode ser administrado via oral, tópica ou intravenosa dependendo do tipo de infecção (ROTTINGHAUS; WHITLEY, 2007). Reações adversas podem ocorrer quando a droga é administrada por via intravenosa, podendo levar a falência renal (LYON, 2002). Outros efeitos colaterais incluem flebite local, elevação dos níveis da uréia sanguínea e creatinina sérica, neutropenia, inespecíficos sintomas gastrointestinais (náuseas, vômito, diarreia), e convulsões (MUNOZ, 2000).

VACV é um derivado L-valil éster do ACV e seu espectro antiviral e sua potência são semelhantes ao do ACV (SNOECK, 2000). O fármaco foi desenvolvido para superar a pouca biodisponibilidade do ACV (BEAUTNER, 1995). Após a administração oral, mais de 99% de VACV é convertido na sua forma ativa (WU et al., 2003). O VACV é melhor absorvido no intestino pelo mecanismo de transporte ativo (PERRY; FAULDS, 1996).

### 1.8.2 Penciclovir(PCV) e Famciclovir (FCV)

Devido a baixa biodisponibilidade oral o PCV é utilizado no tratamento tópico (SPRUANCE et al., 1997). O PCV possui maior afinidade para TQ viral do que o ACV e conseqüentemente, os níveis de PCV trifosforilados são muito mais elevados (LOWE et al., 1995). Embora PCV trifosforilado seja 100 vezes menos potente na inibição da DNA pol viral que o ACV trifosforilado, o PCV atinge maiores concentrações intracelulares e tem uma meia-vida mais longa em células infectadas pelo HSV (CIRELLI et al., 1996). O PCV permite um limitado alongamento da cadeia de DNA viral em relação ao ACV (BACON et al., 2003).

O FCV é um pró-fármaco oral, éster diacetil 6-desoxi do PCV (SNOEK, 2000). Após a administração oral, o FCV é rapidamente absorvido no intestino e assim como VACV é metabolizado na parede intestinal e no fígado (via desacetilação e oxidação) para sua conversão em PCV (PERRY; WAGSTAFF, 1995).

### 1.8.3 Ganciclovir (GACV) e Valganciclovir (VGACV)

O GACV é um análogo de guanossina acíclico que é estruturalmente relacionado a ACV (TABBARA; BALUSHI, 2010). Ganciclovir, sob certas condições, é ainda mais eficaz que o ACV contra o HSV, embora tenha maior potencial tóxico (CRUMPACKER, 1996). O GACV está associado com a neurotoxicidade (YOUNG, 2005), supressão da medula óssea, carcinogenicidade (LIU et al., 2004). Como o ACV, a biodisponibilidade oral do GACV é limitada, e, para superar este problema o éster valina de ganciclovir VGACV foi sintetizado (DE CLERCQ; FIELD, 2006). VGACV pode ser convertido a ganciclovir no intestino (KIM et al., 2003).

### 1.8.4 Trifluridina (F3T)/Iodo-desoxiuridina (IDU)/Vidarabina (Ara-A)

Foram os primeiros antivirais utilizados no tratamento de HSV, como análogos nucleosídeos, denominados IDU, F3T e Ara-A, respectivamente, estabelecidos em 1959, 1964 e 1968 (FIELD, 2001).

Cepas IDU-resistentes foram notificados no início de 1963 (SMITH, 1963).

F3T e IDU são análogos da timidina, utilizados para o tratamento tópico de infecções oculares por HSV, como ceratoconjuntivite primária e ceratite recorrente (CHILUKURI & ROSEN, 2003). Ambas inibem o HSV por substituição da timina durante a replicação do DNA viral e inibição da timidilato sintase (MURPHY et al., 1992). Apresentam efeitos colaterais e toxicidade significativa (irritação local, edema da córnea e da conjuntiva) (BROWN et al., 2002). A F3T somente é licenciada nos Estados Unidos e disponível na forma solução de colírio a 1%, para tratamento de infecções oculares (BRADY; BERNSTEIN, 2004).

A Ara-A ou arábino adenina foi o primeiro análogo de nucleosídeo a ser utilizado como antiviral e administrado por via sistêmica em casos de encefalite herpética (JONES, 1998). É um análogo da adenina, que é fosforilada por TQ celulares para Ara-A trifosforilada, na qual competitivamente inibe DNA pol viral (HAYDEN; DOUGLAS, 1990).

Está associada com toxicidade significativa, o que limita seu uso (SACKS et al., 1979). A droga está disponível par uso tópico na concentração de 3% para tratamento de infecções oculares (BRADY; BERNSTEIN, 2004).

#### 1.8.5 Bromovinildeoxiuridina (BVDU)

A BVDU ou brivudina atua como inibidor da DNA pol viral após fosforilação intracelular, também pode atuar como um substrato alternativo e, portanto, ser incorporado pelo DNA viral, reduzindo sua integridade e prejudicando seu funcionamento (DE CLERCQ, 2005b). A primeira e segunda fosforilação são catalisadas pela TQ viral, o que explica a notável especificidade de BVDU (DE CLERCQ, 2004). Está disponível para uso tópico e oral no tratamento de infecções causadas pelo HSV-1 somente na Alemanha e em outros países da Europa (DE CLERCQ, 2005b).

A brivudina não inibe o HSV-2 porque a TQ desse vírus não é capaz de converter eficientemente a brivudina monofosforilada para a forma difosforilada, resultando em uma redução substancial da forma ativa, brivudina trifosforilada (DE CLERCQ, 2005c). No entanto, pode ser usada como marcador para a diferenciação entre os dois tipos antigênicos (ZHENG et al., 1983).

#### 1.8.6 Foscarnet (PFA)

PFA é um análogo de pirofosfato que se une ao sítio do pirofosfato da DNA pol viral inibindo-a e impedindo sua replicação (DE CLERCQ, 2004). É administrado por intravenosa é recomendado para caso de cepas HSV ACV-resistente (BRADY; BERNSTEIN, 2004). Está associado à insuficiência renal, devido ao seu potencial nefrotóxico, requer uma infusão lenta e pré-hidratação extensiva (NAESENS; DE CLERCQ, 2001). Este medicamento quando administrado por longos períodos também pode levar à seleção de mutantes (WU et al., 2005).

#### 1.8.7 Cidofovir (CDV)

Embora CDV não seja aprovado para o tratamento do HSV pelo FDA (Food and Drugs Administration) a necessidade de terapias complementares para o herpes ACV-resistente viabilizou esta opção (BROWN et al., 2002). Como PFA, a CDV não requer

fosforilação pela TQ viral e é eficaz contra cepas HSV TQ-deficiente (BRADY; BERNSTEIN, 2004). O uso de CDV é restrito ao tratamento de HSV resistente ao ACV e PFA (CHILUKURI; ROSEN, 2003). Efeitos adversos no sítio de aplicação podem ser observados e incluem dor, prurido, alterações da pele, ulcerações e atraso na cura de lesões (DE CLERCQ, 2004).

## 1.9 VACINAS

O desenvolvimento de vacinas contra o HSV tem sido um desafio porque o vírus estabelece latência e a reativação pode ocorrer independentemente da imunidade humoral e celular (BERNSTEIN; STANBERRY, 1999).

Uma vacina ideal deveria induzir respostas imunes adequadas para evitar a infecção como por exemplo: atenuar episódios clínicos primários, impedir a colonização dos vírus nos gânglios, ajudar a reduzir a frequência ou severidade das recorrências e reduzir a excreção viral em indivíduos ativamente infectados ou portadores assintomáticos (WHITLEY; ROIZMAN, 2002).

A busca por uma vacina para HSV-1 e HSV-2 abrange nove décadas. As vacinas de vírus inativados foram desenvolvidas em 1930 e foram feitas a partir de tecido de animal infectado com HSV (FRANK, 1938). Apesar dos muitos avanços feitos com vacinas inativadas, nenhuma das candidatas a vacina se mostrou suficientemente imunogênica (WU et al., 2004).

Os estudos em animais que envolvem as inoculações de DNA plasmidial contendo os genes virais desejados têm mostrado resultados promissores para a prevenção de infecções (ROUSE et al., 1998). Essas vacinas são capazes de expressar apenas 1 ou 2 antígenos virais, mas podem induzir imunidade mediada por células sem a necessidade de potentes adjuvantes (WU et al., 2004).

Dois vacinas de subunidades recombinantes distintas estão sendo desenvolvidas através da gB e gD de superfície do HSV-2 e o adjuvante MF59 (LANGENBERG et al., 1995). O desenvolvimento destas vacinas foi interrompido prematuramente porque os resultados demonstraram total falta de eficácia tanto para uso preventivo quanto o terapêutico (COREY et al., 1999). A segunda vacina recombinante desenvolvida contém a gD e lipídeos adjuvantes monofosforil e está sendo avaliada em ensaios clínicos de fase III (STANBERRY, 1998). Resultados dos ensaios clínicos com a

candidata indicaram que esta possui uma eficácia clínica de 73% na proteção de mulheres que são sorologicamente negativas para o HSV-1 e HSV-2 (STANBERRY et al., 2002).

Vacinas com cepas cuja replicação é deficiente ou mutante têm sido investigadas (Liu et al., 2009). A replicação deficiente é espontânea ou pode ser geneticamente modificada, envolve supressão de um gene que é essencial para replicação do vírus (DUDEK & KNIPE, 2006).

Vacinas de vírus atenuados destituídos de genes envolvidos na evasão da resposta imune (p.ex. ICP47 e VHS), estão sendo consideradas candidatas (SAMADY et al., 2003). Um vírus atenuado HSV-2 com uma deleção no domínio PK da subunidade da ribonucleotídeo redutase (ICP10) tem sido usado com sucesso para imunizar e proteger camundongos e cobaias, resultando na redução da incidência e frequência de recorrência em animais previamente infectados (GYOTOKU et al., 2002). Vacinas candidatas com deleção no gene ICP10 estão sendo testadas em um estudo de fase II em humanos e da mesma forma, uma candidata gH-deficiente está sendo testada como uma vacina profilática (MOINGEON et al., 2003).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAIS

