

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA CELULAR E VIRAL  
DURANTE A INFECÇÃO *IN VITRO* PELO HERPESVÍRUS  
CANINO 1**

JACQUELINE KAZUE KURISSIO

BOTUCATU-SP

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA CELULAR E VIRAL  
DURANTE A INFECÇÃO *IN VITRO* PELO HERPESVÍRUS  
CANINO 1**

JACQUELINE KAZUE KURISSIO

Tese apresentada junto ao Programa de  
Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. João Pessoa Araújo Jr.

Botucatu-SP

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Kurissio, Jacqueline Kazue.

Análise da expressão gênica celular e viral durante a infecção in vitro pelo herpesvírus canino 1 / Jacqueline Kazue Kurissio. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: João Pessoa Araújo Júnior

Capes: 21201013

1. Cão - Doenças. 2. Vírus do herpes em animais. 3. Expressão gênica. 4. Seqüenciamento de nucleotídeo. 5. Transcriptoma.

Palavras-chave: Cão; Herpesvírus; RNAseq; Transcriptoma; Vírus.

Nome da Autora: Jacqueline Kazue Kurissio

**Título: Análise da expressão gênica celular e viral durante a infecção *in vitro* pelo herpesvírus canino 1**

## COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior  
Presidente e Orientador  
Departamento de Microbiologia e Imunologia  
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla  
Membro Titular  
Departamento de Parasitologia  
IBB-UNESP Campus Botucatu

Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann  
Membro Titular  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS)  
FMVZ - USP

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra de Moraes Gimenes Bosco  
Membro Titular  
Departamento de Microbiologia e Imunologia  
FMVZ – UNESP Campus Botucatu

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marianna Vaz Rodrigues  
Membro Titular  
Departamento de Medicina Veterinária  
Universidade Paulista Campus Bauru

Data: 12 de Janeiro de 2017.

## *Dedicatória*

*À Deus e à minha Nossa Senhora pelo amparo e acolhimento nos momentos de dificuldades e desânimos.*

*Aos meus pais Adélia H. Kurissio e Kunio Kurissio, pelo apoio incondicional, força e confiança. Por me manter sempre firme nos princípios que me passaram e me manter na caminhada. Além da oportunidade e incentivos aos estudos, que não puderam ter. Minha querida mãe que sempre lutou na vida, é um exemplo de perseverança, honestidade e amor à família.*

*Aos meus queridos irmãos (Marcos, Marcia e Marcio) pelo apoio e companheirismo, em meio a tantas dificuldades, sempre nos mantivemos firmes e unidos.*

## *Agradecimentos*

Ao professor e orientador Prof. João Pessoa Araújo Júnior por me permitir o cumprimento de mais esta etapa na minha vida. Pela força e acolhimento no Doutorado e possibilitar a realização de um projeto desse porte.

Às amigas Marianna Vaz Rodrigues pela lealdade, integridade, humildade e companheirismo em todos os momentos, Taís Fukuta Cruz pelos conhecimentos, seriedade e apoio, Sueli A. Taniwaki pela disponibilidade em sempre ajudar, paciência e dedicação, e Lidiany Araújo pela força e compreensão.

À equipe de pós-graduandos e orientados do professor João Pessoa pela convivência ao longo desses anos de jornada.

À Andreza, Flávio, Ricardo, Michely, Elâine (Ploc) e Marlous por me receberem no laboratório de forma acolhedora, pelos ensinamentos e à agradável convivência nesse período.

Às equipes de pesquisa e colegas de bancada do IBTEC, pelas conversas, momentos de descontração no almoço, troca de experiências, solidariedade e ajuda nas dificuldades durante o experimento, foi muito enriquecedor.

Aos professores Paulo Eduardo M. Ribolla, pela atenção e suporte durante a execução do projeto, Jayme de Souza Neto e Deilson Elgui Oliveira.

Ao Bruno César Rossini pelo suporte técnico, apoio, disponibilidade durante o sequenciamento, estando sempre presente.

Aos funcionários e docentes do IBTEC e do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências pelo apoio, gentileza prestada e pela acolhida.

Aos funcionários, residentes, pós-graduandos e docentes da FMVZ por me acolherem desde o período de estágios durante a graduação.

À todos, dos lugares por onde passei, que contribuíram para a minha formação e aprendizado.

À Professora Dr<sup>a</sup> Celmira Calderón (UENP *Campus* Bandeirantes), por sempre me

incentivar na minha caminhada, desde a graduação onde tudo começou. Sempre acreditando no melhor de cada um e em nosso potencial, mesmo quando acreditamos que não somos capazes.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de Doutorado.

## FIGURAS

FIGURA 1: Componentes estruturais do herpesvírus (FRANCO et al., 2012). .....	2
FIGURA 2: Estudos de soroprevalência e casos relatados de CaHV-1 no mundo.. .....	5
FIGURA 3: Ciclo replicativo dos alfa herpesvírus.....	6
FIGURA 4: Os cinco genes celulares mais expressos de cada um dos momentos avaliados durante a infecção viral. ....	25
FIGURA 5 - Evolução temporal de expressão do gene celular PTGS2 durante a infecção viral. ....	25
FIGURA 6: <i>Heatmap</i> dos genes que apresentaram as maiores expressões durante a infecção.....	30
FIGURA 7: <i>Heatmap</i> dos genes demonstrando em quais momentos cada gene apresentou suas maiores expressões, agrupados pela fases de infecção.. ....	31
FIGURA 8: Genes virais imediatos expressos durante a infecção entre os momentos 16h-pi e 32h-pi.....	33
FIGURA 9: Evolução temporal durante a infecção da expressão do gene UL48 durante o período de infecção.....	35
FIGURA 10: Expressão dos genes iniciais virais durante o momentos de infecção entre 16h-pi e 32h-pi, com base nos valores de RPKM. ....	36
FIGURA 11: Genes tardios mais expresso a partir do momento 16h-pi com base nos valores médio de RPKM dos genes avaliados. ....	38
FIGURA 12: Avaliação do aumento da expressão dos genes em relação aos momentos anteriores.....	40
FIGURA 13: Expressão dos genes que não foram agrupados pela fase da infecção, com base na média de RPKM dos momento de infecção.....	42
FIGURA 14: Genes virais menos expressos, com base no valor médio de RPKM entre os momentos 16h-pi e 32h-pi.....	44
FIGURA 15: Reação de amplificação dos genes da timidina quinase (TK) pela qPCR em amostras de DNA de cultura infectada. ....	45
FIGURA 16: Curva padrão absoluta com 9 pontos de diluição na razão 10 e dados de eficiência com <i>slope</i> de -3,471, $R^2$ de 0,996 e eficiência de 94,119%..	45
FIGURA 17: Quantificação da carga viral (por número de cópias) intracelular de cultura celular infectada, durante os momentos da infecção.....	46
FIGURA 18: Expressão de genes pela média de RPKM ao longo da infecção....	68

## TABELAS

TABELA 1: Ontologia gênica dos processos biológicos dos genes regulados negativamente com base no valor de Fold Change do momento 24h-pi. ....	26
TABELA 2: Ontologia gênica dos processos biológicos dos genes regulados positivamente com base no Fold Change, do momento 28h-pi relacionados à NO. ....	28
TABELA 3: Descrição dos genes iniciais virais expressos. ....	37
TABELA 4: Momentos a infecção e a quantificação da carga viral relacionados com a fase de infecção. ....	46

## APÊNDICE

TABELA 5: Análise da ontologia gênica dos Processos Biológicos dos genes regulados positivamente com base o valor de Fold Change do momento 1h-pi..	61
TABELA 6: Análise da ontologia gênica dos Processos Biológicos dos genes regulados positivamente com base o valor de Fold Change do momento 4h-pi. .	61
TABELA 7: Análise de ontologia gênica dos Processos Biológicos dos genes regulados positivamente, com base no valor de Fold Change, do momento 16h-pi. ....	62
TABELA 8: Análise de ontologia gênica dos Processos Biológicos dos genes regulados positivamente, com base no valor de Fold Change, do momento 20h-pi. ....	62
TABELA 9: Análise de ontologia gênica dos Processos Biológicos dos genes regulados positivamente, com base no valor de Fold Change, do momento 24h-pi. ....	62
TABELA 10: Análise de ontologia gênica dos Processos Biológicos dos genes regulados negativamente, com base no valor de Fold Change, do momento 24h-pi. ....	63
TABELA 11: Análise de ontologia gênica dos Processos Biológicos dos genes regulados positivamente, com base no valor de Fold Change, do momento 28h-pi. ....	63
TABELA 12: Análise de ontologia gênica dos Processos Biológicos para Apoptosis com diferencial de expressão gênica positiva, com base no valor de Fold Change, do momento 28h-pi. ....	64
TABELA 13: Análise de ontologia gênica dos Processos Biológicos dos genes regulados positivamente, com base no valor de Fold Change, do momento 32h-pi. ....	65
TABELA 14: A evolução temporal das expressões dos genes virais de CaHV-1 durante a infecção em células MDCK. ....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg: micrograma

µL: microlitro

CaHV-1: *Canid herpesvirus type 1* – herpesvírus canino tipo 1

CDS: *coding DNA sequence* – sequência de DNA codificante

DE: diferencial de expressão

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* – meio Eagle modificado de Dubecco

DNA: ácido desoxiribonucléico

FC: *Fold Change*

FDR: *False Discovery Rate* – Taxa de falso positivo

FE: *Fold enrichment* – proporção de enriquecimento

gB: glicoproteína B

GDE: *gene differential expression* - diferencial de expressão gênica

GO: *gene ontology* – ontologia gênica

HSV: Herpes Simplex vírus

ICP: infected cell protein – proteína de célula infectada

ICTV: *International Committee on Taxonomy of Viruses* – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus)

Kb: kilobases

MDCK: *Madin-Darby canine kidney* – linhagem de célula de rim canino Madin-Darby

mL: mililitro

MOI: *multiplicity of infection* – multiplicidade de infecção

ng: nanograma

NGS: *Next-Generation Sequencing* – sequenciamento de nova geração

ORF: *Open read frame*

PERK: *Protein kinase RNA-like endoplasmatic reticulum kinase* – proteína quinase semelhante ao RNA do retículo endoplasmático)

pi: pós inoculação

PRV: *Pseudorabies Virus* – vírus da pseudo raiva

RIN: *RNA integrity number* – número de integridade de RNA

mRNA: *messenger RNA* – RNA mensageiro

RPKM: *Reads per Kilobase per million mapped reads* – transcritos por kilobases por milhões de transcritos mapeados.

SBF: soro fetal bovino

TK: *Thimidine kinase* – timidina quinase

UL: *Unique Long* – longo único

US: *Unique Short* – curto único

VHS: *Vírión Host Shutoff* - desligamento vírus - hospedeiro

VZV: *Varicella Zoster-Virus* - vírus varicela-Zoster (herpesvírus humano tipo 3)

# SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	<b>xiv</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xv</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Revisão de Literatura</b> .....	<b>2</b>
2.1 Expressão gênica.....	9
2.2 RNA-seq .....	10
2.3 Análise de transcriptoma e <i>Data mining</i> .....	11
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>13</b>
<b>4. Materiais e Métodos</b> .....	<b>14</b>
4.1 Fluxograma das etapas da pesquisa .....	14
4.2 Isolamento Viral .....	15
4.3 Cultura de Células e vírus .....	15
4.4 Infecção viral .....	16
4.5 Isolamento e análise de ácidos nucleicos .....	16
4.6 Preparo de biblioteca para sequenciamento .....	17
4.7 <i>Clustering</i> e sequenciamento.....	17
4.10 Análise de enriquecimento funcional baseada em Ontologia Gênica .....	19
4.11 Análise de Expressão de Genes Virais .....	20
4.12 Análise total dos genes em curso padrão. ....	20
4.13 PCR em tempo real para avaliação da replicação viral.....	21
4.14 Preparo da Curva Padrão para Quantificação Absoluta .....	21
<b>5. Resultados e Discussão</b> .....	<b>23</b>
5.1 Análise de expressão dos genes celulares .....	24
<b>5.1.1 Genes celulares regulados mais positivamente</b> .....	24
<b>5.1.2 Genes celulares regulados mais negativamente</b> .....	28
5.2 Análise de expressão dos genes virais .....	29
5.3 Avaliação da expressão de genes virais imediatos.....	32
5.4. Expressão de genes virais Iniciais .....	36
5.5 Expressão de genes virais tardios .....	37

5.6 Análise de expressão de genes virais pela evolução curso padrão da infecção.....	39
5.7 Genes virais que não pertencem à classe de genes das fases de infecção por herpesvirus .....	42
5.8 Genes virais menos expressos .....	43
5.9 Análise da replicação viral por qPCR intracelular .....	44
<b>6. Conclusões .....</b>	<b>49</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>50</b>
<b>8. Apêndice.....</b>	<b>61</b>
<b>9 Trabalho para ser enviado à revista <i>Brazilian Journal of Microbiology</i>.....</b>	<b>69</b>

KURISSIO, J.K. **Análise da expressão gênica celular e viral durante a infecção *in vitro* pelo herpesvírus canino 1.** Botucatu, 2017,109 p. Defesa de Tese – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista

## Resumo

A análise de transcriptoma é essencial para determinar a relação entre as informações codificadas num genoma, a sua expressão e variação genotípica. O transcriptoma é o conjunto completo de transcritos e a quantidade gerada, relacionado a um estágio de desenvolvimento específico ou condição fisiológica da célula. Estes transcritos podem ser mapeados utilizando genomas como referência, para investigação de expressão do genes. Para isso, exige procedimentos de mineração de grandes volumes de dados de RNA-Seq para extrair conhecimentos biológicos. As ferramentas de bioinformática foram desenvolvidas para facilitar e agilizar essas análises, transformando dados em informações. Assim, alguns desses recursos foram empregados na análise de dados gerados pelo RNAseq, a partir de RNAm de cultura celular MDCK infectada por herpesvírus canino tipo 1 (1CaHV-1 - *Canid alphaherpesvirus type 1*) em diferentes momentos pós infecção. Dessa forma, foi realizado um *dual* RNAseq, em que foi avaliado tanto a expressão gênica celular do hospedeiro como do patógeno viral, no curso da infecção. Para isso, foram analisados o transcriptoma das atividades celulares e os processos envolvidos no ciclo de infecção viral, até o momento 32h-pi. Assim, foram identificados as atividades de respostas celulares à infecção viral, mecanismos regulatórios induzidos pelo vírus, transcrição de genes virais imediatos, iniciais e tardios. Dentre eles, foi verificado a elevação da expressão do gene COX-2 induzido pela replicação viral, sendo relacionado à hipóxia e apoptose. Tal fato levanta a possibilidade do uso de inibidores seletivos de COX-2 para interrupção do ciclo de replicação viral e no tratamento da infecções por CaHV-1. Também verificou-se que não ocorreu a cascata de indução da expressão de genes do ciclo de infecção forma temporal e ordenada. No qual foi verificado a expressão de genes tardios precocemente, e genes imediatos e iniciais permanecendo a expressão tardiamente. Até o momento foi primeiro trabalho realizado de *dual* RNAseq para análise de expressão gênica celular e viral para CaHV-1.

Palavras chave: transcriptoma; RNAseq; herpesvírus; infecção; gene; cão.

KURISSIO, J.K. **Análise da expressão gênica celular e viral durante a infecção *in vitro* pelo herpesvírus canino 1.** Botucatu, 2017,99p. Defesa de Tese – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista

## **Abstract**

Transcriptome analysis is essential to determine the relationship between the information encoded in a genome, its expression and genotypic variation. The transcriptome is the complete set of transcripts and the amount generated, related to a specific developmental stage or physiological condition of the cell. These transcripts can be mapped using genomes as reference for investigation of gene expression. Therefore, were required procedures to mine large volumes of RNA-Seq data to extract biological knowledge. Bioinformatics tools have been developed to facilitate and streamline these analyzes, transforming data into information. Thus, some of these features were employed in the analysis of data generated by RNAseq from canine herpesvirus type 1 (1CaHV-1 - *Canid alphaherpesvirus type 1*) MDCK cell culture mRNA at different post-infection stages. Thereby, a dual RNAseq was performed, in which both the host cell and the viral pathogen gene expression were evaluated in the course of infection. For this, was analyzed the transcriptome of the cellular activities and the processes involved in the cycle of viral infection, until the moment 32h-pi. Thus, the activities of cellular responses to viral infection, regulatory mechanisms induced by the virus, and transcription of early, early and late viral genes were identified. Among them, was verified the elevation of COX-2 gene expression induced by viral replication, unleashing the hypoxia and apoptosis mechanisms. This fact would suggest the possibility of the use of selective COX-2 inhibitors to interrupt the viral replication cycle and in the treatment of CaHV-1 infections. We found that the induction cascade of gene expression from the infection cycle did not occurred ordered and temporally. The expression of late genes was verified early, and early immediate and early genes remaining expression tardily. To date, it was the first work of dual RNAseq of cellular and viral gene expression analysis for CaHV-1.

**Keywords:** transcriptome; RNAseq; herpesvirus; infection; gene; dog

## 1. Introdução

A infecção pelo herpesvírus canino tipo 1 (CaHV-1) é considerada uma enfermidade infecto-contagiosa endêmica em muitos países. Estudos realizados comprovam a sua existência e persistência em cães domésticos e canídeos selvagens, adquirida naturalmente

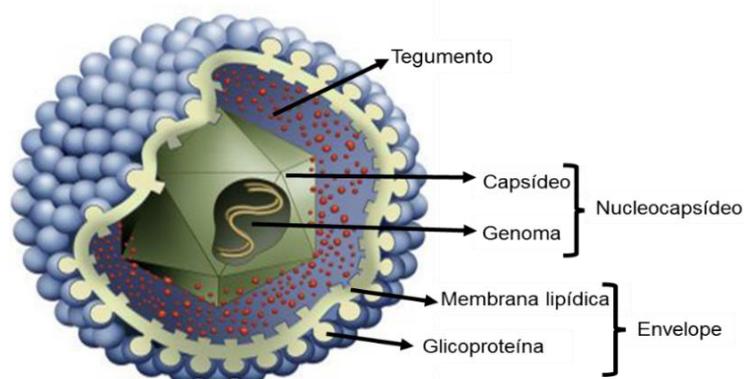
Devidos às várias características patogênicas do vírus, o herpesvírus canino pode causar problemas reprodutivos e perdas econômicas elevadas em canis. A dificuldade de diagnóstico (exceto em neonatos que foram a óbito) e a falta de medidas preventivas e terapêuticas têm sido responsáveis pela baixa conscientização e preocupação de veterinários no controle da doença. No Brasil, foram poucos casos descritos da infecção e óbitos nos animais infectados. A baixa casuísta pode ser devida a poucas técnicas diagnósticas disponíveis para detectar a infecção. Assim, a falta de diagnósticos em animais infectados pode prejudicar o controle e prevenção da doença, contribuindo para a propagação do agente entre os indivíduos susceptíveis. Uma vez que, não há vacinas disponíveis no mercado para profilaxia. Assim, há pouco conhecimento sobre o comportamento da infecção a respeito desse agente na espécie canina. Considerando que os herpesvírus acomete o homem e várias espécies animais, porém são espécie-específico. Portanto, os herpesvírus são vírus adaptados aos seus hospedeiros e possuem vários mecanismos de regulação para a sua replicação e domínio dos processos celulares. Assim, os processos que regulam a transcrição dos genes podem codificar diferentes proteínas virais. Tal transcrição é frequentemente controlada pela interação de regulações por proteínas celulares codificadas por fatores de transcrição celular pré-existente na célula. Portanto, a natureza dos fatores de transcrição celular presentes num tipo de célula pode determinar se uma infecção viral inicial resultará em replicação do vírus e morte da célula hospedeira. A técnica de RNAseq através do sequenciamento de nova geração tem proporcionado análise de milhões de transcrito a partir de amostras biológicas. Consequentemente, contribuindo para o conhecimento e compreensão dos mecanismos de infecção viral, bem como o desenvolvimento de tratamentos e medidas profiláticas. Portanto, através de análises do transcriptoma e perfis transcricionais, é possível obter conhecimento

biológico celular de determinadas condições e momentos, dentre elas os mecanismo e resposta celular a infecção viral que é o objetivo principal desse trabalho.

## 2. Revisão de Literatura

Os membros da família *Herpesviridae* foi isolado de vários hospedeiros incluindo peixes, anfíbios, aves, répteis, mamíferos e alguns invertebrados (WOŻNIAKOWSKI et al., 2015; THIRY et al., 2007). Os herpesvírus são parasitas espécie-específica e co-evoluíram com a espécie hospedeira por milhões de anos (JO et al., 2014). Baseado em características biológicas, tropismo tecidual e organização genômica, os herpesvírus são classificados em três subfamílias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae* (KARLIN, et al., 1994). Dentro da subfamília *Alphaherpevirinae* encontram-se os gêneros *Simplexvirus* e *Varicellovirus*. Os membros do gênero *Varicellovirus* são amplamente encontrados em hospedeiros mamíferos. Alguns podem ter reação cruzada sorologicamente, indicando relações antigênicas entre estes vírus (KING et al, 2012; MANNING et al., 1988).

Os vírions possuem um DNA fita dupla linear, de aproximadamente 120 a 230 Kilobases, contido dentro de um capsídeo icosaédrico envolto por uma camada de material amorfo, o tegumento, envolvido por um envelope constituído por uma membrana lipídica e glicoproteínas em sua superfície (PAPAGEORGIU et al., 2016; ROIZMANN et al., 1992), conforme apresentado em **figura 1**.



**FIGURA 1:** Componentes estruturais do herpesvírus (FRANCO et al., 2012).

Os herpesvírus incluídos na subfamília dos alfa herpesvírus apresentam uma variabilidade de espécies de hospedeiros, com ciclo replicativo curto, rápida disseminação em cultura, destruição eficiente das células infectadas e capacidade de estabelecer infecções latentes em gânglios sensoriais (ROIZMANN et al., 1992; SPEAR e LONGNECKER, 2003). Os alfa herpesvírus são vírus epitélio-neurotrópico e considerados altamente contagiosos, devido ao grande número de vírions infecciosos que são liberados a partir de células infectadas liticamente (EVERMANN et al., 1991). Muitos alfa herpesvírus seguem uma via de infecção primária em células epiteliais de mucosa ou trato respiratório variando quanto à infectividade no hospedeiro natural. Em seguida, deixam estes sítios para invadir o sistema nervoso periférico (SNP), estabelecendo a infecção latente, nos quais podem ocorrer episódios recorrentes e leves da doença (ROIZMANN et al., 1993; HONESS e WHATSON, 1977). A entrada do herpesvírus é um processo complexo, portanto requer múltiplas glicoproteínas e cada qual é multifuncional. Cada glicoproteína pode se ligar a múltiplos receptores, interagindo com outras glicoproteínas e /ou alterar a conformação e induzir a fusão de membrana (CONNOLY et al., 2011; JONHSON e BAINES, 2011; METTENLEITER, 2004). As proteínas que determinam a virulência pelos alfa herpesvírus são as glicoproteínas do envelope, as enzimas codificadas pelo vírus (timidina quinase, ribonucleotídeo redutase, proteína quinase e exonuclease alcalina) e as proteínas do capsídeo. A enzima timidina quinase (TK) foi o primeiro fator de virulência reconhecido em herpesvírus (ZANELLA e FLORES, 1995).

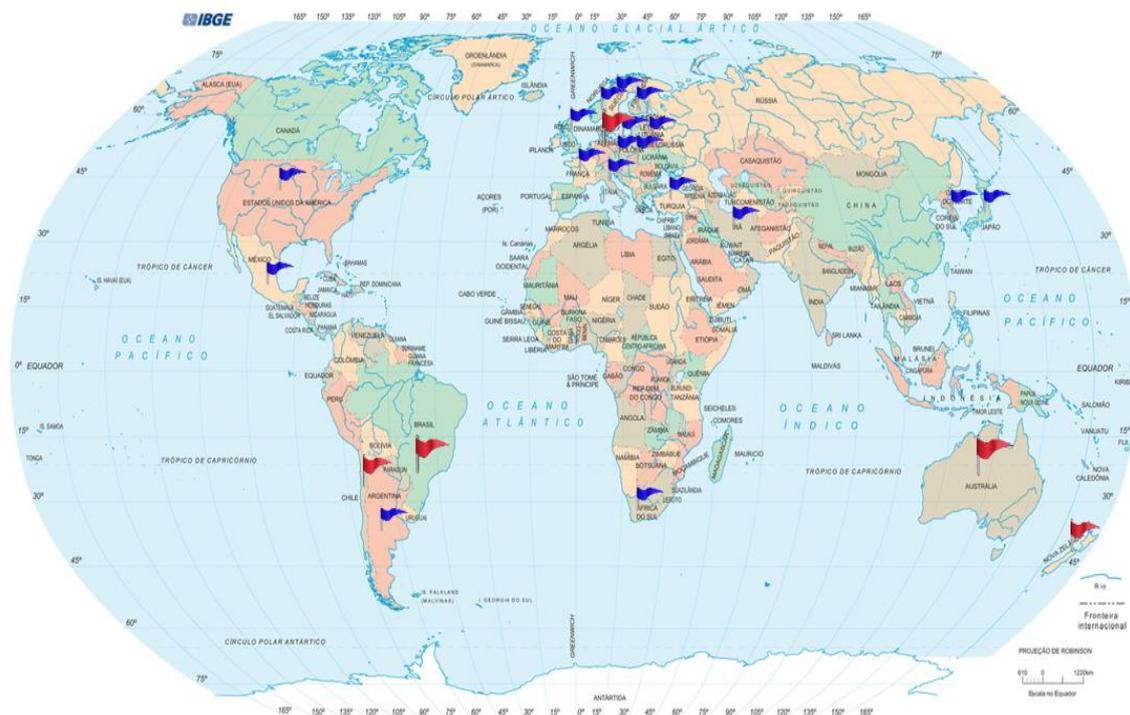
Os herpesvírus estão entre as partículas virais mais complexas e compreendem mais de trinta proteínas codificadas por vírus, além de conterem componentes celulares (METTENLEITER et al., 2006). O sucesso das infecções por herpesvírus depende de várias estratégias, como a maneira rápida e eficiente de invadir a célula hospedeira, desativando a síntese de proteína e alterando os mecanismos reguladores celulares (ROIZMAN e THAYER, 2001). Além da liberação de DNA viral no núcleo, onde é produzidas grandes quantidades do genoma viral em um curto espaço de tempo (MADIGAN et al., 2016; LODISH et al., 2014). E ainda, os herpesvírus compartilham a capacidade de anular os ataques do hospedeiro, como inibição de splicing de RNAm, bloqueio da apresentação de peptídeos antigênicos na superfície celular e

bloqueio da apoptose (morte celular) induzida pela expressão de genes virais (ROIZMAN e THAYER, 2001). Embora o tamanho, a composição, complexidade e funções codificadas pelos seus genomas sejam diversificado, todos os vírus utilizam a maquinaria de síntese proteica do seu hospedeiro, os quais recrutam ribossomos celulares para traduzir mRNAs virais e produzir os produtos proteicos necessários para a sua replicação (WALSH et al., 2013). Além disso, devidos os seus genes serem transcritos e processados pela maquinaria celular, os mRNAs herpesvirais se assemelham estruturalmente ao do seu hospedeiro (GLAUSINGER, 2015). Assim, a expressão genética herpesviral é suscetível à extensa rede de vias regulatórias que controla a tradução celular, muitos dos quais são desenvolvidos para restringir a tradução durante a infecção viral (SANDRI-GODIN e MENDONZA, 1992). Para evitar que isso ocorra, os herpesvírus manipulam os fatores de tradução, cascatas de sinalização e mecanismos de controle dos níveis de mRNA e o acesso aos polissomos (MCKINNEY, 2014). Dessa forma, os vírus DNA nuclear podem interferir seletivamente com a exportação de RNAs restringindo a expressão dos genes do hospedeiro otimizando a replicação viral (GONG et al., 2016).

Segundo o ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses* – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus) (2016), o herpesvírus canino é classificado como sendo da ordem *Herpesvirales*, da família *Herpesviridae*, da subfamília *Alphaherpesvirinae*, um dos membros do gênero *Varicellovirus* e da espécie *Canid alphaherpesvirus type 1* (CaHV-1). O CaHV-1 foi primeiramente, isolado em cultura de célula primária renal de neonatos com infecção aguda e alterações hemorrágicas (CARMICHAEL et al., 1965; STEWART et al., 1965). Em outros relatos, foram observadas alterações citopáticas de forma espontânea em cultura de célula primária DKTC (*Dog Kidney Tissue Culture*) de cães aparentemente saudáveis, sendo atribuídas ao CaHV-1 (SMITH et al., 1970; SPERTZEL et al., 1965). A partir destes achados, outros estudos surgiram correlacionando as infecções por CaHV-1 a problemas reprodutivos, respiratórios, oculares e morte neonatal (KUMAR et al., 2015; KAWAKAMI et al., 2010; LEDBETTER et al., 2009; VERSTEGEN et al., 2008; RONSSE et al., 2004; POSTE, 1972; CARMICHAEL et al., 1969).

Estudos de soroprevalência indicam que o vírus está amplamente disseminado na população canina, em vários países como Argentina (23%),

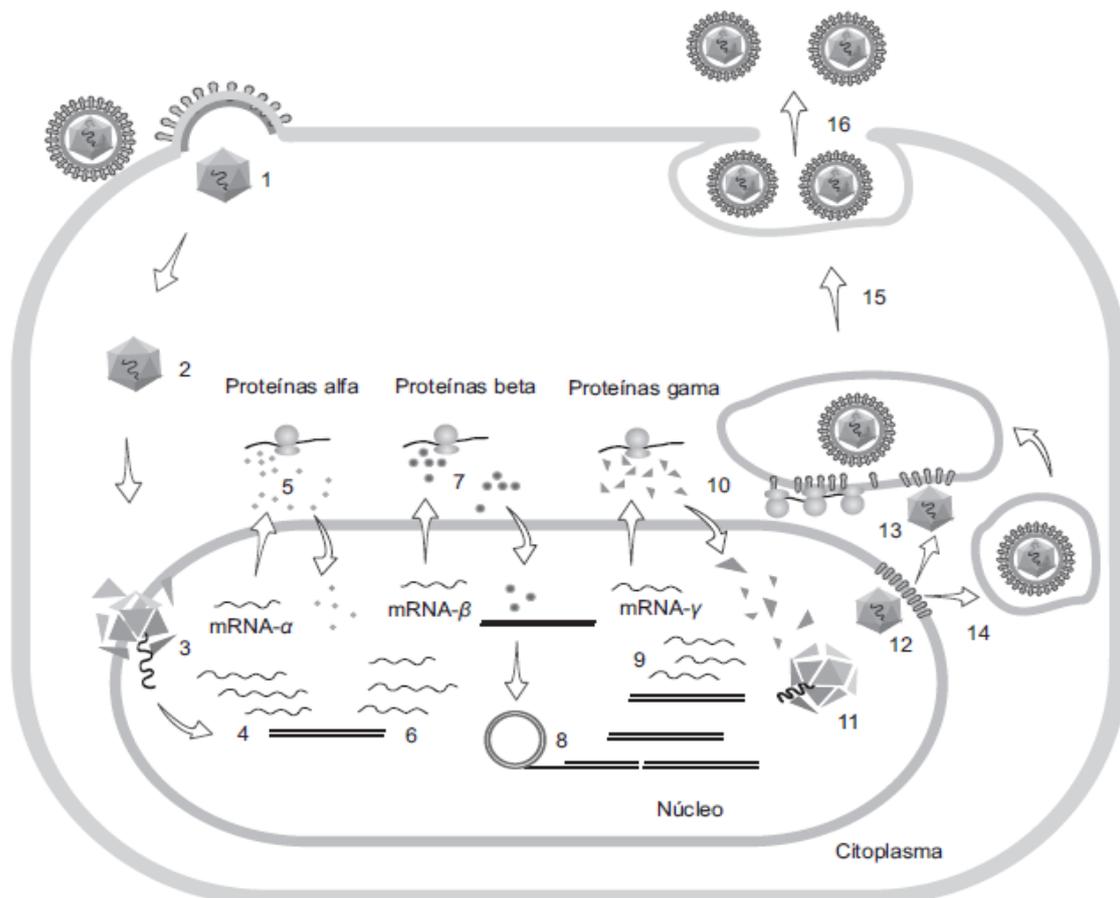
México (87%), África do Sul (22%), Inglaterra (88%); Noruega (80%); Bélgica (20,7%); Irã (39,9%), França (43%), Turquia (39,3); Japão (22-26%), Estados Unidos (6%) entre outros (LARA et al., 2016; PAPAGEORGIU et al., 2016; LEDBETTER, 2013; DE PALMA et al., 2006). A **figura 2** apresenta os países onde foram realizados estudos de soroprevalência e relatos de casos de infecção pelo agente, indicando a sua distribuição pelos continentes.