Avaliar as amostras clínicas de HSV obtidas, comparativamente às amostras controles, assim como, analisar o comportamento destas frente aos antivirais disponíveis.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- a) Isolar e adaptar vinte e duas amostras de HSV provenientes de amostras clínicas em cultura de células HEp-2.
- b) Analisar a citopatogenicidade das cepas *in vitro* através da análise de desenvolvimento de plaques.
- c) Avaliar os isolados frente a antivirais comerciais: aciclovir, foscarnet, arabino citosina e trifluridina, através do ensaio de plaque e dose infectante em cultura de células.
- d) Estabelecer um antivirograma.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, A. M.; BABU, M.; KAVITHA, S.; JESUDASON, M. V.; SRIDHARAN, G. 2009. A molecular method for typing herpes simplex virus isolates as an alternative to immunofluorescence methods. *Indian Journal of Medical Microbiology* 27(1): 22-26.
- AHN, K.; MEYER, T. H.; UEBEL, S.; SEMPÉ, P.; DJABALLAH, H.; YANG, Y.; PETERSON, P. A.; FRÜH, K.; TAMPE, R. 1996. Molecular mechanism and species specificity of TAP inhibition by herpes simplex virus ICP47. *The EMBO Journal* 15(13):3247-55.
- ALTUGLU, I.; ZEYTIÑOGLU, A.; SIRIN, H.; YUCEYAR, N.; ERENŞOY, S. 2006. Comparison of different polymerase chain reaction methods for detection of herpes simplex virus types 1 and 2 encephalitis. *European Journal Clinical Microbiology & Infectious Disease* 25(10):669-671.
- ANZIVINO, E.; FIORITI, D.; MISCHITELLI, M.; BELLIZZI, A.; BARUCCA, V.; CHIARINI, F.; PIETROPAOLO, V. 2009. Herpes simplex virus infection in pregnancy and in neonate: status of art of epidemiology, diagnosis, therapy and prevention. *Virology Journal* 6:40.
- ARDUINO, P. G.; PORTER, S. R. 2008. Herpes simplex virus type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 37(2):107-121.
- ASHLEY, R. 2002. Performance and use of HSV type-specific serology test kits. *Herpes* 9(2):38-45.
- ASHLEY, R. L.; MILITONI J.; LEE, F.; NAHMIAS, A.; COREY, L. 1998. Comparison of Western blot (immunoblot) and glycoprotein G-specific immunodot enzyme assay for detecting antibodies to herpes simplex virus type 1 and 2 in human sera. *Journal of Clinical Microbiology* 26(4):662-7.
- BACHMEYER, C.; DE LA BLANCHARDIERE, A.; LEPERCQ, J.; DHÔTE, R.; GRATEAU, G.; DETILLEUX, M.; TOURNAIRE, M.; CHRISTOFOROV, B. 1996. Recurring episodes of meningitis (Mollaret's meningitis) with one showing an association with herpes simplex virus type 2. *The Journal of Infection* 32(3):247-8.
- BACON, T. H.; LEVIN, M. J.; LEARY, J. J.; SARISKY, R. T.; SUTTON, D. 2003. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. *Clinical Microbiology Reviews* 16(1):114-128.
- BARCY, S.; COREY, L. 2001. Herpes simplex inhibits the capacity of lymphoblastoid B cell lines to stimulate CD4+ T cells. *Journal of Immunology* 166(10):6242-9.
- BEAUMAN, J. G. 2005. Genital herpes. *American Family Physician* 72(8):1527-34, 1541-2.
- BELONGIA, E. A.; GOODMAN, J. L.; HOLLAND, E. J.; ANDRES, C. W.; HOMANN, S. R.; MAHANTI, R. L.; MIZENER, M. W.; ERICE, A.; OSTERHOLM, M.T. 1991. An outbreak of herpes gladiatorum at a high-school wrestling camp. *The New England Journal of Medicine* 325(13):906-10.

- BERNSTEIN, D. I.; STANBERRY, L. R. 1999. Herpes simplex virus vaccines. *Vaccine* 17(13-14):1681-1689.
- BERRINGTON, W. R.; JEROME, K. R.; COOK, L.; WALD, A.; COREY, L.; CASPER, C. 2009. Clinical correlates of herpes simplex virus viremia among hospitalized adults. *Clinical Infectious Disease* 49(9):1295-301.
- BEAUTNER, K. R. 1995. Valacyclovir: a review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties, and clinical efficacy. *Antiviral Research* 28(4):281-90.
- BODAGHI, B.; MOUGIN, C.; MICHELSON, S.; AGUT, H.; DIGHIRO, P.; OFFRET, H.; FRAU, E. 2000. Acyclovir-resistant bilateral keratitis associated with mutations in the HSV-1 thymidine kinase gene. *Experimental Eye Research* 71(4):353-9.
- BOEHMER, P. E.; LEHMAN, I. R. 1997. Herpes simplex virus DNA replication. *Annual Reviews of Biochemistry* 66:347-84.
- BOWLES, R. N.; YEDOWITZ, J. C., BLAHO, J. A. 2008. Reconsideration of viral protein immunoblotting for differentiation of human herpes simplex viruses. *Diagnostic Microbiological of Infectious Disease* 62(2):167-76.
- BRADY, R. C.; BERNSTEIN, D. I. 2004. Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Research* 61(2):73-81.
- BROWN, T. J.; MCCRARY, M.; TYRING, S. K. 2002. Antiviral agents: Nonantiviral drugs. *The Journal of the American Academy of Dermatology* 47(4):581-99.
- BROWN, Z. A.; WALD, A.; MORROW, R. A.; SELKE, S.; ZEH, J.; COREY, L. 2003. Effect of serologic status and cesarean delivery on transmission rates of herpes simplex virus from mother to infant. *The Journal of the American Medical Association* 289(2):203-9.
- CELUM, C. L. 2004. The interaction between herpes simplex virus and human immunodeficiency virus. *Herpes* 11(1):36A-45A.
- CELUM, C.; LEVINE, R.; WEAVER, M.; WALD, A. 2004. Genital herpes and human immunodeficiency virus: double trouble. *Bulletin of the World Health Organization* 82(6):447-53.
- CHIBO, D.; DRUCE, J.; SASADEUSZ, J.; BIRCH, C. 2004. Molecular analysis of clinical isolates of acyclovir resistant herpes simplex virus. *Antiviral Research* 61(2):83-91.
- CHILUKURI, S.; ROSEN, T. 2003. Management of acyclovir-resistant herpes simplex virus. *Dermatologic Clinics* 21(2):311-320.
- CIRELLI, R.; HERNE, K.; MCCRARY, M.; LEE, P.; TYRING, S. K. 1996. Famciclovir: review of clinical efficacy and safety. *Antiviral Research* 29(2-3):141-51.
- CLIFFE, A. R.; GARBER, D. A.; KNIFE, D. M. 2009. Transcription of the herpes simplex virus latency-associated transcript promotes the formation of facultative heterochromatin on lytic promoters. *Journal of Virology* 83(16):8182-8190.

- COCCHI, F.; MENOTTI, L.; DUBREUIL, P.; LOPEZ, M.; CAMPADELLI-FIUME, G. 2000. Cell-to cell spread of wild-type herpes simplex virus type 1, but not of syncytial strains, is mediated by the immunoglobulin-like receptors that mediate virion entry, nectin1 (PRR 1/HveC/HlgR) and nectin2 (PRR2/HveB). *Journal of Virology* 74:(8)3909-17.
- COEN, D. M.; RICHMAN, D. D. Antiviral agents. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M (eds.). *Fields Virology*, 5th. 2007. Vol I. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. 447-485p.
- COEN, D. M.; SCHAFFER, P. A. 1980. Two distinct loci confer resistance to acycloguanosine in herpes simplex virus type 1. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 77(4):2265-73.
- CONRADY, C. D.; DREVETS, D. A.; CARR, D. J. 2009. Herpes simplex type I (HSV-1) infection of the nervous system: is an immune response a good thing? *Journal of Neuroimmunology* 220(1-2):1-9.
- COREY, L.; LANGENBERG, A. G.; ASHLEY, R.; SEKULOVICH, R. E.; IZU, A. E.; DOUGLAS, J. M. JR.; HANDSFIELD, H. H.; WARREN, T.; MARR, L.; TYRING, S.; DICARLO, R.; ADIMORA, A. A.; LEONE, P.; DEKKER, C. L.; BURKE, R. L.; LEONG, W. P.; STRAUS, S. E. 1999. Recombinant glycoprotein vaccine for the prevention of genital HSV-2 infection: two randomized controlled trials. *The Journal of the American Medical Association* 282(4):331-40.
- COREY, L.; SPEAR, P. G. 1986. Infections with herpes simplex viruses (1). *The New England Journal of Medicine* 314(11):686-91.
- COREY, L.; WALD, A.; CELUM, C. L.; QUINN, T. C. 2004. The effects of herpes simplex virus-2 on HIV-1 acquisition and transmission: a review of two overlapping epidemics. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 35(5):435-45.
- COREY, L.; WALD, A.; PATEL, R.; SACKS, S. L.; TYRING, S. K.; WARREN, T.; DOUGLAS, J. M. JR.; PAAVONEN, J.; MORROW, A. R.; BEUTNER, K. R.; STRATCHOUNSKY, L. S.; MERTZ, G.; KEENE, O. N.; WATSON, H. A.; TAIT, D.; VARGAS-CORTES, M. 2004. Once-daily valacyclovir to reduce the risk of transmission of genital herpes. *The New England Journal of Medicine* 350(1):11-20.
- CRUMPACKER, C. S. 1996. Ganciclovir. *The New England Journal of Medicine* 335(10):721-9.
- DAVISON, A. J.; EBERLE, R.; EHLERS, B.; HAYWARD, G. S.; MCGEOCH, D. J.; MINSON, A. C.; PELLETT, P. E.; ROIZMAN, B.; STUDDERT, M. J.; THIRY, E. 2009. The order *Herpesvirales*. *Archives of Virology* 154(1):171-177.
- DE CLERCQ, E. 2004. Antiviral drugs in current clinical use. *Journal of Clinical Virology* 30(2):115-133.
- DE CLERCQ, E. 2005a. Recent highlights in the development of new antiviral drugs. *Current Opinion in Microbiology* 8(5):552-60.
- DE CLERCQ, E. 2005B. (E)-5-(2-Bromovinyl)-20-Deoxyuridine (BVDU). *Medicinal Research Reviews* 25(1):1-20.

- DE CLERCQ, E. 2005c. Antiviral drug discovery and development: where chemistry meets with biomedicine. *Antiviral Research* 67(2):56-75.
- DE CLERCQ, E.; FIELD, H. J. 2006. Antiviral prodrugs - the development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy. *British Journal of Pharmacology* 147(1):1-11.
- DUDEK, T.; KNIPE, D. M. 2006. Replication-defective viruses as vaccines and vaccine vectors. *Virology* 344(1):230-9.
- EFSTATHIOU, S.; PRESTON, C. M. 2005. Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency. *Virus Research* 111(2):108-119.
- ENGELBERG, R.; CARRELL, D.; KRANTZ, E.; COREY, L.; WALD, A. 2003. Natural history of genital herpes simplex virus type 1 infection. *Sexually Transmitted Disease* 30(2):174-177.
- ESMANN, J. 2001. The many challenges of facial herpes simplex virus infection. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47(T1):17-27.
- FAKIOGLU, E.; WILSON, S. S.; MESQUITA, P. M. M.; HAZRATI, E.; CHESHENKO, N.; BLAHO, J. A.; HEROLD B. C. 2008. Herpes simplex virus downregulates secretory leukocyte protease inhibitor: a novel immune evasion mechanism. *Journal of Virology* 82(19):9337-9344.
- FATAHZADEH, M.; SCHWARTZ, R. A. 2007. Human herpes simplex virus infections: Epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *Journal of American Academy of Dermatology* 57(5):737-763.
- FAVOREEL, H. W.; VAN DE WALLE, G. R.; NAUWYNCK, H. J.; PENSAERT, M. B. 2003. Virus complement evasion strategies. *Journal of General Virology* 84(Pt1):1-15.
- FIELD, H. J. 2001. Herpes simplex virus antiviral drug resistance - current trends and future prospects. *Journal of Clinical Virology* 21(3):261-269.
- FINBERG, R. W.; WANG, J. P.; KURT-JONES, E. A. 2007. Toll like receptors and viruses. *Reviews in Medical Virology* 17(1): 35-43.
- FORTUNO, Y.; MARCOVAL, J.; KRUGER, M.; GIMENEZ, S.; BORDAS, X.; PEYRI, J. 2002. Unilateral Darier's disease complicated by Kaposi's varicelliform eruption limited to the affected skin. *The British Journal of Dermatology* 146(6): 1106-7.
- FRANK, S. B. 1938. Formulized herpes virus therapy and neutralizing substance in herpes simplex. *The Journal of Investigative Dermatology* 1:267-82.
- FRIEDMAN, H. M. 2003. Immune evasion by herpes simplex virus type 1, strategies for virus survival. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 114:103-12.
- FROBERT, E.; CORTAY J. C., OOKA, T.; NAJIOULLAH F.; THOUVENOT, D.; LINA, B.; MORFIN, F. 2008. Genotypic detection of acyclovir-resistant HSV-1: Characterization of 67 ACV-sensitive and 14 ACV-resistant viruses. *Antiviral Research* 79(1):28-36.