**FIGURA 2:** Estudos de soroprevalência e casos relatados de CaHV-1 no mundo. As bandeiras azuis indicam os países onde foram realizados estudos de soroprevalência e as bandeiras vermelhas os países onde foram relatados casos de CaHV-1, dentre eles o Brasil Chile, Alemanha, Austrália e Nova Zelândia (LEDBETTER, 2013; ÁVILA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2009; NAVARRO et al., 2005; REUBEL et al., 2002; SCHULZE e BAUGÄRTNER, 1998).

O CaHV-1, como os alfa herpesvírus, apresenta dois ciclos replicativos distintos: o ciclo lítico (infecção aguda ou produtiva) e a infecção latente (GALOSI, 2007). O ciclo lítico ocorre nos locais de penetração do vírus, em células epiteliais no hospedeiro (MIYOSHI, et al., 1998). Neste ciclo há expressão dos genes virais, replicação do genoma, produção de progênie infecciosa e morte celular (GRINDE, 2013; FRANCO et al., 2012). Durante a replicação viral são produzidas proteínas codificadas por genes virais entre eles:

genes imediatos (alfa), iniciais (beta) e tardios (gama) (GRUFFAT et al., 2016). Os genes imediatos e iniciais são expressos nas etapas que antecedem a replicação de DNA viral, enquanto os genes tardios são expressos após a replicação de DNA (NAKABAYASHI e SASAKI, 2009). A **figura 3**, apresenta as etapas da infecção e replicação viral na célula.



**FIGURA 3:** Ciclo replicativo dos alfa herpesvírus. Após a ligação aos receptores, a penetração ocorre por fusão do envelope com a membrana plasmática na superfície celular (1). Os nucleocapsídeos são transportados ao longo dos microtúbulos (2) até os poros nucleares, em seguida o desnudamento e a liberação do genoma no núcleo (3). Inicia a transcrição dos genes imediatos (4) sendo traduzidos nas proteínas imediatas ou alfa (5), que ativam a transcrição dos genes iniciais ou beta (6). As proteínas iniciais (7) estão envolvidas na síntese de nucleotídeos trifosfato e na replicação do genoma (8). Os genes tardios ou gama somente são transcritos após a replicação do DNA (9) e codificam principalmente proteínas estruturais (10). Parte dessas proteínas ingressa para o núcleo e forma pré-capsídeos para o empacotamento do DNA viral (11). Os nucleocapsídeos adquirem o envelope por brotamento através da membrana nuclear interna (12). Podem perder o envelope e serem reenvolvidos no aparelho de Golgi (13), ou são enviados em vesículas até o Golgi (14). Os vírions envelopados são transportados em vesículas do trans-Golgi até a superfície celular (15), onde são liberados por exocitose (FRANCO et al., 2012).

Os primeiros genes transcritos são os genes imediatos e a sua transcrição ocorre logo após a liberação do DNA no interior do núcleo da célula (STINSKY e MEYER, 2007). Os genes imediatos presentes no genoma vírico são transcritos para mRNA e, em seguida, traduzidos em proteínas (WHITE e SPECTOR, 2007). Os produtos de genes imediatos estão envolvidos na formação do complexo de replicação do DNA viral, na composição do complexo de transcrição viral responsável pela expressão dos genes iniciais e tardios, no acúmulo de subconjuntos de RNAm virais imediatos e tardios no citoplasma (SANDRI-GODIN e MENDOZA, 1992).

O herpesvírus, mesmo sem a expressão do gene viral, inibe a transcrição de genes, processamento e transporte de RNAm, e síntese da célula hospedeira. Isso se deve a presença da proteína UL4, do tegumento, que medeia a interrupção da síntese de proteínas do hospedeiro na fase inicial do ciclo de replicação do vírus e atua na degradação do RNAm celular (MATIS e KÚDELOVÁ, 2001; SUZUTANI et al., 2000). Mais tarde, essa RNase viral é neutralizada pelas proteínas VP16 e VP22, também de tegumento (TADEO et al. 2010).

Assim, a proteína VP16 é requerida para a transcrição dos genes imediatos, as quais ativam os genes iniciais que codificam a maquinaria replicativa do DNA viral (KIBLER et al., 1999). Os produtos dos genes iniciais são enzimas e proteínas acessórias envolvidas no metabolismo de nucleotídeos e na replicação do genoma, inclusive a polimerase viral. Esses produtos incluem enzimas como a timidina quinase (TK, *Thimidine Kinase*) e ribonucleotídeo redutase, que catalisam a síntese de nucleotídeos trifosfatos. As proteínas iniciais incluem proteínas de ligação ao DNA, helicase e a DNA polimerase viral. Após a produção das proteínas iniciais, elas vão para o núcleo, para se ligarem ao genoma viral, formando sítios pré-replicativos, onde iniciarão uma intensa replicação de DNA viral. O genoma viral depende de pelo menos sete proteínas virais e fatores celulares como a DNA polimerase-primase e DNA topoisomerase II (STACY et al., 2003).

Antes da replicação de DNA, o genoma do herpesvírus circulariza-se e replica-se pelo mecanismo de círculo rolante (MADIGAN et al., 2016). Então, longos concatâmeros são formados e processados em DNA genômico que são empacotados em capsídeos pré-formados e clivados em locais específicos para

liberar genomas de comprimento unitário dentro de capsídeos (MCVOY et al., 2000). Assim, a transcrição viral, a replicação de DNA, formação de capsídeo, empacotamento de DNA viral e montagem do vírus ocorrem no núcleo (METTENLEITER, 2009). Tudo isso ocorre na presença de UL9, a proteína de ligação à origem (HAY e RUYECHAN, 2007). A proteína ICP8 (codificada pelo gene UL29), se liga a UL9 ou regiões do DNA, que inicia a separação das fitas de DNA pela helicase. O complexo helicase – primase é formado pelas proteínas UL5, UL8 e UL52, que iniciam a polimerização das cadeias pela polimerase viral (MUYALAERT et al., 2014; WELLER, 2006). Após a amplificação do genoma viral pelo complexo de replicação de DNA viral, os genes virais tardios são expressos a partir do DNA viral replicado (GRUFFAT et al., 2016). O nível de expressão dos genes iniciais é reduzido ou cessado após o início da replicação do genoma, elevando a expressão e síntese das proteínas gama ou tardios. A maioria dos produtos de genes tardios contribuem para a formação da partícula viral, codificando proteínas estruturais nucleares, capsídeo, envelope e para montagem (AUBERT et al. 2001). Os genes tardios são divididos em: gama-1 (*leaky late*) e gama-2 (*true or strict late*) (LIEU e WAGNER, 2000). Os genes gama-1 são expressos antes da replicação de DNA, mas em baixos níveis, atingindo o pico após o início da replicação e os genes gama-2 são ativados somente após no início da replicação do genoma viral, não sendo detectado antes disso (KIBLER et al., 1999). Portanto, são quatro estágios que compoem o ciclo replicativo viral imediato, inicial, replicação de DNA e tardio (CAI e SCHAFFER, 1992).

Assim, após o encapsidação do DNA viral, os nucleocapsídeos formados se movimentam por filamentos de actina nuclear, induzidos durante a infecção, para favorecer o contato dos nucleocapsídeos com a membrana, onde adquirem um envoltório primário a partir da membrana nuclear interna (FRANCO et al., 2012). Este envelope é perdido quando fusionam com membrana nuclear externa, ocorrendo o desenvolvimento, sendo associado a proteínas do tegumento no citoplasma e reenvelopado no complexo de Golgi (METTENLEITER, 2009). Em seguida, através de brotamentos dos vírions para dentro de compartimento no Complexo Golgi, são liberados em vesículas pela via secretória por exocitose das células infectadas (GUO et al., 2010).

A infecção latente ocorre principalmente em neurônios de gânglios sensoriais e órgãos linfóides, caracterizado pela interrupção do ciclo replicativo e permanecendo inativo no núcleo dos neurônios por toda a vida do animal (FRANCO et al., 2012). Animais com a infecção latente podem re-excretar o vírus periodicamente para o ambiente, em episódios de reativação, e transmitir para os animais susceptíveis (PRAVIEUX et al., 2007).

## 2.1 Expressão gênica

Um gene é a unidade de “DNA que contém a informação para especificar a síntese de uma cadeia polipeptídica única ou de RNA funcional” (LODISH et al., 2014). No entanto, o termo "gene" tem sido empregado como a região genômica que produz principalmente mRNA poliadenilado que codifica uma proteína (GINGERAS, 2007).

Assim, os genes carregam informações para formar as moléculas de proteínas e são cópias de RNAs de tais genes codificadores de proteínas que constituem as moléculas de mRNA das células (KIMBLE, 2012). As sequências de nucleotídeos de uma molécula de mRNA contém informações que especificam a ordem correta dos aminoácidos durante a síntese de uma proteína (LODISH et al., 2014). A transcrição é um processo complexo que envolve diversos eventos de regulação (ALBERTS et al., 2010). A ligação de proteínas reguladoras de transcrição específicas podem atuar como ativadoras ou repressoras da transcrição, as quais são denominadas fatores de transcrição, sendo responsáveis pelo controle da expressão de genes durante o desenvolvimento e diferenciação, bem como a resposta das células a estímulos (KIMBLE, 2012). Portanto, durante a regulação da expressão de um gene pode ocorrer regulação negativa (*down-regulated*) em que a proteína ligadora impede a transcrição, resultando em diminuição da expressão de um gene, gerando menos cópias de mRNA e menos proteínas, já na regulação positiva (*up-regulated*) a proteína ligadora promove a transcrição, o aumento da expressão do gene levando a mais cópias de mRNA e conseqüentemente o aumento da proteína correspondente (TIJAN, 2012).

Teoricamente, a regulação em qualquer uma das etapas desse processo pode levar a um diferencial expressão gênica (LODISH et al., 2014). A análise

de expressão gênica fornece uma abordagem importante para o conhecimento das atividades de regulação e metabólicas biológicas dos organismos (CHENG et al., 2014). Assim, a análise da expressão gênica ao nível do mRNA, é um dos componentes-chave da genômica funcional (DING E CANTOR, 2003). Várias técnicas foram desenvolvidos para medir as taxas de expressão de genes, dentre elas, métodos de anotação de gene para descrever sua função (GLASS e GIRVAN, 2014). Portanto, ontologia gênica (GO, *Gene Ontology*), se refere a um conjunto de termos estruturados com foco na descrição do produto do gene (CHENG et al., 2014). Para compreender, as informações que são geradas, a ontologia gênica fornece um conjunto de termos para a descrição dos componentes celulares, funções moleculares e processos biológicos (ASHBURNE ET AL.,2000). Os termos descrevem as funções moleculares que os produtos dos genes normalmente executam, os processos biológicos que estão envolvidos e os locais subcelulares (componentes celulares) onde eles estão localizados (LAEGREID et al., 2003). As associações entre produtos de genes e estes termos são atribuídos por muitos bancos de dados biológicos que fornecem descrições funcionais detalhadas. Assim, único gene pode ser relacionado a vários termos GO, detalhando uma série de atributos funcionais (SMITH et al., 2003).

## 2.2 RNA-seq

RNA-seq é a técnica empregada para a geração de dados partir da novas tecnologias de sequenciamento (*Next-Generation Sequencing*) aplicada à transcriptoma, ou seja, as regiões do DNA transcritas em moléculas de RNAs, para análise de diferencial de expressão gênica (TAN et al., 2015; SOUZA, 2015). A técnica de RNA-Seq pode gerar centenas de milhões de transcritos utilizando o sequenciamento massivo (LI et al., 2004). Em experimentos de RNA-seq, o nível de expressão de um transcrito é estimado a partir do número de leituras (*reads*) que são mapeados na transcrição (YOUNG et al., 2010). O conjunto completo de transcritos em uma célula e a quantidade gerada, estão relacionados a um estágio de desenvolvimento específico ou condição fisiológica (WANG et al., 2009). A análise de RNA-seq envolve o mapeamento dos *reads* para o genoma de referência para inferir quais os transcritos são expressos, e a

cobertura de leitura pode ser utilizada para quantificar o nível de expressão dos transcritos (CONESA et al.,2016). No duplo RNA-seq, são analisados o diferencial de expressão de genes do patógeno e do hospedeiro, ou seja o monitoramento da expressão gênica de dois organismos ao longo do processo de infecção, desde a adesão, ingresso e a resposta do hospedeiro (WESTERMANN et al., 2012).

Dessa forma, foi possível o estudo da expressão do gene, que exige procedimentos de mineração de grandes volumes de dados de RNA-Seq para extrair o conhecimento biológico (LI et al., 2014).

### **2.3 Análise de transcriptoma e *Data mining***

O objetivo da análise de expressão gênica é estimar um transcriptoma, ou seja, o conjunto de todos os transcritos expressos e a frequência na célula em um dado momento (LI et al., 2009). A caracterização de perfis de expressão gênica de tecidos específicos, ou transcriptomas podem estabelecer relações entre transcritos e funções celulares em condições fisiológicas e fisiopatológicas para a compreensão das funções dos genes e a determinação da totalidade dos genes expressos em uma célula, a um pré-requisito para a compreensão de funções celulares (CHEVAL et al., 2002).

Para isso, as ferramentas de bioinformática foram desenvolvida para facilitar e agilizar essas análises, transformando dados em informações. Através das técnicas de exploração de dados, pode-se desenvolver aplicações para obter dos bancos de dados informações para investigação e formação do conhecimento, processos, algoritmos e mecanismos de recuperação de conhecimento potencial do estoques de dados (QUONIAN et al., 2001). O conceito de *gene mining* (mineração de genes) descrito por Li e colaboradores (2004), vem do conceito de *data mining* (mineração de dados), que busca avaliar os genes de relevância e significância para um determinado objetivo e distingui-los de características de ruídos.

Portanto, análise de RNA-seq fornece uma ferramenta para revelar relações entre o nível de expressão do gene e a função biológica das proteínas (CHENG et al., 2014). Assim, com objetivo de compreender a biologia e interação intracelular durante o processo infectivo viral, foi implementado o

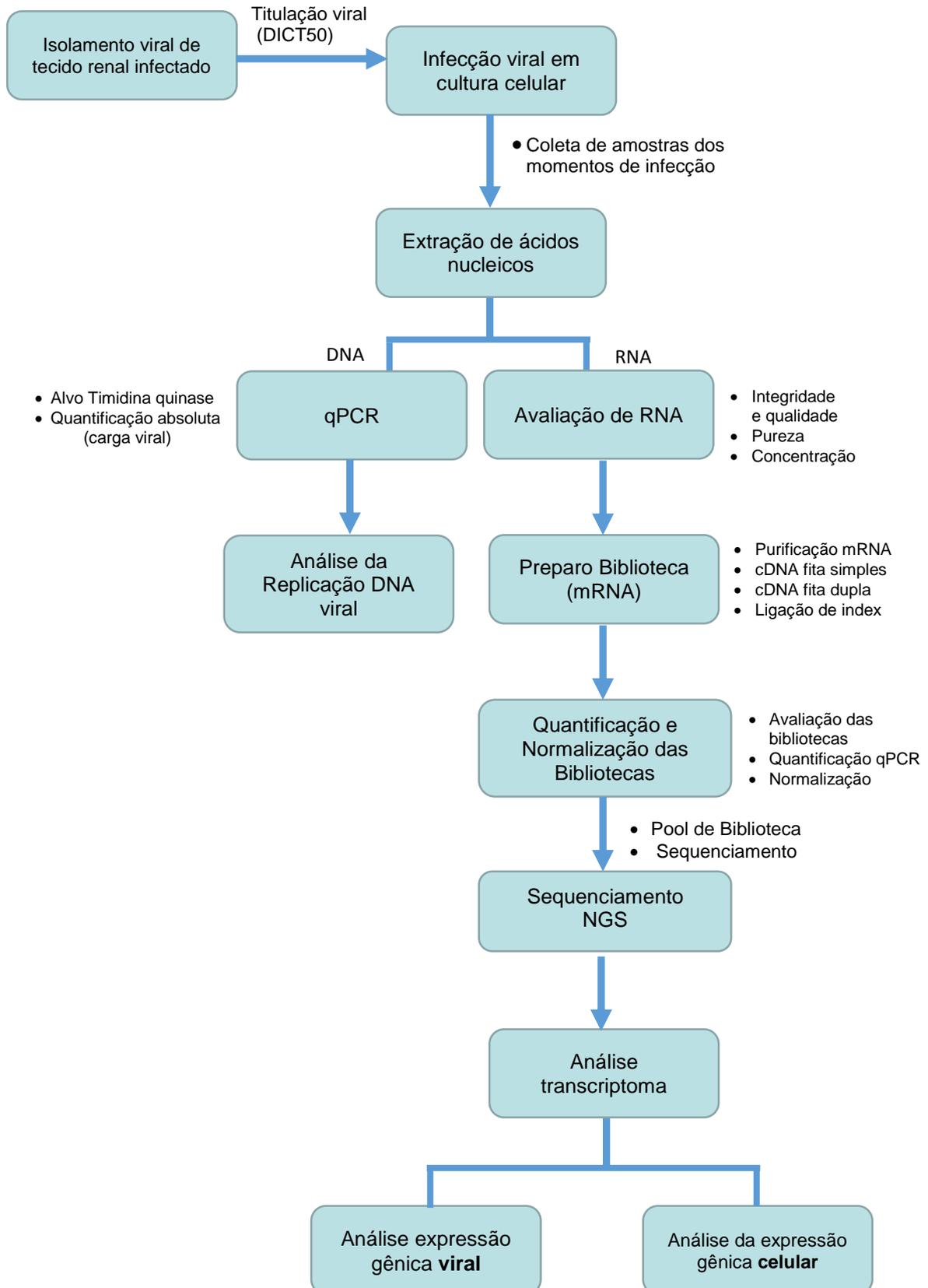
estudo para a análise de expressão dos genes de células infectadas com CaHV-1, através do sequenciamento massivo de mRNA.