- GARCIA-SASTRE, A.; BIRON, C. A. 2006. Type 1 interferons and the virus host relationship: a lesson in detente. *Science* 312(5775):879-82.
- GREENBERG, M. S. Ulcerative, vesicular, and bullous lesions. In: GREENBERG, M. S.; GLICK, M. (eds.). *Burket's oral medicine: diagnosis and treatment*, 10th. 2003. Ontario (Canada): BC Decker. 50-84 p.
- GUPTA, R.; WARREN, T.; WALD, A. 2007. Genital herpes. *Lancet* 370(9605):2127-37.
- GYOTOKU, T.; ONO, F.; AURELIAN, L. 2002. Development of HSV-specific CD4R Th1 responses and CD8R cytotoxic T lymphocytes with antiviral activity by vaccination with the HSV-2 mutant ICP10DPK. *Vaccine* 20(21-22):2796-807.
- HAGGLUND, R.; ROIZMAN, B. 2004. Role of ICP0 in the strategy of conquest of the host cell by herpes simplex virus 1. *Journal of Virology* 78(5):2169-2178.
- HALPERN-FELSHER, B. L.; CORNELL, J. L.; KROPP, R. Y.; TSCHANN, J. M. 2005. Oral versus vaginal sex among adolescents: perceptions, attitudes, and behavior. *Pediatrics* 115(4): 845-51.
- HANCOCK, M. H.; CORCORAN, J. A.; SMILEY, J. R. 2006. Herpes simplex virus regulatory proteins VP16 and ICP0 counteract an innate intranuclear barrier to viral gene expression. *Virology* 352(1):237-52.
- HANSEN, T. H.; BOUVIER, M. 2009. MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies. *Nature Reviews Immunology* 9(7):503-13.
- HAYDEN, F. G.; DOUGLAS, R. G. Antiviral agents. In: MANDELL, G. I.; DOUGLAS, R. G.; BENNETT, J. E. (eds.). *Principles and practice of infectious diseases*. 1990. New York (NY): Churchill Livingstone. 370-93p.
- HEWITT, E. W. 2003. The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology* 110(2):163-169.
- HILL, A.; JUGOVIC, P.; YORK, I.; RUSS, G.; BENNINK, J.; YEWDELL, J.; PLOEGH, H.; JOHNSON, D. 1995. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature* 375(6530):411-5.
- HOOKE, L. M.; LUBINSKI, J. M.; JIANG, M.; PANGBURN, M. K.; FRIEDMAN, H. M. 2006. Herpes simplex virus type 1 and 2 glycoprotein C prevents complement-mediated neutralization induced by natural immunoglobulin m antibody. *Journal of Virology* 80(8):4038-4046.
- HUBER, M. A. 2003. Herpes simplex type-1 virus infection. *Quintessence International* 34(6):453-67.
- JOHNSON, D. C.; WEBB, M.; WISNER, T. W.; BRUNETTI, C. 2001. Herpes simplex virus gE/gI sorts nascent virions to epithelial cell junctions, promoting virus spread. *Journal of Virology* 75(2):821-33.
- JONES, N. A.; GERAGHTY, R. J. 2004. Fusion activity of lipid-anchored envelope glycoproteins of herpes simplex virus type 1. *Virology* 324(1):213-228.

- JONES, P. S. 1998. Strategies for antiviral drug discovery. *Antiviral Chemistry Chemotherapy* 9(4): 283-302.
- JONES, C. 2003. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. *Clinical Microbiological* 16(1):79-95.
- JUDSON, K. A.; LUBINSKI, J. M.; JIANG, M.; CHANG, Y.; EISENBERG, R. J.; COHEN, G. H.; FRIEDMAN, H. M. 2003. Blocking immune evasion as a novel approach for prevention and treatment of herpes simplex virus infection. *Journal of Virology* 77(23):12639-12645.
- KAYE, S.; CHOUDHARY, A. 2006. Herpes simplex keratitis. *Progress in Retinal and Eye Research* 25(4):355-380.
- KELLY, B. J.; FRAEFEL, C.; CUNNINGHAM, A. L.; DIEFENBACH, R. J. 2009. Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virus Research* 145(2):173-86.
- KHAN, M. S.; SHAW, L.; CLARK, V.; AFZAL, Z. 2005. Eczema herpeticum: a case report. *International Journal of Paediatric Dentistry* 15(2): 136-139.
- KHANNA, K. M.; LEPISTO, A. J.; DECMAN, V.; HENDRICKS, R. L. 2004. Immune control of herpes simplex virus during latency. *Current Opinion in Immunology* 16(4):463-9.
- KIM, I.; CHU, X.-Y.; KIM, S.; PROVODA, C. J.; LEE, K.-D.; AMIDON, G. L. 2003. Identification of a human valacyclovirase. *The Journal of Biology Chemistry* 278(28):25348-56.
- KIMBERLIN, D. 2004. Herpes simplex virus, meningitis and encephalitis in neonates. *Herpes* 11(2):65A-76A.
- KIMBERLIN, D. W. 2007. Herpes simplex virus infections of the newborn. *Seminar in Perinatology* 31(1):19-25.
- KIMBERLIN, D. W.; LIN, C. Y.; JACOBS, R. F.; POWELL, D. A.; FRENKEL, L. M.; GRUBER, W. C.; RATHORE, M.; BRADLEY, J. S.; DIAZ, P. S.; KUMAR, M.; ARVIN, A. M.; GUTIERREZ, K.; SHELTON, M.; WEINER, L. B.; SLEASMAN, J. W.; DE SIERRA, T. M.; SOONG, S. J.; KIELL, J.; LAKEMAN, F. D.; WHITLEY, R. J. 2001. Natural history of neonatal herpes simplex virus infections in the acyclovir era. *Pediatrics* 108(2):223-229.
- KNIPE, D. M.; CLIFFE, A. 2008. Chromatin control of herpes simplexvirus lytic and latent infection. *Nature Reviews Microbiology* 6(3):211-21.
- KOELLE, D. M.; WALD A. 2000. Herpes simplex virus: importance of asymptomatic shedding. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 45(T3):1-8.
- KRONE, M. R.; WALD, A.; TABEL, S. R.; PARADISE, M.; COREY, L.; CELUM, C. L. 2000 Herpes simplex virus type 2 shedding in human immunodeficiency virus-negative men who have sex with men: frequency, patterns, and risk factors. *Clinical Infectious Diseases* 30(2):261-7.

- KUMAR, B.; GUPTA, S.; SAHOO, B. L. 2001. Epidemiology of genital herpes. *Current concepts Indian Journal Sexually transmitted Diseases* 22:2-4.
- LABETOULLE, M.; KUCERA, P.; UGOLINI, G.; LAFAY, F.; FRAU, E.; OFFRET, H.; FLAMAND, A. 2000. Neuronal propagation of HSV1 from the oral mucosa to the eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41(9):2600-6.
- LABETOULLE, M.; MAILLET, S.; EFSTATHIOU, S.; DEZELEE, S.; FRAU, E.; LAFAY, F. 2003. HSV-1 latency sites after inoculation in the lip: assessment of their localization and connections to the eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44(1):217-225.
- LACAILLE, V. G.; ANDROLEWICZ, M. J. 1998. Herpes Simplex Virus Inhibitor ICP47 Destabilizes the Transporter Associated with Antigen Processing (TAP) Heterodimer. *The Journal of Biological Chemistry* 273(28):17386-17390.
- LACHMANN, R. 2003. Herpes simplex virus latency. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 5(29):1-14.
- LANGENBERG, A. G.; BURKE, R. L.; ADAIR, S. F.; SEKULOVICH, R.; TIGGES, M.; DEKKER, C. L.; COREY, L. 1995. A recombinant glycoprotein vaccine for herpes simplex virus type 2: safety and immunogenicity. *Annals of Internal Medicine* 122(12):889-98.
- LANIER, L. L. 2008. Evolutionary struggles between NK cells and viruses. *Nature Reviews Immunology* 8(4):259-68.
- LAUTENSCHLAGER, S.; EICHMANN, A. 2001. The heterogeneous clinical spectrum of genital herpes. *Dermatology* 202(3):211-9.
- LEE, S. H.; JUNG, J. U.; MEANS, R. E. 2003. 'Complementing' viral infection: mechanisms for evading innate immunity. *Trends in Microbiology* 11(10):449-52.
- LIESEGANG, T. J. 2001. Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance. *Cornea*. 20(1):1-13.
- LIPPELT, L.; BRAUN, R. W.; KUHN, J. E. 2002. Genital herpes simplex virus type 1 infection: New fields for an old acquaintance? *Intervirology* 45(1):2-5.
- LIU, X.; BROBERG, E.; WATANABE, D.; DUDEK, T.; DELUCA, N.; KNIPE, D. M. 2009. Genetic engineering of a modified herpes simplex virus 1 vaccine vector. *Vaccine* 27(21):2760-2767.
- LIU, Y. J. 2005. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annual Review of Immunology* 23:275-306.
- LIU, W. J.; LIU, B.; GUO, Q. L.; ZHANG, Y. C.; YUAN, Y. J.; FU, X. D.; DENG, Z. H.; LIN, J. 2004. Influence of ganciclovir and astragalus membranaceus on proliferation of hematopoietic progenitor cells of cord blood after cytomegalovirus infection in vitro. *Chinese Journal of Pediatrics* 42(7):490-4.