### 3. Objetivos

- Analisar a expressão gênica diferencial de células MDCK e viral do CaHV-1 através do *dual* RNAseq durante o curso de infecção *in vitro*.
- Avaliar dos efeitos da expressão viral na expressão gênica celular por ontologia gênica.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1 Fluxograma das etapas da pesquisa



## 4.2 Isolamento Viral

Para o isolamento viral foi utilizado um fragmento de rim coletado de um neonato canino de 21 dias de idade que foi à óbito, da raça *Bulldog* inglês, com histórico de vocalização constante, dor e distensão abdominal, diarreia e episódios de êmese. Assim, o inóculo foi preparado a partir de uma suspensão a 10% (p/v) do fragmento de rim macerado com meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Gibco) suplementado com 100 UI penicilina G procaína, 100 µg/µL de sulfato de estreptomicina e 2,5 µg/mL de anfotericina (Gibco) em seguida microfiltrada em membrana estéril de 0,45 µm. A cultura de células MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) foi utilizada como substrato para a multiplicação viral. Assim, uma garrafa com células MDCK com 100% de confluência foi cultivada e mantidas com o meio de cultivo (DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) para a inoculação. Para adsorção viral, foi aplicado 1mL do inóculo sobre a monocamada celular, e incubada por 1 hora a 34°C sob agitação constante, no agitador orbital. A monocamada de células foi lavada 3 vezes com 3mL de meio de cultura de células. Em seguida, foram adicionados 9 mL do meio de cultura suplementado com 1% de SFB às células infectadas. A cultura de células inoculada foi incubada a 34 °C, em estufa, e o monitoramento dos efeitos citopáticos foi realizado a cada 24 horas, com microscópio óptico invertido.

## 4.3 Cultura de Células e vírus

Para compreender os processos e mecanismos envolvidos na infecção por herpesvírus caninos, foram avaliados o tipo célula permissiva à infecção e concentração viral necessária. Assim, a suspensão viral, obtida do sobrenadante infectado de CaHV-1 da terceira passagem do isolado de tecido renal canino, foi titulado a 5,6DICT<sub>50</sub>. A cultura infectada foi positiva à PCR para o gene da timidina quinase, glicoproteína B e DNA polimerase, seguido de sequenciamento genômico com 99% de identidade com a sequência publicada (KT819633.1). A cultura de célula utilizada para a infecção foi a MDCK (*Madin-Darbin Canine Kidney*). As células MDCK foram cultivadas com meio de cultura DMEM com 10% de soro fetal bovino em placa de 24 poços. As células foram infectadas

após 24 horas, apresentando 90% de confluência da monocamada e aproximadamente  $9,24 \times 10^5$  células /poço.

#### **4.4 Infecção viral**

Para a infecção viral foi aplicado a suspensão viral de CaHV-1 sobre a monocamada celular, em cada poço da placa, a um MOI (multiplicidade de infecção) de 3. O MOI é o número de vírions infectando uma célula (Zwart et al., 2013). Em seguida, a placa com a cultura de célula e o sobrenadante viral foram mantidos à 4°C por 1 hora, para sincronização da infecção, conforme descrito por FLORES e KREUTZ, 2012. Após este período, a monocamada celular foi lavada por 3 vezes consecutivas com solução de PBS pH7,4, estéril. Em seguida, foi adicionado o meio de cultura celular DMEM com 1% de soro fetal bovino e incubada na estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 80% de umidade. Antes de aplicar a solução de lise para extração de RNA total foi realizada aspiração do meio de cultura e lavado a monocamada celular com solução de PBS pH 7,4, para remoção de resíduo de meio de cultura, conforme recomendação do fabricante. Os momentos em que foram realizados as coletas foram: 0h, 1h-pi (pós-inoculação), 2h-pi, 3h-pi, 4h-pi, 8h-pi, 12h-pi, 16h-pi, 20h-pi, 24h-pi, 28h-pi, 32h-pi. Para cada momento de infecção foram realizadas duplicatas para a extração de RNA, uma outra para obtenção de DNA.

#### **4.5 Isolamento e análise de ácidos nucleicos**

Para a extração de RNA foi aplicada 350µL de solução de lise em cada poço, com células infectadas e incubado por 5 minutos. Em seguida, foi coletado a suspensão de células lisadas e procedido a extração de RNA. Para isso, foi utilizado o Total RNA Purification Kit Norgen Biotek Corp. Após a extração de RNA de cada momento, as amostras foram mantidos sob congelamento a -70°C. Para a extração de DNA foi utilizado o Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fischer Scientific Inc.), seguindo as recomendações do fabricante.

As amostras de RNA foram avaliadas quanto a pureza por espectrofotometria, no Nanodrop, concentração por fluorimetria no Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen/ Life Technologies). Quanto a integridade e qualidade foram analisadas no Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), com base no valor de RIN (RNA integrity number – número de integridade de RNA) acima de 8,0.

#### **4.6 Preparo de biblioteca para sequenciamento**

As bibliotecas das amostras para sequenciamento foram preparadas utilizando-se o Kit SureSelect Strand-specific RNA Library Prep for Illumina® Multiplexed Sequencing mRNA library (Agilent Technologies), seguindo as recomendações do fabricante. Para isso foram selecionadas as amostras em duplicatas do momento 0h, 1h-pós inoculação (pi), 4h-pi, 16h-pi, 20h-pi, 24h-pi, 28h-pi e 32-pi. A quantificação das bibliotecas das amostras foram realizadas com base na curva padrão absoluta da reação de qPCR utilizando-se o Kapa Library Quantification Kit Illumina® platforms (Kapa Biosystem), seguindo as recomendações do fabricante. A reação de amplificação dos fragmentos das bibliotecas foram realizadas no termociclador 7500 Fast (Applied Biosystem). As bibliotecas foram normalizadas para o preparo do *pool* na concentração de 0,5nM num volume final de 40µL. Foi realizada a análise de eletroforese capilar no Qiaxcel Advanced para DNA da Qiagen, das bibliotecas para avaliar a presença de dímeros e tamanho dos fragmentos. O tamanho dos fragmentos das bibliotecas também foi estimado através do produto da reação de qPCR, por eletroforese em gel de agarose (1,5%) e observados sob a luz ultravioleta, para confirmação e comparação com a eletroforese em capilar.

#### **4.7 Clustering e sequenciamento**

As bibliotecas foram preparadas para sequenciamento utilizando o Kit High output para até 400M cluster – V2 de 75 ciclos da Illumina. O sequenciamento foi realizado na plataforma Illumina Nextseq 500/550 para sequências *single-end* e 75bp.

#### 4.8 Análise da expressão diferencial de genes celulares e virais

Para a análise de expressão de genes virais as sequências obtidas foram analisadas no *software* Geneious 8.1.7 da Biomatters. Os níveis de expressão foram avaliados usando o RPKM (leitura por quilobases de *reads* mapeados por milhão) como método de análise. Essa medida é empregada para corrigir comprimento de transcritos e a cobertura de sequenciamento, os transcritos foram convertidos por quilobases de éxons mapeados em relação ao genoma de referência (CONESA et al., 2016). Assim, o RPKM é um método de quantificação da expressão gênica a partir de dados de sequenciamento de RNA para normalização número de *reads* do sequenciamento e de acordo com o comprimento do gene, baseado no cálculo conforme descrito por MORTAZAVI e colaboradores (2008).

$$\text{RPKM} = \frac{10^9 \times C}{NL}$$

Onde, o valor  $10^9$  resulta da multiplicação de 1 mil pares de bases por 1 milhão de *reads*. As variáveis, **C** representa o total de *reads* do gene analisado, **N** o total de *reads* mapeáveis da biblioteca avaliada e **L** o total da soma das regiões de éxons do gene em pares de base.

#### 4.9 Análise da expressão diferencial de genes celulares

As sequências obtidas foram analisadas no *software* CLC Genomics Workbench 7.0.4 (CLC Bio da Qiagen Company). As sequências foram limpas com limite de índice de qualidade de 0,08 e limite máximo de 2 nucleotídeos ambíguos e fragmento acima 40 bp. Foi utilizada como de referência sequências de RNA mensageiro do genoma canino (*Canis lupus familiaris*) com número de acesso no genbank NC\_006583.3.

Além disso, o *software* CLC Workbench genomic 7.0.4 foi utilizado para executar a análise dos componentes dos genes diferencialmente expressos (GDEs) encontrados em cada biblioteca. As sequências foram analisadas com o *software* RNA-seq na plataforma CLC e mapeados frente aos RNAm do genoma

do organismo *Canis lupus familiaris*. Os valores de RPKM foram submetidos à normalização por quantil (ROBINSON e SMYTH, 2008; NAIR et al., 2013), em seguida transformados em  $\log_2$  para posterior análise estatística. A análise estatística empregada para identificar os transcritos diferencialmente expressos foi o teste de Baggerley (BARGGELY et al., 2003). Na análise de GDEs foi empregado a filtração de dados com valores de Fold Change ( $>3$  e  $<-3$ ), P-value  $\leq 0,05$ , FDR (*False Discovery Rate* – Proporção de falso positivo)  $\leq 0,05$  e valores de RPKM  $\geq 2$ .

Para selecionar os genes expressos diferencialmente (DE) foi utilizado Fold Change (FC) , que é calculada como uma relação de médias dos valores de controle e de amostras comparadas, utilizando-se os níveis de alterações ou pontos de corte, assim os genes são selecionados com limiares superiores e inferiores (DEMBÉLÉ e KASTNER, 2014).

#### **4.10 Análise de enriquecimento funcional baseada em Ontologia Gênica**

A análise de enriquecimento foi realizada para os transcritos diferencialmente expressos. Assim, foram utilizadas ferramentas de acesso *online* à base de dados de genes e ontologia gênica, dentre eles: Gene Ontology Consortium - GOC (acesso <http://www.geneontology.org>); Gorilla - Gene Ontology enRlchment anaLysis and visualiZation tool (acesso <http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/>); QuickGO (acesso: <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>). O aplicativo Gorilla utiliza o valor de P-value como ponto de corte das análises de 0,001. O GOC gera as análises de genes para P-value de 0,05. Portanto, foi utilizadas as duas ferramentas nas análises. Como ferramentas auxiliares foram empregadas, para identificação de genes foi utilizada as bases de genes: NCBI (acesso: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>); Biogrid - Biological General Repository for Interaction Datasets (acesso: <http://thebiogrid.org/>).

#### 4.11 Análise de Expressão de Genes Virais

A análise de expressão viral foi realizada com base nas fases de expressão genes dos herpesvírus durante o período de infecção entre eles: genes imediatos, iniciais e tardios (METTENLEITER ,2002; GUO et al., 2010)

Para os genes imediatos foram reunidos os genes 4 genes: US1, RS1, RL2 e UL54

Para análise de expressão dos genes iniciais foram avaliados os 16 genes: UL12, UL2, UL23, UL3, UL30, UL37, UL4, UL41, UL42, UL5, UL50, UL52, UL8, UL9, US3 e UL3.

Para os genes tardios foram analisados a expressão dos 40 genes:

UL1, UL11, UL13, UL14, UL15, UL16, UL17, UL18, UL19, UL20, UL21, UL22, UL24, UL25, UL26, UL26.5, UL27, UL28, UL31, UL32, UL33, UL34, UL35, UL36, UL38, UL43, UL44, UL45, UL46, UL47, UL48, UL49, UL49A, UL51, UL53, US6, US7, US8, US8A e US9.

Também foram avaliadas as expressões dos 12 genes virais que não se encontram agrupados entre os genes imediatos, iniciais e tardios como: circ, V67, V32, US4, V57, US2, UL55, US10, UL10, UL6, UL7 e UL56.

Os genes **RS1** (posição 101.993 - 97.839 e 120.720 - 124.874), **US1** (posição 103.867 - 104.808 e 118.846 - 117.905), **US10** (posição 104.929 - 105.516 e 117.784 - 117.197) e **V67** (posição 104.929 - 105.516 e 106.392 - 105.84) se repetem no genoma. Assim, considerando as repetições desses genes são totalizados 76 genes codificantes do genoma viral de referência do CaHV-1 (GenBank KT819633.1).

#### 4.12 Análise total dos genes em curso padrão.

Foram analisados a expressão de todos 76 genes codificantes - CDS (*coding DNA sequence* – sequência de DNA codificante). Ao longo período de infecção, em que foi detectado a expressão gênica viral, foram analisados a

relação de aumento de expressão de um momento em relação ao momento posterior, com base no valores de expressão por RPKM.

Para os genes mais e menos expressos durante a infecção foram calculados os valores médios de RPKM dos momentos de infecção analisados. Também foi realizado a análise do nível de expressão dos genes avaliado pela intensidade colorimétrica, pelo *Heatmap* (mapa de calor) realizado no *software R studio vs 1.0.136*.

#### **4.13 PCR em tempo real para avaliação da replicação viral**

Para detecção da replicação do DNA viral foram utilizados como alvos os genes da glicoproteína B e timidina quinase. Para isso, foram coletadas amostras de células infectadas para extração de DNA, para os momentos, 0h, 1h-pi, 4h-pi, 16h-pi, 20h-pi, 24h-pi, 28h-pi e 32h-pi em duplicatas. Para o preparo da reação foi utilizado o *mastermix* qPCR Gotaq SybrGreen (1x) – Promega. A concentração de cada primer foi de 0,1 $\mu$ M, com adição de 3 $\mu$ L de DNA da amostra e água livre de nucleases q.s.p para um volume final de 20 $\mu$ L. A amplificação do gene da timidina quinase ocorreu sob as seguintes condições: 95°C/2min, seguido de 40 ciclos de repetições a 95°C por 15s, 57°C por 10s e 72°C por 30s. Para reação de PCR em tempo real foi utilizado o termociclador 7500 Fast – Applied Biosystem. Para a reação de amplificação DNA de CaHV-1, foi utilizado como controle positivo o sobrenadante células MDCK infectada, como controle negativo um sobrenadante de cultura de células MDCK não infectada, e como controle da reação água livre de nucleases.

#### **4.14 Preparo da Curva Padrão para Quantificação Absoluta**

Foi utilizada como vetor de clonagem, a bactéria modificada de *Escherichia coli* (*E.coli*) cepa JM109. O produto de PCR de 494 pb, do fragmento do gene da timidina quinase, após purificação do gel de agarose a 1,5%, foi quantificado através da comparação com o *Low Mass<sup>TM</sup> Ladder* (Invitrogen<sup>TM</sup>). O produto foi clonado no plasmídeo *pGEM-T Easy Vector* (Promega<sup>®</sup>), conforme recomendações do fabricante. Os DNAs plasmidiais recombinantes foram

extraídos do meio de cultura de propagação com o *kit Wizard® SV Minipreps DNA Purification System* (Promega®), seguindo as recomendações do fabricante.

O DNA plasmidial recombinante a ser utilizado foi quantificado por fluorimetria no *Qubit® - Quantification System* (Invitrogen™), seguindo as recomendações do fabricante, fornecendo a concentração de 35,8 ng/μL. O DNA plasmidial foi mantido sob congelamento a -20°C, até o momento do processamento da reação para a construção da curva padrão absoluta.

A quantificação absoluta produz o número de moléculas de DNA alvo por comparação com padrões de DNA utilizando uma curva de calibração, que é gerada através de padrões diluídos, em série de concentrações, e produz uma relação linear entre C<sub>q</sub> e o logaritmo da quantidade inicial de DNA total (PABINGER et al., 2014). Assim, para realizar a quantificação absoluta, o DNA plasmidial recombinante com a região do gene da TK do CaHV-1, foi diluído serialmente na razão 10 de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-10</sup>, em água livre de nucleases. E então, foram aplicados 3 μL do DNA plasmidial diluído, em duplicatas, na reação de qPCR para TK, conforme descrito anteriormente.

## 5. Resultados e Discussão

O valor de MOI utilizado na infecção (3) apesar de baixo é comum entre os alfa herpesvirus (BAIRD et al., 2014; JONES et al., 2014; OLAH et al., 2015). Kenedy et al. (2015) mencionam que o baixo valor de MOI na infecção pelo VZV é necessária para a transcrição de genes precoces e iniciar a infecção produtiva. Além disso, uma infecção com MOI muito alto pode resultar em morte celular e apoptose, levando a expressão de genes alterados ou a uma baixa quantidade de RNAs extraídos das células infectadas (RAIOL et al., 2014). Na etapa de adsorção, foi realizada a sincronização no início da infecção, conforme descrito por Flores e Kreutz (2012). Em que, na temperatura 4°C ocorre adsorção do vírus na superfície da célula hospedeira, mas não a internalização e penetração. E ao incubar as células à temperatura de 37°C o processo infectivo prossegue com o ingresso do vírus na célula. Dessa forma, todas as células seriam infectadas e os genes expressos ao mesmo momento.

As amostras de RNA total foram avaliadas, quanto a pureza por espectrofotometria, que apresentaram razão 260/280 entre 1,9 a 2,15. Na quantificação por fluorimetria as concentrações foram entre 23ng/μL a 43,1ng/μL. E com relação integridade e qualidade de RNA, os valores de RIN (número de integridade de RNA) das amostras foram de 8,9 a 10,0 demonstrando que as amostras de RNA estavam em condições adequadas para o preparo das bibliotecas, conforme recomendações do fabricante. Na avaliação pela eletroforese capilar não foi observado a presença de dímeros e o tamanho dos fragmentos, tanto em comparação com o peso molecular em gel de agarose, foi de aproximadamente de 350bp.

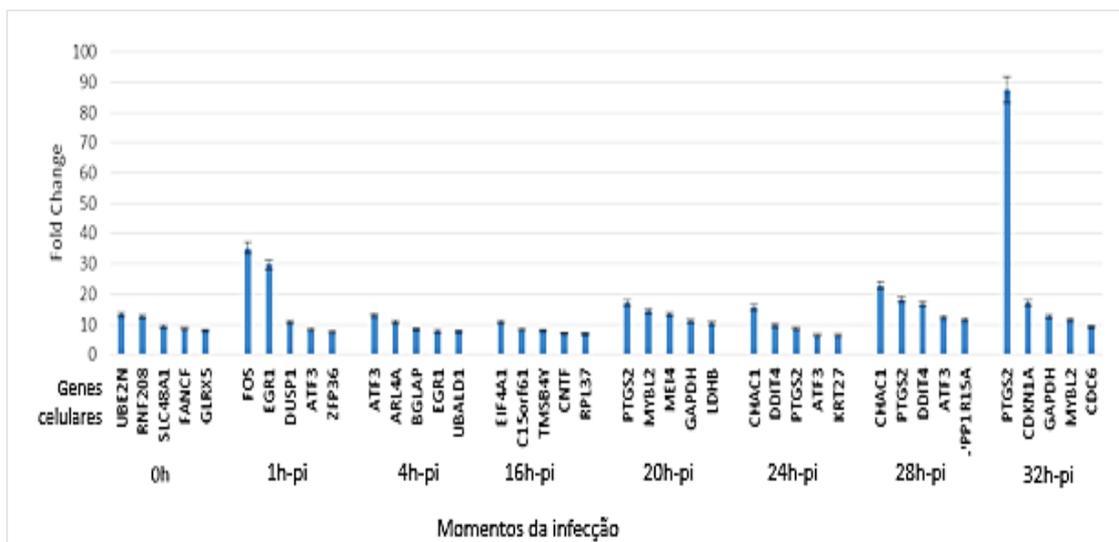
No sequenciamento por RNAseq, foram gerados 164,81 milhões de *reads*, após filtragem e tratamento das sequências, para análise dos genes celulares expressos, analisados pelo software CLC Workbench 7.0.4. Destes, foram analisados frente ao genoma canino, sendo obtidos 124,02 milhões de *reads* mapeados, ou seja, mapeamento de 75,25% dos *reads* gerados. Para análise dos genes virais expressos, pela análise no software Geneious 8.1.7, foram gerados 158,95 milhões de *reads*, após filtragem e tratamento das sequências. Foram analisados frente ao genoma de referência viral, apresentando 404.955 *reads* mapeados, ou seja, do total de genes analisados

apenas 3,92% representam genes virais. Rosani e colaboradores (2015) obtiveram 3,6% de *reads* genes virais na análise de infecção por *Ostreid herpesvirus 1* (OsHV-1) e 81% mapeados frente ao genoma do hospedeiro (*Crassostrea gigas*). Mesmo sendo em menor proporção a expressão gênica viral, foi possível a detecção consistente e a quantificação da expressão. Além disso o genoma viral é menor e possui menos genes (125.171bp com 76 genes codificantes) em relação ao genoma canino (9.290.531bp e 32.220 genes). A média de *reads*/gene viral seria de 5.328,35 enquanto a média *reads*/gene celular seria de 3.849,16, indicando que a cobertura da expressão viral seria 1,38 maior que em relação aos genes celulares.

## 5.1 Análise de expressão dos genes celulares

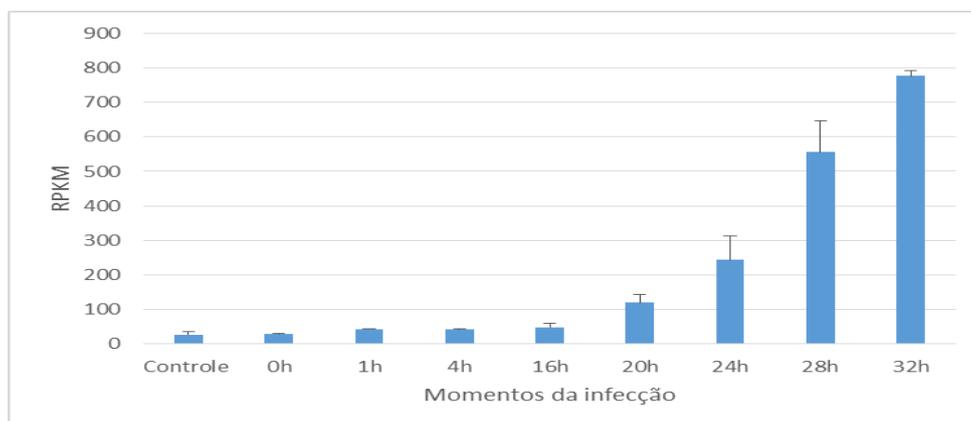
### 5.1.1 Genes celulares regulados mais positivamente

Nos momentos iniciais da infecção viral, foi verificado a maior expressão dos IEGs (*immediate early gene* – genes imediatos) celulares. Os IEGs são expressados de forma rápida e transitória, induzidos nas células por fatores mitogênicos, devido a alterações no estado fisiológico, estresse e patógenos, sem a necessidade de utilizar o processo de síntese de novas proteínas (RHAUS e WOLFF, 2003; PRADO e BEL, 1998;). Portanto, no momento 1h-pi, os genes celulares mais expressos são FOS, EGR-1, DUSP-1 e ATF3, por se tratarem de genes celulares de resposta imediata a estresse e estímulos. Assim, foram observados os processos biológicos dos DGEs regulados positivamente, em tabela 1, em apêndice. Possivelmente em resposta à entrada do vírus na célula. Na **figura 4**, observamos que o pico de expressão dos genes celulares imediatos de maior expressão ocorreu no momento 1h-pi, com exceção do gene ATF3 que foi no momento 4h-pi, além do EGR-1 que continuou sendo expresso nesse momento. No entanto, os cinco genes entram em declínio acentuado nos momentos seguintes, como característica dos genes imediatos celulares. Paulus et al. (2006) também verificaram a expressão dos genes FOS e DUSP-1 ativados pela resposta imediata do hospedeiro, na infecção *in vitro* pelo vírus da pseudorraiva (PRV), um alfa herpesvírus, pela análise de transcriptoma.



**FIGURA 4:** Os cinco genes celulares mais expressos de cada um dos momentos avaliados durante a infecção viral.

Na análise de diferencial de expressão dos genes celulares durante a infecção, o gene PTGS2 apresentou maior expressão com maior valor de Fold Change (87,49) entre os genes regulados positivamente. Na **figura 5**, verifica-se a evolução temporal da expressão do gene PTGS2, durante os momentos da infecção, como crescimento ascendente a partir do momento 16h-pi, atingindo pico em 32h-pi.



**FIGURA 5 -** Evolução temporal de expressão do gene celular PTGS2 durante a infecção viral.

A prostaglandina sintetase 2 (PTGS2), conhecida como Ciclooxigenase-2 (COX2), é responsável pela biossíntese prostaglandinas, sua função está relacionada à inflamação e estímulos mitogênicos (CARVALHO et al., 2004). No entanto, em infecções por herpesvírus tanto *in vitro* como *in vivo* aumentam a

expressão de COX-2 (SHELBY et al.2005). A transcrição de COX-2 nas infecções em vários herpesvírus, tem importância na replicação viral e nas interações entre vírus e hospedeiro (REINOLDS E EQUINIST, 2006; RAY et al.,2004). A figura abaixo apresenta o crescimento da expressão do gene ao longo da infecção, com base no valor de RPKM. A análise de ontologia gênica dos processos biológico de diferencial de expressão gênica regulados positivamente, no momento 28h-pi, constam em **tabela 1**, apresentando a possível associação da atividade do gene PTGS2 na célula. Estudos de inibidores de COX-2 em tratamentos e na inibição da infecção lítica por herpesvírus, têm demonstrado eficiência (PAUL et al., 2013; GEBHARDT et al., 2005). Tendo em vista a disponibilidade de fármacos que inibem seletivamente a via COX-2, seria importante a realização de estudos para avaliar o potencial terapêutico nas infecções por CaHV-1.

**TABELA 1:** Ontologia gênica dos processos biológicos dos genes **regulados negativamente** com base no valor de Fold Change do momento 24h-pi.

<b>Processo Biológico</b>	<b>FE</b>	<b>P-value</b>
Regulação negativa da replicação do genoma viral (GO: 0045071)	39.57	1.67E-03
Via de sinalização de interferon tipo I (GO: 0060337)	37.69	1.25E-04
Resposta de defesa a vírus (GO: 0051607)	19.19	7.91E-05
Resposta ao inte33rferon-gama (GO: 0034341)	16.49	1.52E-02
Desenvolvimento de vasos sanguíneos (GO: 0001568)	7.64	2.01E-02
Regulação da produção de citocinas (GO: 0001817)	7.47	1.65E-03
Regulação da migração celular (GO: 0030334)	6.17	1.06E-02
Estrutura anatômica envolvida na morfogênese (GO: 0048646)	5.28	4.73E-02
Regulação positiva do processo de organismos multicelulares (GO: 0051240)	4.32	3.22E-03

O gene mais expresso em seguida, foi CHAC1 (*Cation transport regulator-like protein 1*- proteína de transporte de cátion semelhante ao regulador 1), no momento 28h-pi. O genes FOS e EGR1 foram mencionados anteriormente. A superexpressão de CHAC1 pode levar ao estresse da via do retículo endoplasmático, sugerindo um papel no estresse oxidativo e apoptose (Crawford et al., 2015). No momento 28h-pi, com base nos genes diferencialmente expressos com regulação positiva, foi observado o processo biológico relacionado à *Reposta ao estresse do retículo endoplasmático* (GO:

0034976, valor de Fold de enriquecimento de 6,45 e P-value de 3.57E-02, conforme apresentado em **tabela 11** em Apêndice, com todos os processos biológicos do momento 28h-pi. Além do processo biológico de *Sinalização apoptótica intrínseca* (GO:0097193) com Fold de enriquecimento de 10,02 e P-value de 6.89E-04, em **tabela 12** em Apêndice, constam os processos relacionados à apoptose do momento 28h-pi. Assim, corroborando com o aumento da expressão do gene e atividade de resposta da célula. Como outros genes que apresentaram elevados valores de Fold Change, o DDIT4, atua em outros processos biológicos como: *Resposta à hipóxia* (GO:0001666) e no sinal de transdução de dano ao DNA (GO:0042770). Assim, células infectadas reconhecem a replicação viral como um estresse causado por dano ao DNA e provocam uma resposta de apoptose como uma resposta imune do hospedeiro (LIANG et al., 2006).

Além disso, fatores induzíveis por hipoxia (HIF) modulam a expressão gênica dos vírus DNA, como os herpesvírus ou que passam por um estágio de DNA, pois contêm elementos responsivos à hipoxia, em seus promotores que aumentam a replicação viral (TOMASKOVA et al., 2011). No entanto, tal evento também pode estar relacionado a elevada expressão de PTGS2, em que durante a inflamação, ocorre a redução nos níveis de oxigênio e ativação da resposta adaptativa relacionada à expressão de fatores induzíveis por hipóxia, através do óxido nítrico (NO) ou monóxido de nitrogênio, pode interferir com a sinalização de hipóxia (CARIA et al., 2014), ou mesmo o vírus utiliza essa via para induzir a essa condição, vide tabela 2 com os processos biológico relacionados à resposta ao NO. Além disso, a hipóxia promove o crescimento dos vasos através da regulação positiva de várias vias pro-angiogênicas (KROCK et al., 2011). Como se verifica também no processo biológico de *Regulação de angiogênese* (GO: 0045765). Portanto, tanto o processo de hipóxia, resposta de dano ao DNA e a apoptose, indicam a ocorrência da replicação viral. Além disso, no momento 28h-pi, foi onde se verificou o pico de replicação viral, pela qPCR do gene da timidina quinase, abordado mais adiante, no item 5.8.

**TABELA 2:** Ontologia gênica dos processos biológicos dos genes regulados positivamente com base no Fold Change, do momento 28h-pi relacionados à NO.

<b>Processo Biológico (GO)</b>	<b>FE</b>	<b>P-value</b>
Resposta à substância tóxica (GO: 0009636)	7,13	1.48E-02
Regulação negativa do ciclo celular (GO: 0045786)	4,80	5.42E-03
Resposta celular ao composto de nitrogênio (GO: 1901699)	4,31	2.06E-02
Resposta celular ao composto contendo oxigênio (GO: 1901701)	4,10	8.09E-05

A maioria das alterações induzidas pelo vírus na expressão gênica celular ocorrem tardiamente na infecção, e os genes afetados pertencem a diversas classes e vias funcionais (RAY et al., 2004). Assim, foi verificado um aumento nos processos biológicos a partir do momento 20h-pi, concorrentemente com a expressão de todos genes virais e o aumento número de transcritos para cada genes, avaliados conforme os valores de RPKM apresentandos na **Tabela 14**, em Apêndice.

### **5.1.2 Genes celulares regulados mais negativamente**

Os genes que apresentaram os maiores valores de diferenciação negativa dos genes, foram encontrados no momento 32h-pi. Dentre eles estão, o TMSB4y com a maior inibição da expressão (FC: -203,52). O TMSB4y é um polipeptídeo envolvido na organização do citoesqueleto, porém está envolvido na proliferação, angiogênese, diferenciação e migração celular (KUMAR e GUPTA, 2011; CAERS et al., 2010, LI et al., 2007). Sua superexpressão foi relacionada a vários tecidos tumorais, à carcinogênese e atividade anti-apoptótica (PALUSSEN et al., 2009; ZHANG et al., 2008). Em seguida, o gene mais inibidos foi o HSPE1 (FC: -173,44). O gene HSPE1 pertence à família HSPs, o quais desempenham um papel central na regulação da apoptose, sua indução aumenta a resistência e citoproteção contra a morte celular (KENNEDY et al., 2014). Assim, a inibição da sua expressão pode favorecer à apoptose celular. E então, o gene EIF4A1 na infecção por HCMV (citomegalovírus humano ou herpesvírus humano tipo 5) foi observado que a sua baixa expressão inibiu a replicação viral (MANLONG et al.2013). Antagônicamente, no momento 16h-pi o EIF4A1, foi o gene com maior expressão positiva. Tal fato demonstra o efeito na

regulação da expressão gênica, pois no momento 16h-pi, como demonstrado mais adiante ocorre grande atividade de transcrição dos genes virais e início da replicação do genoma viral. Portanto, a montagem do complexo EIF4F, tendo como componente EIF4A1, é fundamental na regulação transcricional durante a infecção por herpesvírus (JACKSON et al., 2010). Dessa forma, os herpesvírus atuam nos fatores de regulação positiva e negativa que controlam a eficiência do início da tradução, facilitando a expressão de proteínas virais sob condições de stress celular induzido pela infecção (GLAUSINGER, 2015).