- LOWE, D. M.; ALDERTON, W. K.; ELLIS, M. R.; PARMAR, V.; MILLER, W. H.; ROBERTS, G. B.; FYFE, J. A.; GAILLARD, R.; ERTL, P.; SNOWDEN, W.; LITTLER, E. 1995. Mode of action of (R)-9-[4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)butyl] guanine against herpesviruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(8):1802-8.
- LUBINSKI, J. M.; WANG, L.; SOULIKA, A. M.; BURGER, R.; WETSEL, R. A.; COLTEN, H.; COHEN, G. H.; EISENBERG, R. J.; LAMBRIS, J. D.; FRIEDMAN H. M. 1998. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein gC mediates immune evasion in vivo. *Journal of Virology* 72(10):8257-63.
- LYON, A. W.; MANSOOR, A.; TROTTER, M. J. 2002. Urinary gems: acyclovir crystalluria. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 126(6):753-4.
- MADHAVAN, H. N.; PRIYA, K.; ANAND, A. R.; LILY, K. 1999. The detection of herpes simplex virus (HSV) genome using polymerase chain reaction (PCR) in clinical samples. Comparison of PCR with standard laboratory methods for the detection of HSV. *Journal of Clinical Virology* 14(2):145-51.
- MARDBERG, K.; TRYBALA, E.; TUFARO, F.; BERGSTROM, T. 2002. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein C is necessary for efficient infection of chondroitin sulfate expressing gro2C cells. *The Journal of General Virology* 83(Pt2): 291-300.
- MARQUES, A. R.; STRAUS, S. E. 2000. Herpes simplex type 2 infections - An update. *Disease in a mouth* 46(5):325-59.
- MARSHALL, D. S.; LINFERT, D. R.; DRAGHI, A.; MCCARTER, Y. S., TSONGALIS, G. J. 2001. Identification of herpes simplex virus genital infection: comparison of a multiplex PCR assay and traditional viral isolation techniques. *Modern Pathology* 14(3):152-156.
- MELL, H. K. 2008. Management of oral and genital herpes in the emergency department. *Emergency Medicine Clinics of North American* 26(2):457-73.
- METTENLEITER, T. C. 2004. Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Research* 106(2):167-180.
- METTENLEITER, T. C.; KLUPP, B. G.; GRANZOW, H. 2006. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Current Opinion in Microbiology* 9(4):423-429.
- MITCHELL, B. M.; STEVENS, J. G. 1996. Neuroinvasive properties of herpes simplex virus type 1 glycoprotein variants are controlled by the immune response. *Journal of Immunology* 156(1):246-55.
- MIYAMOTO, K.; MORGAN, C. 1971. Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. XI. Entry and uncoating of herpes simplex virus. *Journal of Virology* 8(6):910-8.
- MOCIKAT, R.; BRAUMULLER, H.; GUMY, A.; EGETER, O.; ZIEGLER, H.; REUSCH, U.; BUBECK, A.; LOUIS, J.; MAILHAMMER, R.; RIETHMULLER, G.; KOSZINOWSKI, U.; ROCKEN, M. 2003. Natural killer cells activated by MHC class I (low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity* 19(4):561-9.

- MOINGEON, P.; ALMOND, J.; DE WILDE, M. 2003. Therapeutic vaccines against infectious diseases. *Current Opinion in Microbiology* 6(5):462-471.
- MORFIN, F.; THOUVENOT, D. 2003. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. *Journal of Clinical Virology* 26(1):29-37.
- MORRISON L.A. 2004. The Toll of herpes simplex virus infection *Trends in Microbiology* 12(8)353-356.
- MUNOZ, F. M. 2000. Antiviral agents in the critically ill child. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* 11(1):35-42.
- MURPHY, M.; MORLEY, A.; EGLIN, R. P.; MONTEIRO, E. 1992. Topical trifluridine for mucocutaneous acyclovir-resistant herpes simplex II in an AIDS patient. *Lancet* 340(8826):1040.
- NADELMAN, C. M.; NEWCOMER, V. D. 2000. Herpes simplex virus infections. *Postgraduate Medicine* 107(3):189-95, 199-200.
- NAESENS, L.; DE CLERCQ, E. 2001. Recent Developments in Herpesvirus Therapy. *Herpes* 8(1):12-26.
- NEUMANN, K. J.; EIS-HÜBINGER, A. M.; NORBERT, J. 2003. Herpes simplex virus type 1 targets the MHC class II processing pathway for immune evasion. *Journal of Immunology* 171(6) 3075-3083.
- NEWCOMB, W. W.; HOMA, F. L.; THOMSEN, D. R.; BOOY, F. P.; TRUS, B. L.; STEVEN, A. C.; SPENCER, J. V.; BROWN, J. C. 1996. Assembly of the herpes simplex virus capsid: characterization of intermediates observed during cell-free capsid formation. *Journal of Molecular Biology* 263(3):432-46.
- OH, M. J.; AKHTAR, J.; DESAI, P.; SHUKLA, D. 2010. A role for heparan sulfate in viral surfing. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 391(1):176-181.
- OLESKY, M.; MCNAMEE, E. E.; ZHOU, C.; TAYLOR, T. J.; KNIPE, D. M. 2005. Evidence for a direct interaction between HSV-1 ICP27 and ICP8 proteins. *Virology* 331(1):94-105.
- ORANGE, J. S.; FASSETT, M. S.; KOOPMAN, L. A.; BOYSON, J. E.; STROMINGER, J. L. 2002. Viral evasion of natural killer cells. *Nature Immunology* 3(11): 1006-12.
- O TOOLE, J. M.; AUBERT, M.; KOTSAKIS, A.; BLAHO, J. A. 2003. Mutation of the protein tyrosine kinase consensus site in the herpes simplex virus 1 22 gene alters ICP22 posttranslational modification. *Virology* 305(1):153-167.
- PATEL, R. 2002. Progress in meeting today's demands in genital herpes: an overview of current management. *The Journal of Infectious Diseases* 186(1):S47-56.
- PAULUS, C.; NITZSCHE, A.; NEVELS, M. 2010; Chromatinisation of herpesvirus genomes. *Reviews in Medical Virology* 20(1):34-50.

- PELLETT, P.E.; ROIZMAN, B. The Family Herpesviridae: A Brief Introduction. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M (eds.). *Fields Virology*, 5th. 2007. Vol II. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. 2479-2499p.
- PEÑA, K. C.; ADELSON, M. E.; MORDECHAIB, E.; BLAHOA, J. A. 2009. Rapid isolation of HSV-1 and HSV-2 from OneSwab® cervicovaginal specimens. *Journal of Virological Methods* 159(2):146-151.
- PENG, T.; ZHU, J.; KLOCK, A.; PHASOUK, K.; HUANG, M. L. KOELLE, D. M.; WALD, A.; COREY, L. 2009. Evasion of the mucosal innate immune system by herpes simplex virus type 2. *Journal of Virology* 83(23):12559-12568.
- PEPOSE, J. S.; KEADLE, T. L.; MORRISON, L. A. 2006. Ocular herpes simplex: changing epidemiology, emerging disease patterns, and the potential of vaccine prevention and therapy. *American Journal of Ophthalmology* 141(3): 547-57.
- PERNG, G. C. 2000. The latency-associated transcript gene enhances establishment of herpes simplex virus type 1 latency in rabbits. *Journal of Virology* 74(4):1885-1891.
- PERRY, C. M.; FAULDS, D. 1996. Valaciclovir. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in herpesvirus infections. *Drugs* 52(5):754-72.
- PERRY, C. M.; WAGSTAFF, A. J. 1995. Famciclovir. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in herpesvirus infections. *Drugs* 50(2):396-415.
- PERTEL, P. E.; FRIDBERG, A.; PARISH, M. L.; SPEAR, P. G. 2001. Cell fusion induced by herpes simplex virus glycoproteins gB, gD, and gH-gL requires a gD receptor but not necessarily heparan sulfate. *Virology* 279(1):313-324.
- PERTEL, P. E.; SPEAR, P. G. 1998. *Biology of Herpesviruses. Sexually Transmitted Diseases*, 3th ed. McGraw-Hill, New York.
- POLLARA, G.; KATZ, D. R.; CHAIN, B. M. 2004. The host response to herpes simplex virus infection. *Current Opinion in Infectious Diseases* 17(3):199-203.
- PRESTON, C. M. 2000. Repression of viral transcription during herpes simplex virus latency. *Journal of General Virology* 81(Pt):1-19.
- PROENÇA, J. T.; COLEMAN, H. M.; CONNOR, V.; WINTON, D. J.; EFSTATHIOU, S. 2008. A historical analysis of herpes simplex virus promoter activation in vivo reveals distinct populations of latently infected neurones *Journal of General Virology* 89(Pt12):2965-2974.
- READ, G. S.; KARR, B. M.; KNIGHT, K. 1993. Isolation of a herpes simplex virus type 1 mutant with a deletion in the virion host shutoff gene and identification of multiple forms of the vhs (UL41) polypeptide. *Journal of Virology* 67(12):7149-60.
- REZUCHOVA, I.; KUDELOVA, M.; DURMANOVA, V.; VOJVODOVA, A.; KOSOVSKY, J.; RAJCANI, J. 2003. Transcription at early stages of herpes simplex virus 1 infection and during reactivation. *Intervirology* 46(1):25-34.

- ROIZMAN, B.; KNIPE, D. M. Herpes simplex viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. (eds.). *Fields Virology*, 4 th. 2001. Lippincott Williams, & Wilkins. Philadelphia. 2399-2459p.
- ROIZMAN, B.; KNIPE, D. M.; WHITLEY, R.J. Herpes Simplex Viruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (eds.). *Fields Virology*, 5th. 2007. Vol II. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. 2502-2601p.
- ROIZMAN, B.; PELLET, P. E. The family *Herpesviridae*: a brief introduction. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. (eds.). *Fields virology*, 4th 2001. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2381-2397p.
- ROIZMAN, B.; SEARS, A. E. Herpes simplex viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (eds.). *Fields Virology*, 3th. 1996. Vol II. Lippincott-Raven Philadelphia. 2231-2295p.
- ROIZMAN, B.; WHITLEY, R. J. 2001. The Nine Ages of Herpes Simplex Virus. *Herpes* 8(1):23-27.
- ROTTINGHAUS, S. T.; WHITLEY, R. J. 2007. Current non-AIDS antiviral chemotherapy. *Expert Review Anti Infective Therapy* 5(2):217-30.
- ROUSE, B. T.; NAIR, S.; ROUSE, R. J.; YU, Z.; KUKLIN, N.; KAREM, K.; MANICKAN, E. 1998. DNA vaccines and immunity to herpes simplex virus. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 226:69-78.
- RUBRIGHT, J. H.; SHAFRITZ, A. B. 2011. The herpetic whitlow. *The Journal of Hand Surgery* 36(2):340-2.
- SACKS, S. L.; GRIFFITHS, P. D.; COREY, L.; COHEN, C.; CUNNINGHAM, A.; DUSHEIKO, G. M.; SELF, S.; SPRUANCE, S.; STANBERRY, L. R.; WALD, A.; WHITLEY, R. J. 2004a. HSV-2 transmission. *Antiviral Research* 63(1):S27-S35.
- SACKS, S. L.; GRIFFITHS, P. D.; COREY, L.; COHEN, C.; CUNNINGHAM, A.; DUSHEIKO, G. M.; SELF, S.; SPRUANCE, S.; STANBERRY, L. R.; WALD, A.; WHITLEY, R. J. 2004b. Introduction: Is viral shedding a surrogate marker for transmission of genital herpes? *Antiviral Research* 63(1):S3-S10.
- SACKS, S. L.; SMITH, J. L.; POLLARD, R. B. 1979. Toxicity of vidarabine. *The Journal of the American Medical Association* 241(1):28-9.
- SAIJO, M.; SUZUTANI, T.; DE CLERCQ, E.; NIIKURA, M.; MAEDA, A.; MORIKAWA, S.; KURANE, I. 2002. Genotypic and phenotypic characterization of the thymidine kinase of ACV-resistant HSV-1 derived from an acyclovir-sensitive herpes simplex virus type 1 strain. *Antiviral Research* 56(3):253-262.