O POLR2K, é considerado um gene importante na maquinaria no processamento de RNA (PANG et al., 2015).

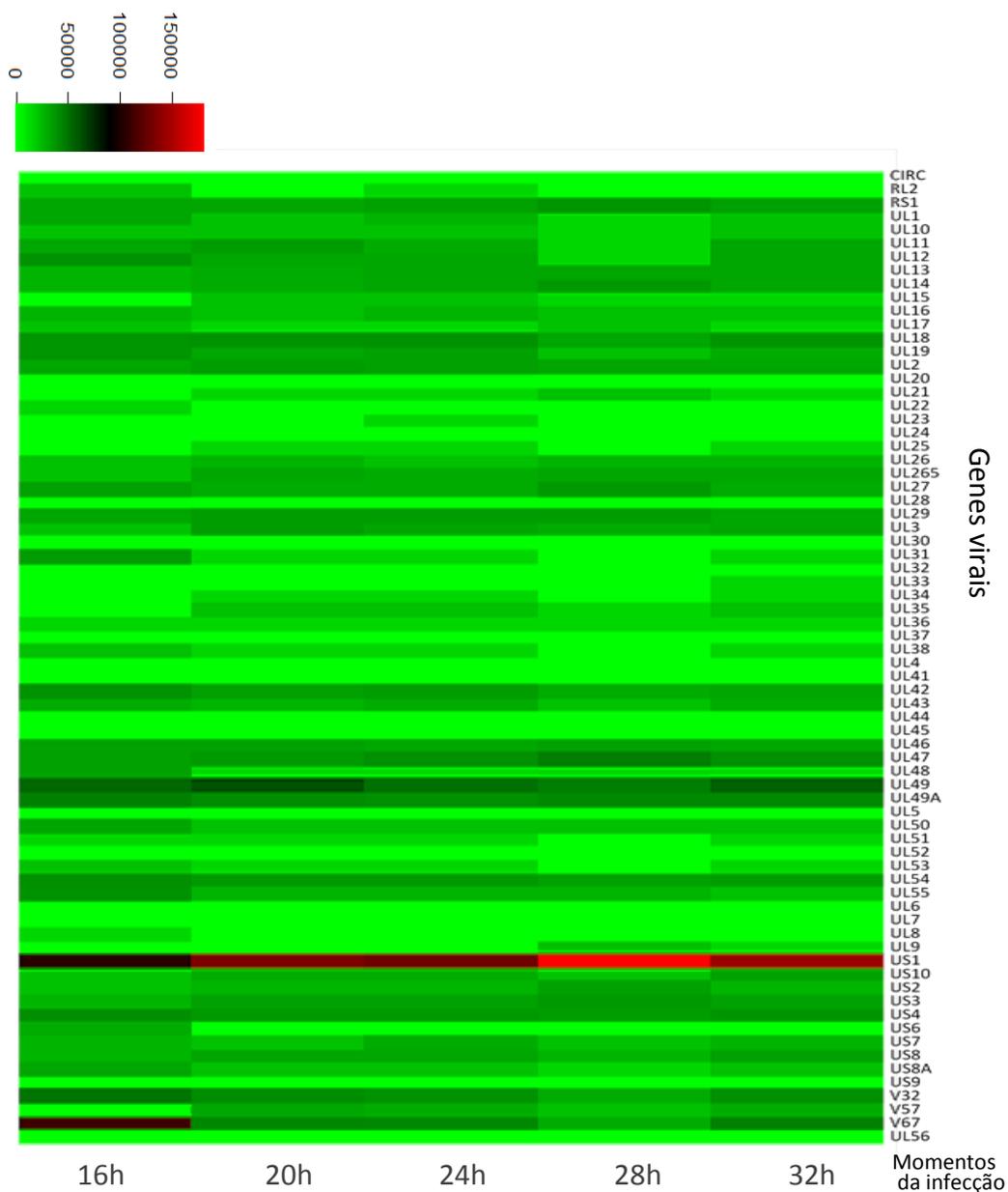
Assim, os genes celulares com maiores inibições, foram observados no momento 32h-pi, dado o curso do ciclo de viral avançado, em que os recursos celulares e virais estariam voltados para montagem e evasão celular.

## 5.2 Análise de expressão dos genes virais

Nos momentos iniciais da infecção 0h e 1h-pi não foram detectados a expressão de genes virais. Somente a partir do momento 4h-pi foi detectada a expressão do gene RS1, apresentando valor de RPKM=1.136,36. Os outros genes foram expressos a partir do momento 16h-pi, mas somente no momento 20h-pi todos os genes virais foram expressos, como observados na **Tabela 14**, em Apêndice. Para visualizar o perfil geral dos genes virais expressos foi realizado o *heatmap*, baseado no valor de RPKM representando os níveis de expressão dos genes relacionados a intensidade colorimétrica, nos momentos da infecção. Portanto, quanto mais expresso o gene maior é a intensidade colorimétrica, conforme demonstrado na **figura 6**. Com base na média de RPKM durante a infecção, os genes virais com maior expressão foram os genes US1 (RPKM=135.103,8), UL49 (RPKM= 65.803,2), V67 (RPKM=43.481,2), UL49A (RPKM= 34.404,4) e V32 (RPKM= 29.253,6), conforme apresentado na **figura 18** (Apêndice).

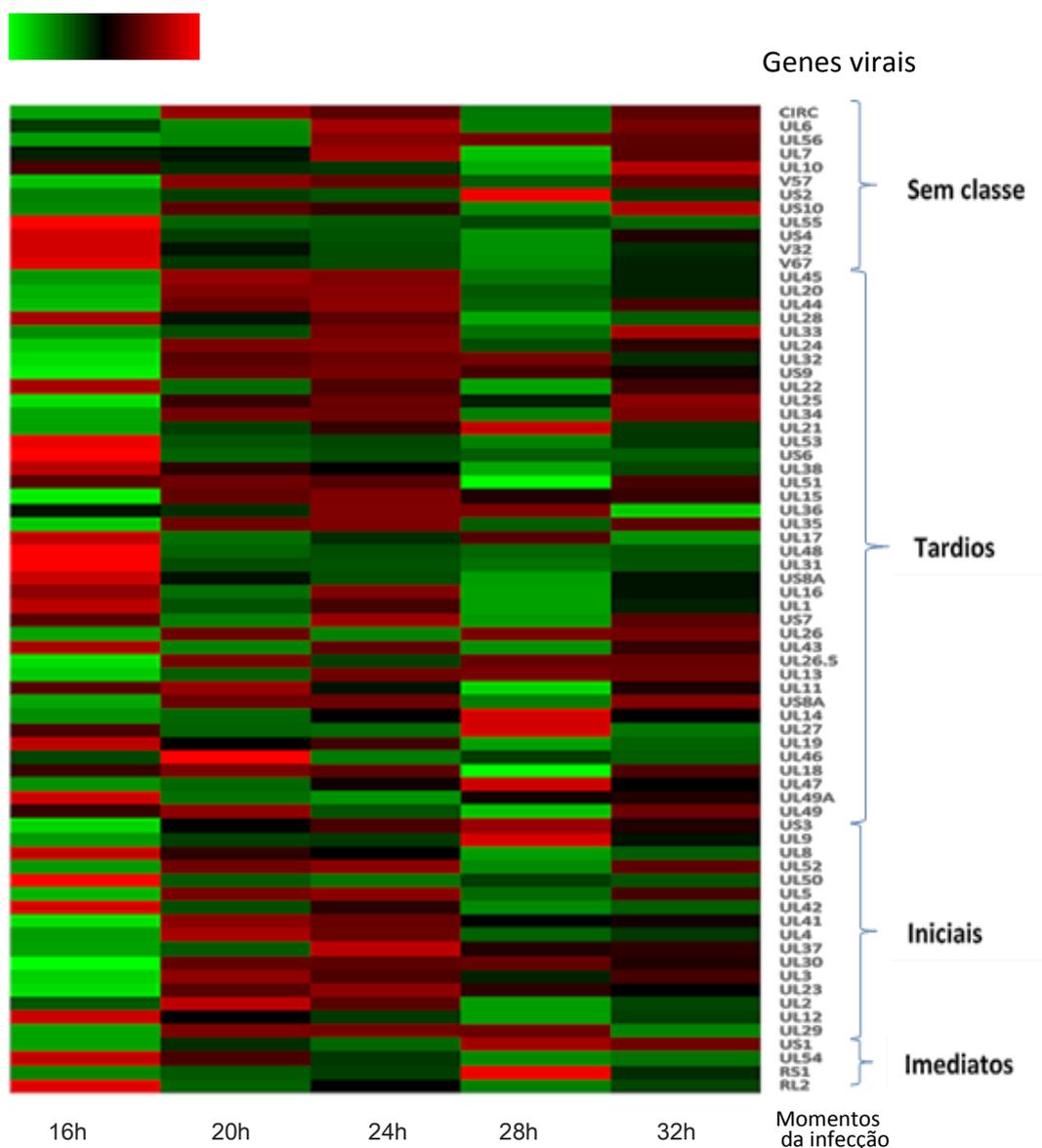
O gene US1 foi o gene viral mais expresso durante a infecção. Trata-se de um gene de expressão imediata, que codifica a ICP22, uma proteína multifuncional que atua na regulação da transcrição viral e celular (RICE e DAVIDO, 2013; TAKÁCS et al., 2013). Na análise de transcriptoma na infecção

*in vitro* pelo vírus da pseudorraiva suína (PRV) ou herpesvírus suino tipo 1 (SuHV-1), Oláh e colaboradores (2015), também encontraram o gene US1 como um dos mais expressos, em que foi obtido o valor de expressão por RPKM de  $2,32 \times 10^5$ , enquanto no presente estudo foi verificado  $1,35 \times 10^5$ . Assim, na figura 6, o gene US1, apresentou a intensidade colorimétrica progressiva em vermelho, de acordo com a evolução temporal da infecção viral.



**FIGURA 6:** Heatmap dos genes que apresentaram as maiores expressões durante a infecção. Barra de escala colorimétrica em RPKM do verde (menor expressão) para vermelho (para maior expressão).

Pela análise do *Heatmap* da **figura7** verifica-se que RS1 e US1, apesar de serem genes imediatos, alcançaram picos de expressão no momento 28h-pi RPKM=21.525,3 e 179.013,8, respectivamente. Diferentemente dos genes UL54 e RL2, que apresentaram as maiores expressões no momento 16h-pi, RPKM= 5702,1 e 27031, 4, respectivamente, e reduziram nos momento seguintes.



**FIGURA 7:** *Heatmap* dos genes demonstrando em quais momentos cada gene apresentou suas maiores expressões, agrupados pela fases de infecção. Barra de escala colorimétrica em RPKM do verde (menor expressão) para vermelho (para maior expressão).

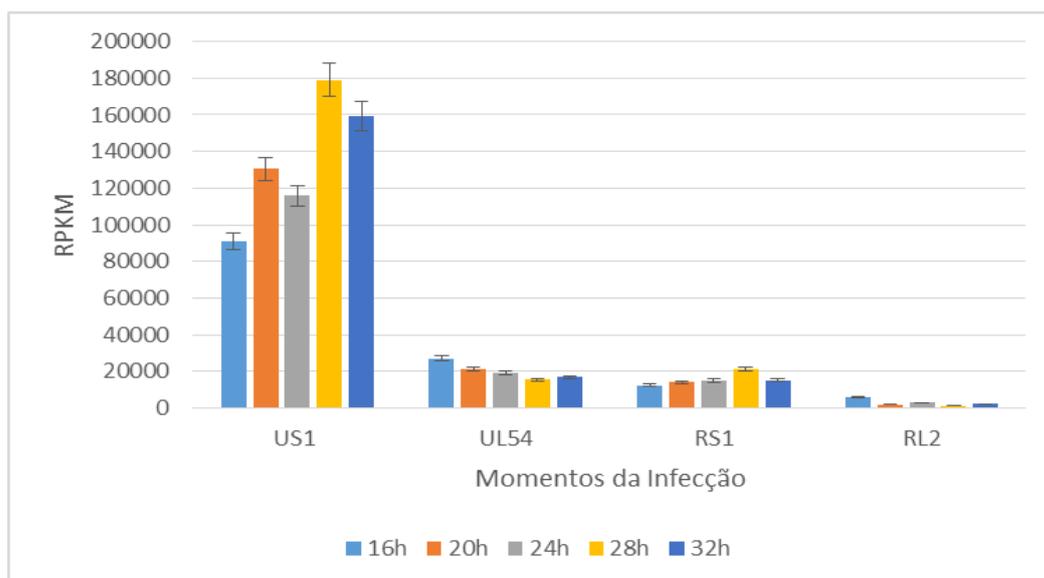
Entre os genes iniciais 3 dos 16, apresentaram as maiores expressões em 16h-pi, grande parte foram mais expresso entre 20h-pi e 24h-pi. Com relação aos genes tardios, observa-se uma distribuição da elevação da expressão dos genes em cada momentos, porém foi observado um maior número de genes que apresentaram elevações na expressão (24 genes), no momento 24h-pi, juntamente com os genes iniciais. Além disso, houve somente 6 genes tardios com pico de expressão no momento 28h-pi, porém verificou-se 12 no momento 16-pi. Em relação aos genes sem classe, ou seja que não pertencem ao grupo de genes relacionados à fases de infecção, foi observado que apresentaram genes com maior expressão no momento 16h-pi (4 os 12 genes). Dessa forma, ficou evidente que na infecção pelo CaHV-1 *in vitro* não ocorre a sincronização e ordem de indução gênica da expressão dos genes no curso temporal da infecção.

No momento 16h-pi, dos 13, 3 milhões de transcritos analisados, foram mapeados 869 *reads* contra a sequência de referencia CaHV-1. Destes, foram encontradas a expressão de 56 genes (codificantes) dentre as 76 ORFs (Open Reading Frame) do genoma do CaHV-1. Dentre eles, a expressão de genes imediatos, iniciais e tardios (com exceção de alguns genes tardios que ainda não haviam sido expressos, conforme apresentado na **Tabela 14**). No momento 20h-pi dos  $2,3 \times 10^7$  de *reads* foram mapeados 63.969 e identificado as expressões gênicas dos 76 genes codificantes do genoma do CaHV-1. Nos momento seguintes os 76 genes continuaram mantendo a expressão.

### 5.3 Avaliação da expressão de genes virais imediatos

Os genes virais imediatos são expressos logo no início da infecção e são definidos como capazes de serem transcritos na ausência de síntese de proteína viral (UNAG e HANSON, 1998). Além disso, os genes imediatos podem contribuir para ativação dos genes virais iniciais e tardios (KIBLER et al., 1991; GELMAN e SILVERSTAIN, 1985). Assim, observou-se que todos os genes imediatos mantiveram a expressão dos genes ao longo do período de infecção, como apresentado na **figura 8**. Os genes US1 e UL54 apresentaram as maiores expressões gênicas, enquanto RS1 e RL2 apresentaram menores expressões. Tal fato pode ser devido às proteínas ICP22 (US1) e ICP27(UL54) serem

relevantes na expressão dos genes tardios enquanto os genes RS1 (ICP4) e RL2 (ICP0) desempenham papéis críticos após o início da transcrição dos genes imediatos (ROIZMAN et al., 2005). No entanto, a ICP0 e ICP4, também podem transativar a expressão do gene da timidina kinase, um gene tardio verdadeiro, ou seja, que eleva sua expressão somente após a replicação do DNA viral (KIBLER et al., 1991; GELMAN e SILVERSTEIN, 1985). Entretanto, todos os genes imediatos permaneceram sendo expressos durante toda a infecção.



**FIGURA 8:** Genes virais imediatos expressos durante a infecção entre os momentos 16h-pi e 32h-pi

O primeiro gene expresso foi o RS1 no momento 4h-pi, com valor de médio RPKM de 1.136,36. Esse momento de “eclipse” até o início da expressão dos genes virais, possivelmente seja em decorrência da atuação de proteínas do tegumento, como VP16, e indução de genes celulares. Após a fusão do envelope viral com a membrana celular, as proteínas de tegumento são imediatamente envolvidas em atividades infectivas do vírus, como inibição da síntese de proteína celular e indução de transcrição do genoma no núcleo (VAN LEEUWEN et al., 2002). O gene RS1 codifica a proteína ICP4 (*Infected-Cell Protein 4*), que é a principal ativadora da transcrição de genes de expressão viral durante a infecção produtiva (SMITH et al., 1993; ZU et al., 1995; XIAO et al., 1997). Além disso, a ICP4, regula negativamente a síntese de DNA da célula, no início da infecção (HAY e RUYECHAN, 2007). Segundo Miyoshi e colaboradores (2002),

verificaram que o gene codificante da ICP4 foi expresso nas fases imediata, inicial e tardia da infecção produtiva, em cultura infectada, como observado em nossas análises e demonstrado na **figura 8**.

Na ontologia gênica dos processos biológicos dos genes regulados positivamente, do momento 4h-pi, foi observado o processo relacionado à *Regulação negativa de resposta à estímulos*, com Fold de Enriquecimento de 4,0 e P-value de 1.76E-4 com envolvimento dos seguintes genes: EGR1, FGF2, PPP1R15A, ATF3, MNT e KLF4.

YAO et al, 2012 verificaram em seu experimento que o aumento da expressão EGR-1 elevou a replicação viral, através a ativação do promotor de ICP4. Assim, no momento 1h-pi verificou-se que o gene EGR-1 apresentou pico expressão, como observado anteriormente na **figura 4**. Por se tratar de um gene de expressão imediata celular, nos primeiros momento de estímulo (1h-pi e 4h-pi) o gene é altamente expresso em seguida entra em declínio.

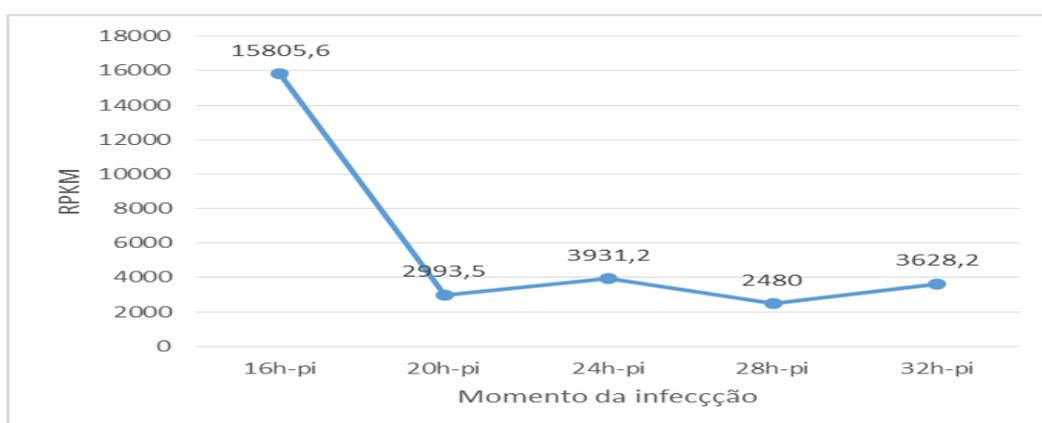
A proteína ICP27 é predominantemente nuclear nos momentos iniciais da infecção, e está associada a splicing de proteínas complexas inibindo processamento de células hospedeiras (TUNICLIFFE et al., 2015). Após 5-6 horas a infecção, a ICP27 inicia o transporte ativo de mRNA viral entre o núcleo e citoplasma, além de interagir com fatores de início da tradução celular com proteínas de replicação de DNA viral (TUNNICLIFFE et al., 2015; LARRALD et al., 2003). A proteína ICP27 regula negativamente a expressão de todos os genes imediatos e regula positivamente a expressão de genes tardios e iniciais (SU et al., 1989).

O gene US1, foi o gene que apresentou os maiores níveis de expressão tanto entre os imediatos quanto no total de genes. O gene US1, codifica ICP22, uma proteína imediata, que medeia alterações do sistema nuclear da célula entre eles a transcrição de RNAPolimerase II, a regulação do ciclo celular, atua como um repressor geral de um subconjunto de promotores celulares e virais em sistemas de expressão transitórios (GUO et al., 2012). Assim, a ICP22 pode atuar na regulação dos genes iniciais e aumentar a transcrição dos genes tardios (TAKÁC et al., 2013). Além disso, ICP22 interage com reguladores de saída nuclear e envelopamento primário, em células infectadas (MARUZU et al., 2014). Por isso, o gene US1 foi expresso ao longo da infecção, mesmo sendo

considerado um gene imediato, chegando a apresentar as maiores expressões nos momentos 28h-pi e 32h-pi.

O gene RL2, foi o que apresentou os menores valores de expressão do gene em relação aos outros genes imediatos, decrescendo após o período 16h-pi, no entanto manteve a expressão durante a infecção. O gene RL2 codifica a proteína ICP0 que é necessária para o início eficiente da infecção viral lítica, é um regulador multifuncional da expressão gênica que interage com proteínas virais e celulares (NAGEL et al., 2011).

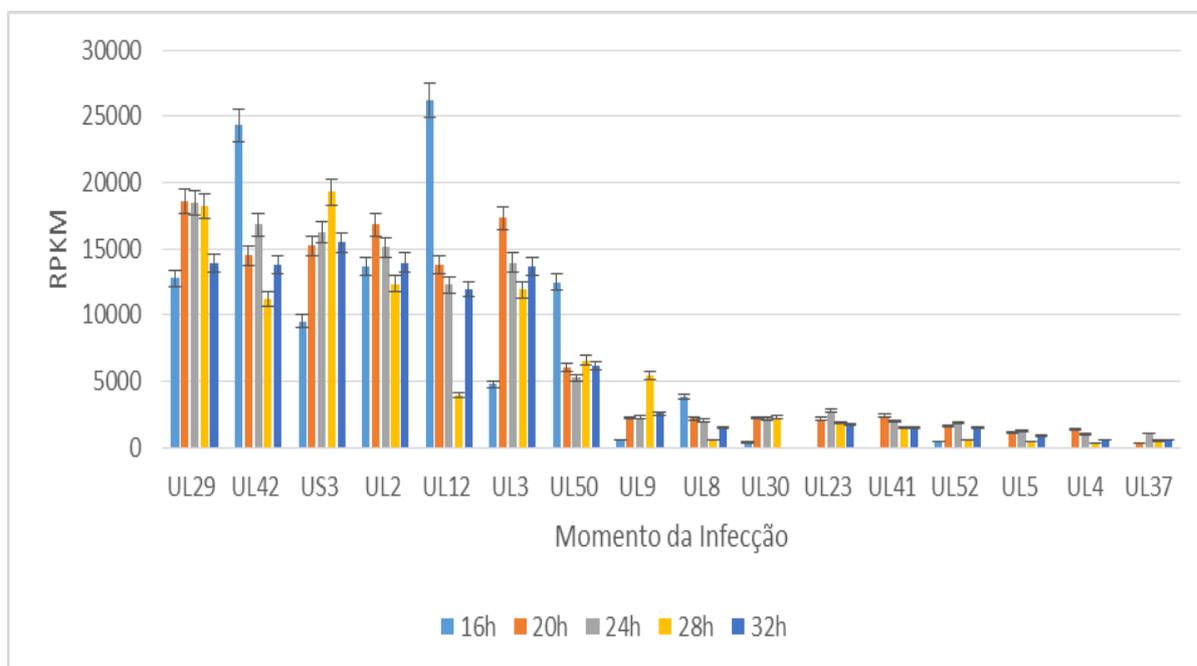
A proteína VP16, é codificada pelo gene UL48, é conhecido como um transativador da expressão de genes imediatos (GRUFFAT et al., 2016; GUO et al., 2012). A VP16 estimula expressão de gene imediatos através da interação direta com o fator de transcrição o celular (CAI e SCHAFFER, 1992). Durante infecção foi avaliado o momento de expressão do gene UL48. Foi observado que o gene UL48 apresentou maior expressão no momento 16h-pi, entrando em declínio nos momentos seguintes, se mantendo em níveis basais, conforme apresentado em **figura 9**. No entanto, o início da expressão do gene UL48, não foi responsável pela expressão do genes imediatos, mas provavelmente a presença da proteína VP16, adquirido pelo tegumento. Tendo em vista que o primeiro gene RS1 (gene imediato), foi verificada a expressão às 4h-pi e a expressão do gene UL48 às 16h-pi.



**FIGURA 9:** Evolução temporal durante a infecção da expressão do gene UL48 durante o período de infecção.

#### 5.4. Expressão de genes virais Iniciais

Os genes virais de expressão inicial foram avaliados quanto a expressão de genes com base no valor de RPKM. Assim, foram verificados que o gene UL29 apresentou a maior média de RPKM entre os momentos avaliados (16h-pi a 32h-pi), seguido dos gene UL42, US3, UL2, UL3, UL12 e UL50. Tais genes foram inseridos na **tabela 3** abaixo, quanto a função e descrição, na qual se verifica que a maioria dos genes possuem atividades para transcrição de DNA, tendo em vista que os produtos dos genes iniciais são necessários para a replicação do genoma viral e subsequente expressão dos genes tardios (GRUFFAT et al., 2016; HUANG e WU, 2004). Entre os sete principais genes envolvidos na replicação dos herpesvírus, estão: UL30, UL42, UL5, UL29, UL52, UL8 e UL9 (WELLER e COEN, 2012; HAY E RUYECHAN, 2007). Desses, foram encontrados 4 com média elevada de RPKM, sendo os genes UL42, UL29, UL9 e UL8, conforme apresentado na **figura 10**. No entanto, mesmo não estando entre os genes com as maiores médias de RPKM, verificou-se que os genes UL52 e UL30, apresentaram um aumento de 3,45 e 5,5 vezes, respectivamente, na expressão dos genes do momento 16h-pi em relação ao momento 20h-pi ( $RPKM_{UL52}$ : 467,7 para 1.615,9 e  $RPKM_{UL30}$ : 404,7 para 2.223,6).



**FIGURA 10:** Expressão dos genes iniciais virais durante o momentos de infecção entre 16h-pi e 32h-pi, com base nos valores de RPKM.

**TABELA 3:** Descrição dos genes iniciais virais expressos.

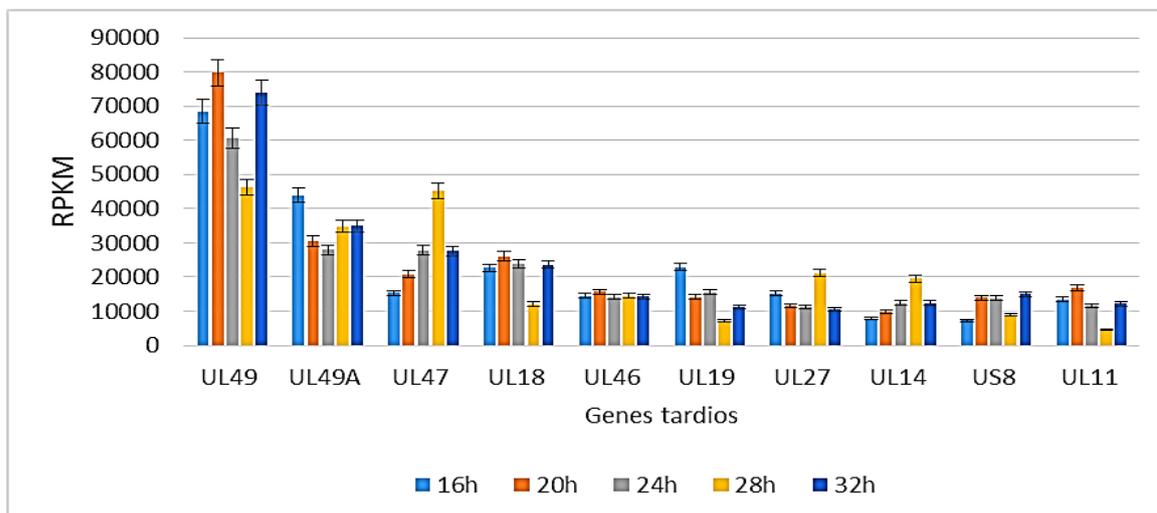
<b>Genes Iniciais</b>	<b>Descrição</b>	<b>Produto</b>	<b>Média RPKM</b>
<b>UL29</b>	Contém um zinc-finger; envolvido na replicação de DNA; possível envolvimento na regulação do gene no códon iniciador 1	Proteína de ligação de DNA fita simples, ICP8	16.373,2
<b>UL42</b>	Proteína ligada ao DNA fita dupla; envolvido na replicação de DNA.	Subunidade de processividade de DNA polimerase	16.127,98
<b>US3</b>	Proteína do tegumento; fosforila a proteína lamina de egresso nuclear; medeia a fosforilação de HDAC1 e HDAC2 e outras proteínas celulares e virais; envolvida na apoptose e saída nuclear; família PK	Proteína serina/treonina quinase US3	15.158,92
<b>UL2</b>	Envolvido no reparo de DNA	DNA uracil glicosilase	14.386,7
<b>UL3</b>	Colocaliza com proteína regulatória ICP22 e proteína ICP22 em corpúsculo nuclear denso e pequeno.	Nuclear proteína UL3	14.226,33
<b>UL12</b>	Envolvido no processamento de DNA	Deoxiribonuclease	13.646,52
<b>UL50</b>	Envolvido com o metabolismo de nucleotídeo	Trifosfato deoxiuridina	7294,4

Na ontologia gênica dos processos biológicos dos genes expressos regulados positivamente, no momento 20h-pi foram observados os processos de *Transcrição viral* (GO: 0019083), com fold de enriquecimento de 9,17 e P-value 6.85E-03 e o processo de *Início transcricional* (GO: 0006413), Fold de Enriquecimento de 8,37 e P-value de 9.97E-04. O gene UL29 que codifica a proteína ICP8, de ligação ao DNA de fita simples, que é necessário para a síntese de DNA viral (UPRICHARD e KNIPE, 2003). Além disso, gene US3 que codifica uma proteína quinase, pode inibir a apoptose na célula infectada (OGG et al., 2001; JEROME et al., 1999).

### 5.5 Expressão de genes virais tardios

Foram verificados a expressão de 40 genes tardios durante a infecção, sendo detectados a partir do momento 16h-pi, com base nos valores de expressão por RPKM. Devido ao número de genes tardios avaliados, foi selecionados os dez genes com maiores valores médio de RPKM, conforme apresentados na **figura 11**. Dessa forma, verificou-se que o gene UL49

apresentou a maior média de expressão nos quatro momentos de infecção, seguido do UL49A, UL47 e UL18. O gene UL46 apresentou uma certa regularidade nos períodos avaliados, em comparação aos demais genes.



**FIGURA 11:** Genes tardios mais expresso a partir do momento 16h-pi com base nos valores médio de RPKM dos genes avaliados.

Com base nos valores de expressão, o gene UL49, apesar de ser considerado um gene tardio, foi verificada sua expressão a partir do momento 16h-pi até as 32h-pi, se mantendo-se elevado e alcançando picos no momento 20h-pi e 32h-pi. A proteína viral 22 (VP22), codificada pelo gene UL49, é uma das proteínas de tegumento mais abundantes, com uma média de 2.000 cópias em cada vírion (MBONG et al., 2012). A fosforilação da proteína VP22 pode ocorrer logo após a síntese dentro de 5 a 7h de infecção, sendo relativamente estável e detectável ainda pelo menos 24h após sua síntese (BARNETT et al., 1992).