SAMADY, L.; COSTIGLIOLA, E.; MACCORMAC, L.; MCGRATH, Y.; CLEVERLEY, S.; LILLEY, C.; SMITH, J.; LATCHMAN, D.; CHAIN, B.; COFFIN, R. S. 2003. Deletion of the virion host shutoff protein (VHS) from herpes simplex virus relieves the viral block to dendritic cell activation: potential of VHS-HSV vectors for dendritic-cell-mediated immunotherapy. *The Journal of Virology* 77(6):3768-76.

SATO, A.; LINEHAN, M. M.; IWASAKI, A. 2006. Dual recognition of herpes simplex viruses by TLR2 and TLR9 in dendritic cells. *The National Academy of Science of the USA* 103(46):17343-8.

SAUERBREI, A.; DEINHARDT, S.; ZELL, R.; WUTZLER, P. 2010. Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant clinical isolates of herpes simplex virus. *Antiviral Research* 86(3):246-52.

SAUERBREI, A.; EICHHORN, U.; HOTTENROTT, G.; WUTZLER, P. 2000. Virological diagnosis of herpes simplex encephalitis. *Journal of Clinical Virology* 17(1):31—36.

SAUERBREI, A., WUTZLER, P. 2004. Serological detection of type-specific IgG to herpes simplex virus by novel ELISAs based on recombinant and highly purified glycoprotein. *Clinical Laboratory* 50(7-8):425-429.

SAWTELL, N. M. 1997. Comprehensive quantification of herpes simplex virus latency at the single-cell level. *Journal of Virology* 71(7):5423-31.

SCIUBBA, J. J. 2003. Herpes simplex and aphthous ulcerations: presentation, diagnosis and management an update. *General Dentistry* 51(6):510-6.

SCOULAR, A. 2002. Using the evidence base on genital herpes: optimising the use of diagnostic tests and information provision. *Sexually Transmitted Infections* 78(3):160-5.

SHUKLA, D.; SCANLAN, P. M.; TIWARI, V.; SHETH, V.; CLEMENT, C.; GUZMAN-HARTMAN, G.; DERMODY TS, VALYI-NAGY T. 2006. Expression of nectin-1 in normal and herpes simplex virus type 1 infected murine brain. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 14(3):341-7.

SHUKLA, D.; SPEAR, P. G. 2001. Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. *The Journal of Clinical Investigation* 108(4):503-10.

SIEGEL, M. A. 2002. Diagnosis and management of recurrent herpes simplex infections *Journal of the American Dental Association* 133(9): 1245-9.

SIEVERS, E.; NEUMANN, J. R.; RAFTERY, M.; NRICH, G. N. S.; BINGER, A. M. E. H.; KOCH, N. 2002. Glycoprotein B from strain 17 of herpes simplex virus type I contains an invariant chain homologous sequence that binds to MHC class II molecules. *Immunology* 107(1):129-135.

SMITH, K. O. 1963. Some biologic aspects of herpesvirus-cell interactions in the presence of 5-iodo,2-deoxyuridine (IDU). *Journal of Immunology* 91:582-90.

SIMMONS A. 2002. Clinical manifestations and treatment considerations of herpes simplex virus infection. *The Journal of Infectious Diseases* 186(1):S71-7.

- SNOECK, R. 2000 Antiviral therapy of herpes simplex. *International Journal of Antimicrobial Agents* 16(2):157-159.
- SODEIK, B.; EBERSOLD, M. W.; HELENIUS, A. 1997. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *The Journal of Cell Biology* 136(5):1007-21.
- SOUZA, T. M. L.; DE SOUZA, M. C. B. V.; FERREIRA, V. F.; CANUTO, C. V. B. S.; MARQUES, I. P.; FONTES, C. F. L.; FRUGULHETTI, I.C.P.P. 2008. Inhibition of HSV-1 replication and HSV DNA polymerase by the chloroquinolinic ribonucleoside 6-chloro-1,4-dihydro-4-oxo-1-(P-d-ribofuranosyl) quinoline-3-carboxylic acid and its aglycone. *Antiviral Research* 77(1):20-27.
- SPEAR, P. G.; EISENBERG, R. J.; COHEN, G. H. 2000. Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology* 275(1):1-8.
- SPEAR, P. G.; LONGNECKER, R. 2003. Herpesvirus Entry: an Update. *Journal of Virology* 77(19):10179-10185.
- SPEAR, P. G.; MANOJ, S.; YOON, M.; JOGGER, C. R.; ZAGO, A.; MYSCOFSKI, D. 2006. Different receptors binding to distinct interfaces on herpes simplex virus gD can trigger events leading to cell fusion and viral entry. *Virology* 344(1):17-24.
- SPRUANCE, S. L.; REA, T. L.; THOMING, C.; TUCKER, R.; SALTZMAN, R.; BOON R. 1997. Penciclovir cream for the treatment of herpes simplex labialis. A randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. Topical Penciclovir Collaborative Study Group. *The Journal of the American Medical Association* 277(17):1374-9.
- STANBERRY, L. R. 1998. Herpes. Vaccines for HSV. *Dermatologic Clinics* 16(4):811-6.
- STANBERRY, L.; CUNNINGHAM, A.; MERTZ, G.; MINDEL, A.; PETERS, B.; REITANO, M.; SACKS, S.; WALD A.; WASSILEW S.; WOOLLEY, P. 1999. New developments in the epidemiology, natural history and management of genital herpes. *Antiviral Research* 42(1):1-14.
- STANBERRY, L. R.; SPRUANCE S. L.; CUNNINGHAM, A. L.; BERNSTEIN, D. I.; MINDEL A.; SACKS, S. 2002. Glycoprotein-D-adjuvant vaccine to prevent genital herpes. *The New England Journal of Medicine* 347(21):1652-61.
- STEIN, G. E. 1997. Pharmacology of new antiherpes agents: Famciclovir and valacyclovir. *Journal of the American Pharmaceutical Association* NS37(2):157-63.
- STEINER, I.; KENNEDY, P. G. E.; PACHNER, A. R. 2007. The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster. *Lancet Neurology* 6(11):1015-28.
- STOOPLER, E. T. 2005. Oral herpetic infections (HSV 1-8). *Dental Clinics of North America* 49(1):15-29.
- STRANG, B. L.; STOW, N. D. 2005. Circularization of the Herpes Simplex Virus Type 1 Genome upon Lytic Infection. *Journal of Virology* 79(19):12487-12494.

- SU, C.; HSU, J. T.; HSIEH, H.; LIN, P.; CHENA, T.; KAO, C.; LEE, C.; CHANG, S. 2008. Anti-HSV activity of digitoxin and its possible mechanisms. *Antiviral Research* 79(1):62-70.
- SZINNAI, G.; SCHAAD, U. B.; HEININGER, U. 2001. Multiple herpetic whitlow in lesion in a 4-years-old girl: case report and review in literature. *European Journal of Pediatrics* 160(9):528-533.
- TABBARA, K. F; AL BALUSHI, N. 2010. Topical ganciclovir in the treatment of acute herpetic keratitis. *Clinical Ophthalmology* 4:905-12.
- TAKEDA, K.; AKIRA, S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology* 17(1):1-14.
- TAYLOR, J. M.; LIN, E.; SUSMARSKI, N.; YOON, M.; ZAGO, A.; WARE, C. F.; PFEFFER, K.; MIYOSHI, J.; TAKAI, Y.; SPEAR, P. G. 2007. Alternative entry receptors for herpes simplex virus and their roles in disease. *Cell Host & Microbe* 2(1):19-28.
- TAYLOR, T. J.; BROCKMAN, M. A.; MCNAMEE, E. E.; KNIPE, D. M. 2002. Herpes simplex virus. *Frontiers in Bioscience* 7:d752-64.
- THOMPSON, R. L.; SAWTELL, N. M. 2000. Replication of herpes simplex virus type 1 within trigeminal ganglia is required for high frequency but not high viral genome copy number latency. *Journal of Virology* 74(2):965-974.
- TIWARI, V.; CLEMENT, C.; SCANLAN, P. M.; KOWLESSUR, D.; YUE, B. Y.; SHUKLA, D. 2005. A role for herpesvirus entry mediator as the receptor for herpes simplex virus 1 entry into primary human trabecular meshwork cells. *Journal of Virology* 79(20):13173-9.
- TIWARI, V.; O'DONNELL, C. D.; OH, M. J.; VALYI-NAGY, T.; SHUKLA, D. 2005. A role for 3-O-sulfotransferase isoform-4 in assisting HSV-1 entry and spread. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338(2):930-937.
- TIWARI, V.; OH, M. J.; KOVACS, M.; SHUKLA, S. Y.; VALYI-NAGY, T.; SHUKLA, D. 2008. Role for nectin-1 in herpes simplex virus 1 entry and spread in human retinal pigment epithelial cells. *The FEBS Journal* 275(21):5272-85.
- TIWARI, V.; TEN DAM, G. B.; YUE, B. Y.; VAN KUPPEVELT, T. H.; SHUKLA, D. 2007. Role of 3-O-sulfated heparan sulfate in virus-induced polykaryocyte formation. *FEBS Letters* 18(23):4468-4472.
- USTAÇELEBI, S. 2001; Diagnosis of herpes simplex virus infections. *Journal of Clinical Virology* 21(3):255-259.
- XU, F.; STERNBERG, M. R.; KOTTIRI, B. J.; MCQUILLAN, G. M.; LEE, F. K.; NAHMIA, A. J.; BERMAN, S. M.; MARKOWITZ, L. E. 2006. Trends in herpes simplex virus type 1 and type 2 seroprevalence in the United States. *The Journal of the American Medical Association* 296(8):964-73.
- ZHENG, Z. M.; MAYO, D. R.; HSIUNG, G. D. 1983. Comparison of biological, biochemical, immunological, and immunochemical techniques for typing herpes simplexvirus isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 17(3):396-9.

- WALD, A.; ERICSSON, E.; KRANTZ, E.; SELKE, S.; COREY, L. 2004. Oral shedding of herpes simplex virus type 2. *Sexually Transmitted Infections* 80(4):272-6.
- WALD, A.; LANGENBERG, A. G. M.; LINK, K.; IZU, A. E.; ASHLEY, R.; WARREN, T.; TYRING, S.; DOUGLAS, J. M. JR; COREY, L. 2001. Effect of condoms on reducing the transmission of herpes simplex virus type 2 from men to women. *The Journal of The American Medical Association* 285(24):3100-6.
- WALD, A.; LINK, K. 2002. Risk of human immunodeficiency virus infection in herpes simplex virus type 2-seropositive persons: a meta-analysis *The Journal of Infectious Diseases* 185(1):45-52.
- WALD, A.; ZEH, J.; SELKE, S.; WARREN, T.; ASHLEY, R.; COREY, L. 2002. Genital shedding of herpes simplex virus among men. *The Journal of Infectious Diseases* 186(1):S34-9.
- WATANABE, D. 2010. Medical application of herpes simplex virus. *Journal of Dermatological Science* 57(2):75-82.
- WHILEY, D. M.; MACKAY, I. M.; SLOOTS, T. P. 2001. Detection and Differentiation of Human Polyomaviruses JC and BK by LightCycler PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 39(12):4357-61.
- WHILEY, D. M.; MACKAY, I. M.; SYRMIS, M. W.; WITT, M. J.; SLOOTS, T. P. 2004. Detection and differentiation of herpes simplex virus types 1 and 2 by a duplex LightCycler PCR that incorporates an internal control PCR reaction. *Journal of Clinical Virology* 30(1):32-38.
- WHITLEY, R. J. Herpes Simplex Virus. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, R. A.; LAMB, M. A.; MARTIN, B.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. S. (eds.). *Fields Virology*, 4th. 2002. Lippincott-Williams & Wilkins. Philadelphia. 2461-2498p.
- WHITLEY, R. J. 2006. Herpes simplex encephalitis: adolescents and adults. *Antiviral Research* 71(2-3):141-48.
- WHITLEY, R. J.; ROIZMAN, B. 2001. Herpes simplex virus infections. *Lancet* 357(9267):1513-1518.
- WHITLEY, R. J.; ROIZMAN, B. 2002. Herpes simplex viruses: is a vaccine tenable? *Journal of Clinical Investigation* 110(2):145-151.
- WIERTZ, E. J.; DEVLIN, R.; COLLINS, H. L.; RESSING, M. E. 2007. Herpesvirus interference with major histocompatibility complex class II-restricted T-cell activation. *Journal of Virology* 81(9):4389-4396.
- WIGG, M. D.; MIRANDA, M. M. F. S. *Viroses dermatóricas*. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. *Introdução à Virologia Humana*. 2008. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 177-211p.
- WILHELMUS, K. R. 2000. The treatment of herpes simplex virus epithelial keratitis. *Transactions of the American Ophthalmology Society* 98:505-32.

- WILSON, S. S. 2009. Novel approaches in fighting herpes simplex virus infections. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 7(5): 559-568.
- WOLLENBERG, A.; ZOCH, C.; WETZEL, S.; PLEWIG, G.; PRZYBILLA, B. 2003. Predisposing factors and clinical features of eczema herpeticum: a retrospective analysis of 100 cases. *Journal of the American Academy of Dermatology* 49(2):198-205.
- WOLLENBERG, A.; WETZEL, S.; BURGDORF, W. H. C.; HAAS, J. 2003. Viral infections in atopic dermatitis: pathogenic aspects and clinical management. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 112(4):667-74.
- WOO, S. B.; CHALLACOMBE, S. J. 2007. Management of recurrent oral herpes simplex infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, Endodontics* 103(12):1-18.
- WU, I. B.; SCHWARTZ, R. A. 2007. Herpetic whitlow. *Cutaneous medicine for the practitioner* 79(3):193-6.
- WU, J. J.; BRENTJENS, M. H.; TORRES, G.; YEUNG-YUE, K.; LEE, P.; TYRING, S. K. 2003. Valacyclovir in the treatment of herpes simplex, herpes zoster, and other viral infections. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery* 7(5):372-381.
- WU, J. J.; HUANG, D. B.; PANG, K. R.; TYRING, S. K. 2004. Vaccines and immunotherapies for the prevention of infectious diseases having cutaneous manifestations. *Journal American Academy of Dermatology* 50(4):495-528.
- WU, J. J.; PANG, K. R.; HUANG, D. B., TYRING, S. K. 2005. Advances in antiviral therapy. *Dermatologic Clinics* 23(2):313-322.
- WYSOCKA, J.; HERR, W. 2003. The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch. *Trends in Biochemical Sciences* 28(6):294-304.
- YEUNG-YUE, K. A.; BRENTJENS, M. H.; LEE, P. C.; TYRING, S. K. 2002. Herpes simplex viruses 1 and 2. *Dermatologic Clinics* 20(2):249-266.
- YOUNG, B., 2005. Review: mixing new cocktails: drug interactions in antiretroviral regimens. *AIDS Patient Care STDS* 19(5):286-97.

## 4 ARTIGO

### HERPES SIMPLEX VIRUS:

#### ISOLATION, CYTOPATHOLOGICAL CHARACTERIZATION AND ANTIVIRAL SENSITIVITY

Hattori, L.Y.; Galhardi, L.C.F.; Lopes, N.; Bomfim, W. A.; de Cândido, L. K.; de Azevedo<sup>1</sup>, E. M. M.; Gon<sup>2</sup>, A. S.; Linhares, R.E.C.; Nozawa, C\*.

Departamento de Microbiologia/CCB, <sup>1</sup>Departamento de Ginecologia e Obstetrícia and <sup>2</sup>Departamento de Clínica Médica/CCS. Universidade Estadual de Londrina. Londrina, Paraná, Brazil.

**ABSTRACT:** This work presents the results of the isolation of herpes simplex virus (HSV) from clinical specimens whose patients were suffering mostly with oral lesions and secondly with genital lesions. The isolation and HSV adaptation was carried out in HEp-2 cell culture through successive passages. Cultures infected with isolates were studied under cytopathological ground and plaque forming features. We also evaluated the sensitivity of the isolates to commercially available anti-HSV drugs, such as, acyclovir (ACV), foscarnet (PFA), arabinofuranosylcytosine (Ara-C) and trifluridine (F3T) based in the assay of antiviral activity, monitored by plaque assay and tissue culture infectious dose. From 22 clinical specimens we could isolate and adapt twenty strains. Overall, the cytopathic effect (CPE) was mostly detected 24 h post-infection (p.i.), represented by focally rounding and increased refringence of the infected cells and later with the spread of the effect. Total destruction of the cell monolayer was observed at 96 h p.i. The presence of syncytia was remarkable 48 h p.i. observed after cell staining. Out of 20 isolates six developed plaques. The plaques of the isolates S1-S4 were predominantly large with diameter of 1.0 mm and isolate S5 and S6 produced mostly small plaques of 0.4 mm size. Eleven isolates S1-S11 were sensitive to ACV, PFA, Ara-C and F3T antiviral tested. The percentage of virus inhibition (%VI) ranged from 61-100%. Therefore, in this work we tried an approach to the concept of antivirogram, as a useful tool for the treatment and the control of HSV infections.

**Key words:** HSV. Cytopathology. Sensitivity to antivirals.

#### 4.1 INTRODUCTION

Herpes simplex virus (HSV) or human herpesvirus (HHV) is a member of *Herpesvirales* order, family *Herpesviridae*, subfamily *Alphaherpervirinae*, genus *Simplexvirus*. HSV most commonly causes mucocutaneous infections resulting in recurrent lesions (Roizman et al., 2007).

---

\* Corresponding author. Phone: +55 43 3371 4617 E-mail address: cnoz@uel.br

HSV-1 is associated primarily with orofacial infections, whereas HSV-2 is generally associated with anogenital infections transmitted through sexual activity (Yeung-Yue et al., 2002). HSV infection is endemic in all human populations with an estimated 60-95% of the adult population being infected by at least one of the species (Brady & Bernstein, 2004).

HSV is an enveloped virus with a genome consisting of a large linear molecule of double-stranded DNA with 152 kb. HSV genes are classified into three groups: immediate early (IE), early (E), and late (L) genes that encode regulatory proteins of replication, replication proteins and structural proteins (Kuo et al., 2008).

During latency, there is no expression of viral genes, such as, during the lytic phase, but only some transcripts known as LAT (Latency-Associated Transcripts) are detected and can be found at high levels (Steiner et al., 2007).

In this work we isolated, adapted and studied the cytopathological features of strains of HSV from clinical specimens collected from in- or outpatients with either, oral or genital lesions, clinically compatible with herpes simplex infection. Moreover, we analyzed the sensitivity of these isolates against anti-herpesvirus drugs commercially available, acyclovir (ACV), phosphonophormic acid (PFA), arabinofuranosylcytosine (Ara-C) and trifluridine (F3T).

## 4.2 MATERIAL AND METHODS

### 4.2.1 Cells and Virus

HEp-2 cell cultures (human larynx epithelial cells carcinoma - ATCC, CCL-23) were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (\*Gibco-BRL, EUA), supplemented with 10% fetal bovine serum (\*), 100 ug/ml streptomycin (\*\*Sigma Chem. Co., EUA), 100 IU/ml penicillin (\*\*\*) and 2.5 ug/ml amphotericin B (Bristol Myers-Squibb, Brasil). Cell monolayers were used for experiments after a growth period of approximately 48-72 h. Trypsin/versene were used as cell dispersing agent.

Standard HSV-1 supplied by the Departamento de Virologia/IMPPG/UFRJ, Rio de Janeiro-RJ was used as internal control.

#### 4.2.2 Anti-herpes Virus Drugs

The following anti-herpes drugs were used: Acyclovir - ACV (Zynvir®, New Farma, Brazil), Phosphonophormic acid - PFA (Foscarnet®, Hospira, USA), Trifluridine - F3T (Viroptic®, Monarch Pharmaceuticals, USA) and Arabinosylcytosine - Ara-C (Aracytin®, Pharmacia Brazil Ltda, Brazil) were kindly donated by Trade Farma, Brazil).

#### 4.2.3 Clinical Specimens

Clinical specimens, collected from June 2009 to June 2010, were mostly obtained from in- and outpatients of the Hospital Universitario Regional do Norte do Parana - Londrina (HUNRPr/UEL) and a few from the university staff. The project was approved by the UEL Ethic Committee under the registration n° 225/09 PF. The patients were 12-53 years of age, either male or female.

Twenty-two clinical specimens were collected with a swab from skin/mucosa blisters or sores, obtained directly from vesicles or skin/mucosa scrapings from the lips (13), oral cavity wound (1), genitalia (2), perianus (2), conjunctiva (1), leg (1), buttocks (1) and back (1). After collection, the material was immediately placed in DMEM containing penicillin (1000 IU/ml), streptomycin (1000 ug/ml) and amphotericin B (25 ug/ml), and kept at 4-8°C until the laboratory manipulation. The specimens were clarified by centrifugation at 1000 xg for 10 min for the removal of cell debris.

#### 4.2.4 Cell Culture Inoculation

Clarified specimens were inoculated in HEp-2 cell cultures established in 15x100 mm tubes, according to conventional technique (Ramos et al., 2000). Briefly, 48 h cell cultures were inoculated with 100 ul of the clarified specimen suspension. The cultures were monitored for approximately five days for the observation of virus cytopathic effect (CPE). Up to three blind passages were performed for negative cultures by submitting inoculated cultures to three cycles of freezing and thawing and the homogenates re-inoculated. Negative specimens after three blind passages were discarded. Adapted strains, after serial passages in cell cultures, were stored at -22°C with 10% glycerin aliquot.

#### 4.2.5 Hematoxylin-eosin (HE) Staining

Cell cultures infected with the isolates were subjected to HE staining for better analysis of the CPE. Fifty to sixty percent confluent HEp-2 cells grown in coverslips were infected with 200  $\mu$ l of the isolates dilutions to the tenth ( $10^{-1}$  -  $10^{-3}$ ). The cultures were monitored for 24-72 h for observation of the development of CPE. Cultures on coverslips were washed, fixed in phosphate-buffered saline (PBS)/methanol (7:1), (1:1) up to methanol only and stained with HE solution. Coverslips containing stained cultures were mounted on slides with mounting medium and observed in microscope.

#### 4.2.6 Cytotoxic Assay of the Antivirals

The cytotoxicity of commercially available antivirals was determined by MTT kit (dimethylthiazolyl diphenyltetrazolium bromide) (Sigma Chem. Co., USA) in HEp-2 cell according to the manufacturer's instructions. HEp-2 cells grown in 96-well microplates (Nunc A/S, Denmark), at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in a confluence of 70%, were submitted to the treatment with varying concentrations of antivirals. The following concentrations were used: ACV (0.15, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 mg/ml), PFA (0.31, 0.62, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 mg/ml), Ara-C (0.03, 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 mg/ml) and F3T (0.07, 0.15, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5 mg/ml). The percentage of cell viability was calculated by the formula,  $100 - (At/Ac) \times 100$ , where *At* and *Ac* refer to the absorbances with the drug and control (untreated cells), respectively. The 50% cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>) was determined as the concentration of the drugs capable of reducing the absorbance by 50% in comparison to the control by regression analysis.

#### 4.2.7 Plaque Reduction Assay

HEp-2 cells grown in 24-well plates (TPP, Switzerland) with 95-100% confluence were infected with the isolates and incubated at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> for 1 h. The cell monolayer was washed and overlaid with nutrient agarose (DMEM [2x] and 1.8% agarose [v/v]), added of varying concentrations of the antivirals. For ACV, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/ml, for PFA, 0.18, 0.37, 0.75, 1.5 mg/ml, for Ara-C, 0.37, 0.75, 1.5, 3.0 mg/ml and for F3T, 0.5, 0.25, 0.12 mg/ml. After 48-72 h incubation, the cells were fixed with 10% formaldehyde in PBS, pH 7.3, for 24 h and stained with 0.5% crystal violet in 20% ethanol.

Plaques were counted and the percentage of viral inhibition (%VI) was calculated by the formula,  $1-(Vd/Vc)] \times 100$ , where Vd and Vc refer to the number of plaques in the presence and absence of the antivirals, respectively (Nishimura et al., 1977).

#### 4.2.8 Infectious Dose Reduction Assay by TCID50

HEp-2 cells grown in 96-well microplates (TPP, Switzerland) with 95-100% confluence were infected with the isolates and incubated at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> for 1 h. Cells were washed and overlaid with medium containing varying concentrations of the antivirals. For ACV (0.5, 1.5, 3.0, 5.0, 10 mg/ml), for PFA (0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 3.0, 6.0 mg/ml), for Ara-C (1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 mg/ml), for F3T (0.16, 0.15, 0.14, 0.13, 0.12, 0.11 mg/ml) and incubated for 5 days. Appropriate controls were prepared. The viral titer was determined according to Reed and Muench (1938) or by Spearman-Kärber method (Rovozzo; Burke, 1973) and the % VI was calculated according to Nishimura et al. (1977).

### 4.3 RESULTS

We studied 22 clinical specimens distributed according to the ages of the patients, as shown in table 1. All specimens were subjected to HEp-2 cell culture growth and adaptation, and typical CPE was evidenced in 20 specimens out of 22.

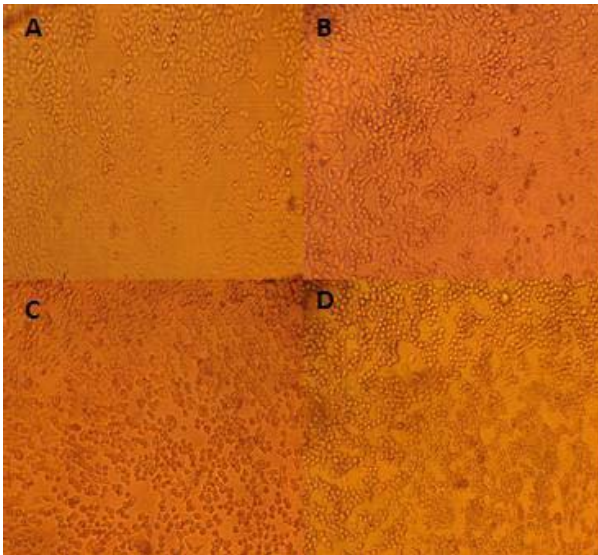
**Table 1** – Distribution of clinical samples by age and rate of cell culture adaptation.

Age group (yr.)	Specimens n°	Isolates
10-25	12 (54.6%)	10 (83.3%)
26-40	03 (13.6%)	03 (100%)
41-70	07 (31.8%)	07 (100%)
Total	22 (100%)	20 (90.9%)

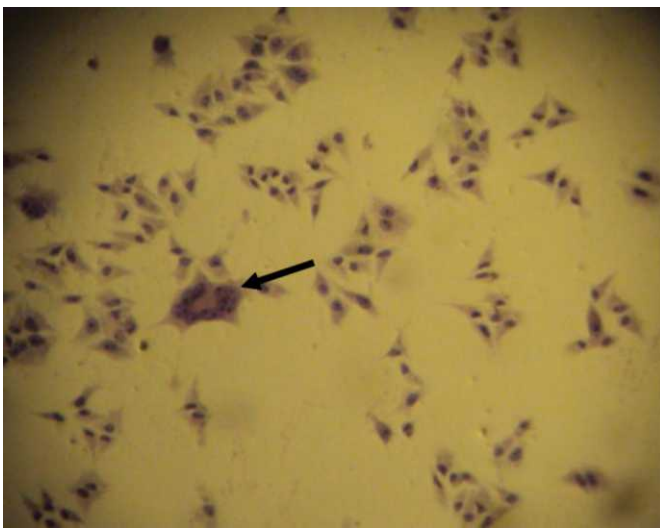
Strains were subjected to at least 3 blind passages before discarded as negative. The specimens inocula presented evidence of CPE, most of them showed discrete effect at the first passage, however, accentuated at subsequent passages. Briefly, infected cells demonstrated cells rounding, increased volume and refringence and formation of lumps detected focally in the monolayer, 24-48 h after inoculation. Subsequently, at 72-96 h p.i., these effects spread throughout the monolayer and cell detachment from the monolayer was also observed (figure 1). The CPE was similar to that of standard HSV-1 used as positive control.

Cell adapted strains were stained with hematoxylin-eosin at 24, 48 and 72 h after infection. Mainly, after 48 h of infection the presence of syncytia was remarkable, although additional minor changes were observed, such as the volume of the nucleus or cytoplasm, albeit discrete (figure 2).

**Figure 1** – HEp-2 cell cultures infected with the isolate S8. Control noninfected cell cultures (A) and cultures with cytopathic effect 48 h (B), 72 h (C) and 96 h (D) post-infection. Unstained fresh cultures (50X).



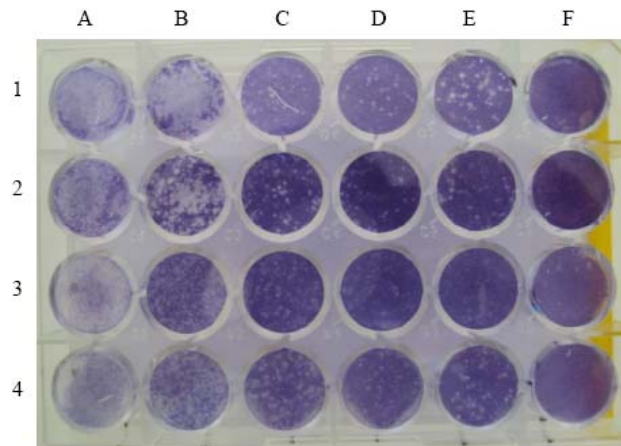
**Figure 2** – HEp-2 cell cultures infected with the isolate S8. Infected culture 48 h p.i. Multinucleate giant cell (syncytium - arrow) is shown in cultures stained with hematoxylin- eosin (40X).



The isolates were evaluated for the ability to produce plaques in HEp-2 cells. Among 20 strains that developed characteristic CPE only six developed plaque. The strains produced plaques with irregular borders with different sizes. The strains S1-S4

produced predominantly large plaques with an average of 1.0 mm, while strains S5 and S6 produced predominantly small plaques with an average of 0.4 mm in diameter (figure 3).

Figure 3 – Plaques developed by isolate S6 (line 1-4) in HEp-2 cell cultures 72 h p.i., diluted to the tenth 10<sup>-4</sup>-10<sup>-8</sup> (rows A-E), after crystal violet staining. Noninfected cell control (row F).



The cytotoxicity (CC<sub>50</sub>) of antivirals demonstrated the following, >10 mg/ml for ACV, 3.45 mg/ml for PFA, 8.5 mg/ml for Ara-C and 0.15 mg/ml for F3T.

In table 2 it is represented the results of the control sample HSV-1 to the antivirals tested.

**Table 2** – The sensitivity of the strain HSV-1 used as control against ACV, PFA, Ara-C and F3T.

	Antivirals <sup>e</sup>			
	ACV	PFA	Ara-C	F3T
CC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	>10 <sup>b</sup>	3.45	8.5	0.15
IC <sub>50</sub> <sup>b</sup>	2.10	0.57	1.98	0.43
SI <sup>c</sup>	>4.76	6.05	4.29	0.34
VI <sup>d</sup>	67	79.6	81.7	100

<sup>a</sup> Cytotoxic concentration 50%; <sup>b</sup> mg/ml; <sup>c</sup> CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>; <sup>d</sup> Viral inhibition in %; <sup>e</sup> 2.5 mg/ml.

Table 3 shows the results of antivirals sensitivity of six isolates (S1-S6) when tested for ACV, PFA, Ara-C and F3T at the concentrations of 4.0 mg/ml, 1.5 mg/ml, 3.0 mg/ml and 0.5 mg/ml respectively.

**Table 3** – The sensitivity of the isolates S1-S6 against ACV, PFA, Ara-C and F3T by plaque assay.

Isolate	VI <sup>e</sup>			
	ACV <sup>a</sup>	PFA <sup>b</sup>	Ara-C <sup>c</sup>	F3T <sup>d</sup>
S1	100	67	100	100
S2	100	90	100	100
S3	100	100	100	100
S4	100	67	100	100
S5	63	76	100	100
S6	100	85	100	100

a4.0 mg/ml; b1.5 mg/ml; c3.0 mg/ml; d0.5 mg/ml; eViral inhibition in %.

The sensitivity to antivirals of the isolates that could not be assayed by plaque assay was performed by TCID50 against ACV, PFA, Ara-C and F3T at the concentrations of 3.0 mg/ml, 1.5 mg/ml, 3.0 mg/ml and 0.14 mg/ml respectively and is represented in table 4.

**Table 4** – The sensitivity of the isolates S7-S11 against ACV, PFA, Ara-C and F3T by TCID50 assay.

Isolate	VI <sup>e</sup>			
	ACV <sup>a</sup>	PFA <sup>b</sup>	Ara-C <sup>c</sup>	F3T <sup>d</sup>
S7	99.9	99.9	100	100
S8	94.9	94.9	100	77.5
S9	90	100	100	100
S10	96.8	96.8	99.8	70
S11	85	90	61	94.5

a3.0 mg/ml; b1.5 mg/ml; c3.0 mg/ml; d0.14 mg/ml; eViral inhibition in %.

The sensitivity of the isolates S1-S11 against the drugs ACV, PFA, Ara-C and F3T are presented in table 5.

**Table 5** – The sensitivity of the isolates S1-S11 against ACV, PFA, Ara-C and F3T by plaque assay or TCID50.

Isolate	VI <sup>e</sup>			
	ACV <sup>a</sup>	PFA <sup>b</sup>	Ara-C <sup>c</sup>	F3T <sup>d</sup>
S1	100	67	100	100
S2	100	90	100	100
S3	100	100	100	100
S4	100	67	100	100
S5	63	76	100	100
S6	100	85	100	100
S7	99.9	99.9	100	100
S8	94.9	94.9	100	77.5
S9	90	100	100	100
S10	96.8	96.8	99.8	70
S11	85	90	61	94.5

a4.0 mg/ml (plaque assay) and 3.0 mg/ml (TCID50); b1.5 mg/ml; c3.0 mg/ml.; d0.5 mg/ml (plaque assay) and 0.14 mg/ml (TCID50); eViral inhibition in %.

#### 4.4 DISCUSSION AND CONCLUSION

In this work we demonstrated the isolation and adaptation of HSV from clinical specimens in cell culture. We also evaluated the cytopathological features of the isolates, as well as, their sensitivity to some anti-herpesvirus commercially available. The development of the CPE was used to monitor the isolation and adaptation of the isolates in fresh preparation or after cell HE staining. HEp-2 cell cultures were used as the cell of choice for their susceptibility (Walpita et al., 1985). The CPE was observed 24-48 h after the inoculation of treated clinical specimens, as has been described (Darougar et al., 1986; Whitley & Roizman, 2001; Scoular et al., 2002). Infected cells presented increased cytoplasm refringence, cell rounding and clumping initially in a focal pattern. Later, this effect was disseminated throughout the cell monolayer in accordance to Athmanathan et al., (2002) findings in human corneal epithelia cells (HCE). Characteristically, giant multinucleated cells were observed after HE staining of infected cell, as previously shown by Syrjanen et al. (1996) in epithelial keratinocytes. The isolation of HSV in cell culture as a diagnostic method for HSV infection has been recognized by its efficiency, rapidity and low cost, as has been demonstrated elsewhere (Oranje & Folkers, 1988; Solomon, 1988; Greenberg, 1996; Greenberg, 2003; Huber, 2003). Moreover, Varicella zoster virus also can be isolated easily in cell culture, with similar cytopathological features, therefore, the confirmation with immunocytochemistry or molecular assays are necessary.

After the cell culture isolation and adaptation, the isolates were studied for their ability to produce plaques as an additional cytopathological features. We found isolates that developed small plaques and other, predominately, large plaques that could represent

mutants of plaque size. It is expected that genetically stable virus population produce uniform size plaques. Leary et al. (2002) demonstrated HSV plaques with uniform size, well-defined contour, with approximately 1.2 mm diameter. Furthermore, HSV plaque size, has been used to distinguish HSV-1 and HSV-2 (Lowry et al., 1971; Plummer et al., 1974). As we demonstrated isolates whose populations produced plaque with varying size, prevailing those with large plaque or those with small plaques, we found plausible to suggest the occurrence of plaque size mutants. Plummer et al. (1970) demonstrated that HSV wild strain and mutants produced plaques with 0.7-1.2 mm and 1.4-2.4 mm diameter, respectively. Similar results were demonstrated by Yamamoto et al. (1972) suggesting that large plaques mutants are selected after several passages in cell cultures.

As far as sensitivity of the isolates to commercially available anti-herpesvirus drugs, we demonstrated that ACV, PFA, Ara-C and F3T, inhibited the isolates in varying degree from 61-100%, based on the percentage of viral inhibition.

The study of the sensitivity of HSV to antiviral drugs is a valuable tool for the evaluation HSV infections, mainly in immunocompromised patients particularly with the emergence of ACV resistant mutants (Cotarelo et al., 1999). Yet today, there is no consensus between the *in vitro* drug susceptibility and the drug resistance *in vivo* for a given virus infections (Rabela et al., 2002). However clinical studies demonstrated a significant correlation of *in vitro* results with the corresponding treatment response (Safrin et al., 1996).

It has been shown that both assays based in plaque reduction and infectious dose reduction are references methods for the evaluation of drug sensitivity (De La Iglesia et al., 1998; Hodinka et al., 2000).

The importance of the *in vitro* evaluation of virus sensitivity to drugs is highlighted, as useful for the understanding of the mechanisms of resistant emergence, drug concentration and the limit of susceptibility and resistance, amongst others.

In conclusion, we suggest that the methodology for HSV isolation and characterization is straightforward, however, the study of drug susceptibility, albeit, of great importance in clinical practice for the treatment and control of HSV infections, need to be improved.

#### Acknowledgements

The authors wish to thank to CNPq, Capes, Fundação Araucária and Proppg/UEL for the financial support.

## 4.5 REFERENCES

- Athmanathan, S.; Reddy, S. B.; Nutheti, R.; Rao, G. N. 2002. Comparison of an immortalized human corneal epithelial cell line with Vero cells in the isolation of herpes simplex virus-1 for the laboratory diagnosis of herpes simplex keratitis. *BMC Ophthalmology* 2:3.
- Brady, R. C.; Bernstein, D. I. 2004. Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Research* 61(2):73-81.
- Cotarelo, M.; Catalan, P.; Sanchez-Carrillo, C.; Menasalvas, A.; Cercenado, E.; Tenorio, A.; Bouza, E. 1999. Cytopathic effect inhibition assay for determining the in vitro susceptibility of herpes simplex virus to antiviral agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44(5):705-8.
- Darougar, S.; Walpita, P.; Thaker, U.; Goh, B. T.; Dunlop, E. M. 1986. A rapid and sensitive culture test for the laboratory diagnosis of genital herpes in women. *Genitourinary Medicine* 62(2):93-6.
- De La Iglesia, P.; Melon, S.; Lopez, B.; Rodriguez, M.; Blanco, M.I.; Mellad, P.; De Ona, M. 1998. Rapid screening tests for determining in vitro susceptibility of herpes simplex virus clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 36(8):2389-91.
- Greenberg, M. S. 1996. Herpesvirus infections. *Dental Clinics of North America* 40(2):359-68.
- Greenberg, M. S. Ulcerative, vesicular, and bullous lesions. In: Greenberg, M. S.; Glick, M. (eds.). *Burket's oral medicine: diagnosis and treatment*, 10th. 2003. Ontario (Canada): BC Decker. 50-84 p.
- Hodinka, R.; Swierkosz, E.; Lancaster, D.; Moore, B. M.; Sacks, S.; Scholl, D.; Wright, D. K. 2000. Antiviral susceptibility testing. Proposed standard M33-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- Huber, M. A. 2003. Herpes simplex type-1 virus infection. *Quintessence International* 34(6):453-67.
- Kuo, Y.; Lee, Y.; Leub, Y.; Tsai, W.; Change, S. 2008. Efficacy of orally administered *Lobelia chinensis* extracts on herpes simplex virus type 1 infection in BALB/c mice. *Antiviral Research* 80(2):206-212.
- Leary, J. J.; Wittrock, R.; Sarisky, R. T.; Weinberg, A.; Levin, M. J. 2002. Susceptibilities of herpes simplex viruses to penciclovir and acyclovir in eight cell lines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46(3):762-8.
- Lowry, S. P.; Melnick, J. L.; Rawls, W. E. 1971. Investigation of plaque formation in chick embryo cells as a biological marker for distinguishing herpes virus type 2 from type 1. *The Journal General Virology* 10(1):1-9.
- Nishimura, T.; Toku, H.; Fukuyasu, H. 1977. Antivirals compounds. XII. Antiviral activity of amidinohydrazone of alkoxyphenyl - substituted carbonyl compounds against influenza virus in eggs and in mice. *The Kitasato Achieves of Experimental Medicine* 50(1-2):39-46.

- Oranje, A. P.; Folkers, E. 1988. The Tzanck smear: old, but still of inestimable value. *Pediatric Dermatology* 5(2):127-9.
- Plummer, G.; Waner, J. L.; Phuangsab, A.; Goodheart, C. R. 1970. Type 1 and type 2 herpes simplex viruses: serological and biological differences. *Journal of Virology* 5(1):51-9.
- Plummer, G.; Goodheart, C. R.; Miyagi, M.; Skinner, G. R.; Thouless, M. E.; Wildy, P. 1974. Herpes Simplex Viruses: Discrimination of types and correlation between different characteristics. *Virology* 60(1):206-16.
- Rabella, N.; Otegui, M.; Labeaga, R.; Rodriguez, P.; Margall, N.; Gurgui, M.; Prats, G. 2002. Antiviral susceptibility of Herpes simplex viruses and its clinical correlates: a single center's experience. *Clinical Infectious Diseases* 34(8):1055-60.
- Ramos, A. P. D.; Stefanelli, C. C.; Linhares, R. E. C.; Brito, B. G.; Santos, N.; Gouvea, V.; Lima, R. C.; Nozawa, C. M. 2000. The stability of porcine rotavirus in feces. *Veterinary Microbiology* 71(1-2):1-8.
- Reed, L. J.; Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal Hyg.* 27:493-497.
- Roizman, B.; Knipe, D.M.; Whitley, R.J. Herpes Simplex Viruses. In: Knipe, D. M.; Howley, P. M. (eds.). *Fields Virology*, 5th. 2007. Vol II. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. 2502-2601p.
- Rovozzo G. C.; Burke C. N. 1973. *A Manual of Basic Virological Techniques*. 1st Ed., Prentice Hall Inc. Englewood Cliffs. New Jersey. 64-93p.
- Safrin, S.; Palacios, E.; Leahy, B. J. 1996. Comparative Evaluation of Microplate Enzyme-Linked Immunosorbent Assay versus Plaque Reduction Assay for Antiviral Susceptibility Testing of Herpes Simplex Virus Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40(4):1017-1019.
- Scoular, A. 2002. Using the evidence base on genital herpes: optimising the use of diagnostic tests and information provision. *Sexually Transmitted Infections* 78(3):160-5.
- Solomon, A. R. 1988. New diagnostic tests for herpes simplex and varicella zoster infections. *Journal of the American Academy of Dermatology* 18(1Pt2):218-21.
- Steiner, I.; Kennedy, P. G. E.; Pachner, A. R. 2007. The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster. *Lancet Neurology* 6(11):1015-28.
- Syrjanen, S.; Mikola, H.; Nykanen, M.; Hukkanen, V. 1996. In vitro establishment of lytic and nonproductive infection by herpes simplex virus type 1 in three-dimensional keratinocyte culture. *Journal of Virology* 70(9):6524-8.
- Walpita, P.; Darougar, S.; Thaker, U. 1985. A rapid and sensitive culture test for detecting herpes simplex virus from the eye. *The British Journal of Ophthalmology* 69(9):637-9.
- Whitley, R. J.; Roizman, B. 2001. Herpes simplex virus infections. *Lancet* 357(9267):1513-1518.

Yamamoto, S.; Kabuta, H.; Nakagawa, Y. 1972. Mutants of Herpes simplex virus. I. Isolation and properties of mutants characterized by plaque size and cytopathogenicity. *The Kurume Medical Journal* 19(1):23-31.

Yeung-Yue, K. A.; Brentjens, M. H; Lee, P. C.; Tying, S. K. 2002. Herpes simplex viruses 1 and 2. *Dermatologic Clinics* 20(2):249-266.