O gene UL47, dos alfa herpesvírus codifica uma proteína que é montada no tegumento do vírion, porém sua função ainda não é bem definida (VERHAGEN et al., 2006). O gene UL18 está relacionado a morfogênese do capsídeo viral, no entanto, a inibição na sua expressão pode comprometer a replicação viral *in vitro* (JIN et al., 2014). Todavia, verifica-se que a expressão de genes tardios são voltadas para a codificação e produção proteínas estruturais e consequente montagem e liberação de partículas infecciosas (GRUFFAT et al., 2016). Alguns genes tardios, como os gama 1 ou tardio verdadeiro, possuem

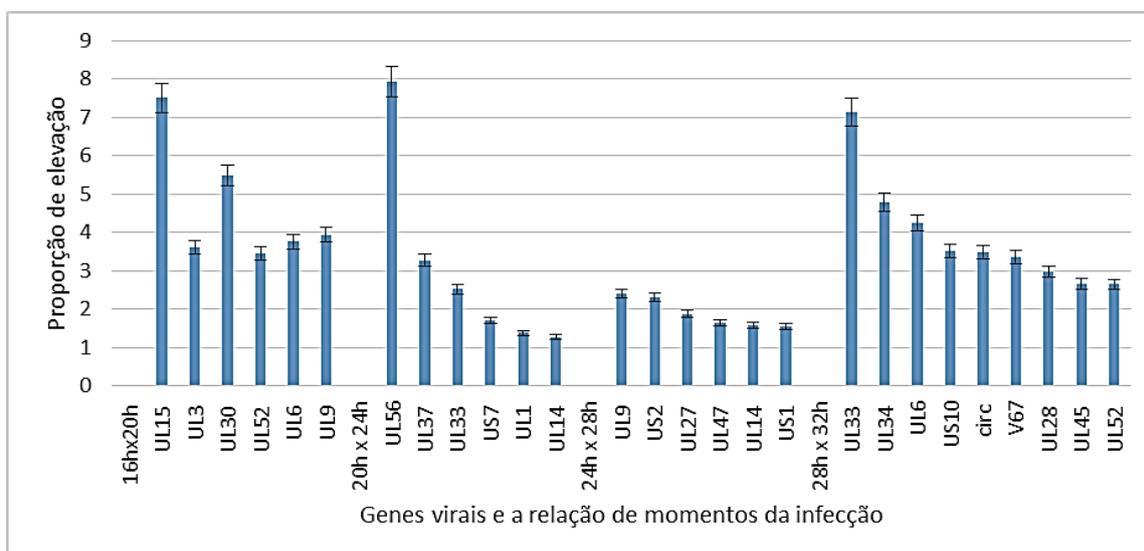
a expressão logo no início da infecção, sendo incrementado com replicação de DNA viral (KIBLER et al., 1991). No entanto, como se verifica na **figura 9**, UL49 e UL19, apresentaram picos de expressões no momento 16h-pi, detectados juntos com os genes imediatos e iniciais.

### **5.6 Análise de expressão de genes virais pela evolução curso padrão da infecção**

Em relação à avaliação do aumento da expressão durante o curso da infecção, verificou-se que os genes que se elevaram nos momentos anteriores foi o UL56, no momento 24h em relação ao momento anterior (20h-pi). Em seguida, os genes UL15 (20h x 16h) , UL9 (24h x 28h) e UL33 (32h x 28h), conforme apresentado na **figura 12**.

Na avaliação de elevação da proporção na expressão em relação ao momento anterior, verificou-se o gene UL15 se elevou 7,51 vezes no momento 20h-pi (RPKM= 4898,5) em relação ao momento anterior 16h-pi (RPKM= 652,4). O gene UL56 se elevou 7,9 vezes a mais no momento 24h (RPKM=1662,4) que no momento 20h-pi (RPKM=209,9) e o gene UL33 que se elevou 7,1 vezes. O maior número de genes que aumentaram a expressão ocorreu do momento 28h-pi para 32h-pi, em que houveram 36 genes que se elevaram pelo menos 1,5 vezes a mais que no momento 28h-pi. No momento 24h-pi em relação ao 28h-pi e 20h em relação a 24h-pi, ambos tiveram 6 genes elevados, em média de 1,89 e 2,5, respectivamente. O gene que apresentou maior aumento de expressão foi UL56, que codifica uma proteína de membrana de tipo II associada a *rafts* lipídicos. A proteína UL56 também pode ser localizada no aparelho de Golgi bem como nas vesículas citoplasmáticas de células infectadas (KOSHIZUKA et al., 2002). Komuro et al, (1989), observaram que o envelope de HSV é derivado do trans Golgi e que alguns componentes virais destinados ao envelope podem ser montados inicialmente na membrana de Golgi, e transformado no envelope viral. Desse modo, há a possibilidade de que o gene viral UL56 e o produto codificado, induzem as células a atividade e processamento de lipídeos. É possível que a incorporação de colesterol durante a montagem do vírus seja relevante, pois microdomínios de *rafts* lipídicos enriquecidos com colesterol têm

tido associados à vários componentes dos alfa herpesvírus, entre elas a proteína de membrana viral UL56 (FAVOREEL et al., 2010).



**FIGURA 12:** Avaliação do aumento da expressão dos genes em relação aos momentos anteriores.

O gene UL15, o segundo gene com expressão elevada, desempenha um papel chave na localização do complexo terminase para compartimentos de replicação de DNA (HIGGS et al., 2008). A UL15 pode atuar na atividade de clivagem de intermediários de replicação de DNAs virais em monômeros. Além disso, UL15 pode se ligar ao capsídeo mediada por interações com UL6 e UL28 (YU E WELLER, 1998). O gene UL6 apresentou elevação no mesmo momento que UL15, no entanto UL28 declinou a regulação da expressão (RPKM=1261,7 para 691,6).

Ainda entre os genes que se elevaram no momento 24h-pi em relação o momento anterior estão os genes UL37, UL1, UL14 e UL33, dos quais com exceção do gene UL37, tratam se de genes tardios relacionados à morfogênese viral, e UL33 relacionado à encapsidação de DNA viral. O gene UL37, mesmo sendo um dos genes iniciais está relacionado à proteína de capsídeo e tegumento interno.

Os genes que aumentaram no momento 28h-pi em relação ao momento 24h-pi foram: UL9, US2, RS1, UL27, UL47, US1. O gene UL9 está relacionado à replicação viral e tanto o gene RS1 como US1 estão envolvidos na regulação de genes.

O gene US2 codifica uma proteína de tegumento que é conservada na maioria dos membros do *Alphaherpesvirinae* e está associado à membranas, além da regulação da atividade enzimática da MAP (proteína ativada por mitogênio) quinase ERK (quinase relacionada com o sinal extracelular) através da ligação direta e sequestro de ERK na face citoplasmática da membrana (KANG et al., 2013). A MAP quinase também pode ser ativada pela serina /treonina quinase (AVRUCH, 2007). E o gene UL27 que codifica a glicoproteína B, está envolvida na fusão viral com a membrana celular após ligação do vírus e entrada na célula (YUHASZ et al., 1993). No entanto, durante a fase produtiva da infecção, a síntese de proteínas virais pode aumentar a capacidade de dobramento do retículo endoplasmático para o seu limite superior. A glicoproteína B (gB) pode manipular a PERK (proteín kinase RNA-like endoplasmatic reticulum kinase – proteína quinase semelhante ao RNA do retículo endoplasmático) por ligação e impedir a fosforilação de EIF2a e a ativação de PERK, permitindo o acúmulo de múltiplas proteínas virais na célula e induzir a autofagia (LEE e SUGDEN, 2009).

Na ontologia gênica dos processos biológicos dos genes com expressão regulada positivamente foi observado o processo relacionado à *Resposta à proteína desdobrada por PERK* (GO: 0036499), com fold de enriquecimento de 54,78 e P-value de 1.11E-02. Tal fato, pode indicar que os genes US2 e UL27 podem estar envolvidos em tal processo, ou em associação ou de forma isolada.

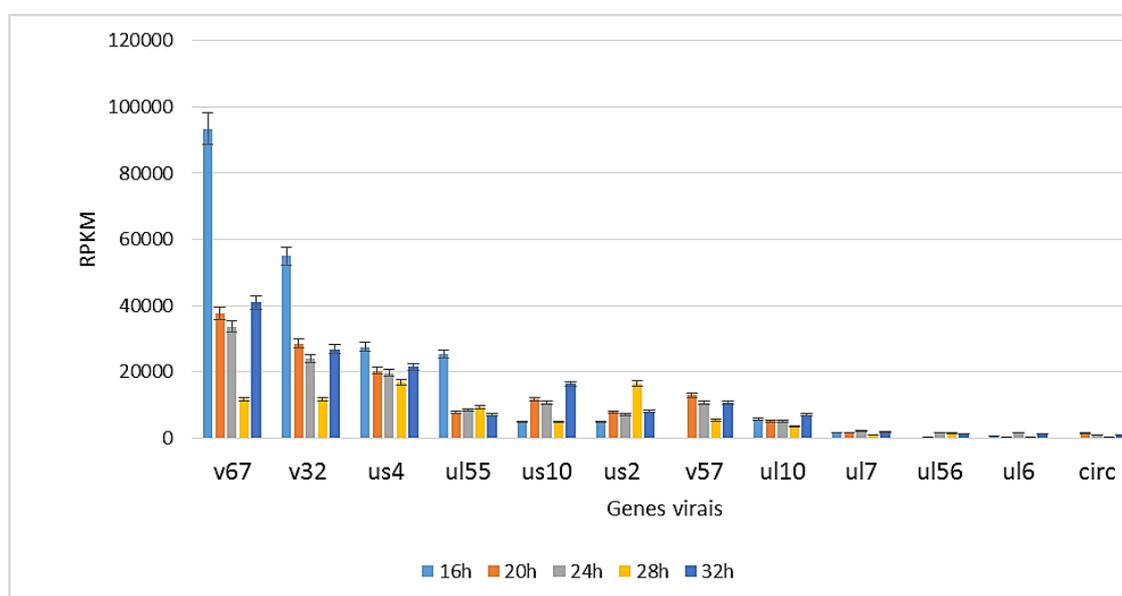
O retículo endoplasmático (ER) está envolvido no dobramento de proteínas, a maturação da proteína, síntese de lípidos e a homeostase do cálcio (MALHOTA e KAUFFMAN, 2007). O mau funcionamento de ER pode ser induzido por vários fatores e levar a uma resposta de proteínas desdobradas (UPR), resultando em estresse do ER (LIU et al., 2013). Assim, a PERK é um dos transdutores que detecta e conduz os sinais de estresse do ER (LIU et al., 2014).

Assim, a resposta de proteína desdobrada (UPR) e a autofagia são duas respostas celulares que afetam a vida ou a morte de uma célula. Alguns herpesvírus podem modificar uma ou ambas destas respostas para suas próprias vantagens durante as infecções produtivas e latentes (LEE e SUGDEN, 2009). No entanto, outros autores afirmam que a autofagia, assim como a apoptose pode ser um mecanismo de defesa celular contra infecções virais a fim de reduzir a replicação e propagação viral (MISZCZAK e CYMERYYS, 2014;

CAVIGNAC e AUDREY, 2010). No entanto, pode se tratar de mecanismos regulatório induzidos por produtos da expressão viral, como se observou durante as etapas de infecção.

### 5.7 Genes virais que não pertencem à classe de genes das fases de infecção por herpesvirus

Análise dos genes que não foram agrupados pela fase da infecção, revelou que os genes que apresentaram as maiores elevações de expressão foram V67, V32, US4, UL55 no momento 16h-pi, US2 e US4 no momento 28h-pi, conforme observados, na **figura 13**.



**FIGURA 13:** Expressão dos genes que não foram agrupados pela fase da infecção, com base na média de RPKM dos momento de infecção.

Os genes V67, V32, UL55 e US10 são preditos em CaHV-1 nos alfaherpesvirus (PAPAGEORGIOU et al., 2016). O gene V67 foi mencionado anteriormente no item\_5.2. O gene ortólogo de V32 em EHV-1 está relacionado a ORF34, cuja função não é bem conhecida, porém é expresso com cinética precoce e seu produto é localizado no citosol de células infectadas (SAID et al., 2014). Os genes US10 é uma proteína de tegumento, porém sua função também não é conhecida, mesmo entre os genes homólogos HSV-1 e PRV (HOGUE et al., 2015). Os homólogos da proteína UL55 são codificados apenas entre alfaherpesvirus HSV-1, VZV, FeHV-1, EHV-1 e 4 (SHELDON et al., 2010;

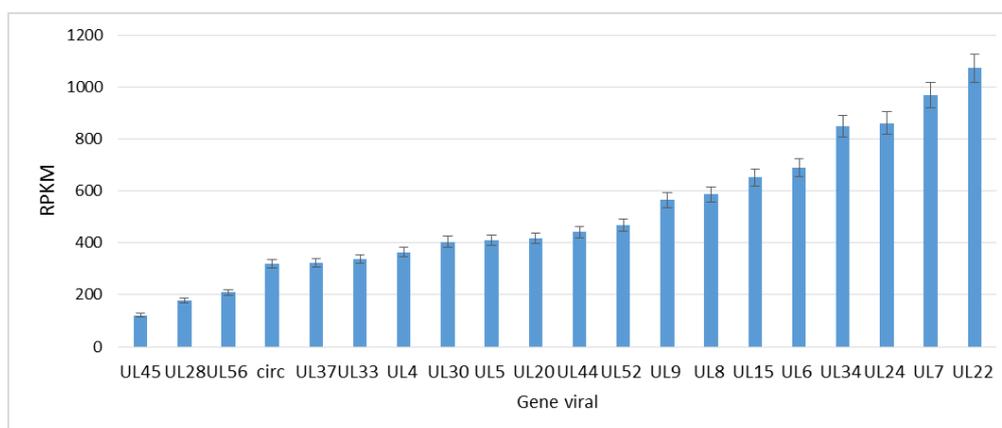
HARTY et al., 1993) . A proteína UL55 foi associada a matriz nuclear em células infectadas, mas não foi detectável em vírions purificados (YAMADA et al., 1998).

A glicoproteína G (gG) é codificada pelo gene US4, comum entre os alfa herpesvírus, sendo encontrada no envelope, mas também foi descrita como uma proteína viral de ligação a quimiocinas (vCKBP) (WAN DER WALLE et al. 2003). A vCKBP é expressa por vírus de grandes DNAs, como herpesvírus (BRYANT et al., 2003). A glicoproteína G (gG) é secretada a partir de células infectadas, que se ligam a uma ampla gama de quimiocinas com alta afinidade, impedindo sua interação com receptores específicos e bloqueando sua atividade (VAN DER WALLE et al, 2009). As quimiocinas são citocinas quimioatrativas que regulam o tráfego e as funções efetoras dos leucócitos, desempenhando um papel importante na defesa do hospedeiro contra microorganismos e na patogênese de doenças inflamatórias (BAGGIOLINI, 1998). Assim, uma das estratégias de evasão imunológica empregadas pelos herpesvírus é o mimetismo molecular das citocinas e seus receptores para interceptar as redes de citocinas que controlam a resposta imune à infecção (ALCAMI e SARAIVA, 2009). Por isso, a atividade e maior expressão da gG ocorre nos momentos iniciais e logo no ingresso celular, como se observa no momento 16h-pi. Considerando-se que se trata de uma proteína estrutural e como observado pode acumular atividade multifuncional.

### **5.8 Genes virais menos expressos**

Os genes com os menores valores médios de RPKM, observados na **figura 14** são em sua maioria tardios envolvidos na codificação de proteínas estruturais e evasão viral. Tal fato justificaria a baixa expressão dos genes, em momentos tardios do ciclo viral, como observado. Dentre eles, a expressão do gene UL45, que foi o menos expresso (RPKM médio= 347, 36), classificado como proteína tardia, cuja expressão depende da síntese de DNA (VISALLI e BRANDT, 1993). Comparando-se com o gene mais expresso, US1 que apresentou valor de expressão por RPKM de  $1,35 \times 10^5$ , foi 388 vezes mais expresso que UL45. A proteína UL45 homóloga no EHV-1 é uma proteína integrada à membrana do tipo II N-glicosilada e tratada no complexo de Golgi. A ausência dessa proteína não compromete a replicação viral, no entanto, reduzir

drasticamente a quantidade de vírus egressos da célula (OETTLER et al., 2001). O gene UL20 (RPKM médio=589,3) é um gene de expressão tardia, cujo produto está envolvido em diferentes etapas de egresso viral, em diferentes compartimentos intracelulares (FUCHS et al., 1997). O gene UL37 (RPKM médio=495,06) é um constituinte de vírions maduros que está envolvido no envelopamento secundário, sendo necessária para a adição correta de outras proteínas de tegumento (KLUPP et a., 2007). O gene UL4 (RPKM médio=646,78) codifica uma proteína associada primariamente ao núcleo, embora certos transcritos UL4 exibam cinética imediata, é acumulada em momentos posteriores na infecção (PEARSON E COHEN, 2002). A ausência dessa proteína pode ser dispensável para replicação lítica que pode resultar em até aumento na quantidade de transcritos dos genes durante a infecção. No entanto, a proteína UL4 confere estabilidade da sequência de DNA. Os genes UL6, UL28, UL32 e UL33 estão relacionados à proteínas de capsídeo e encapsidação de DNA (YU e WELLER, 1992).

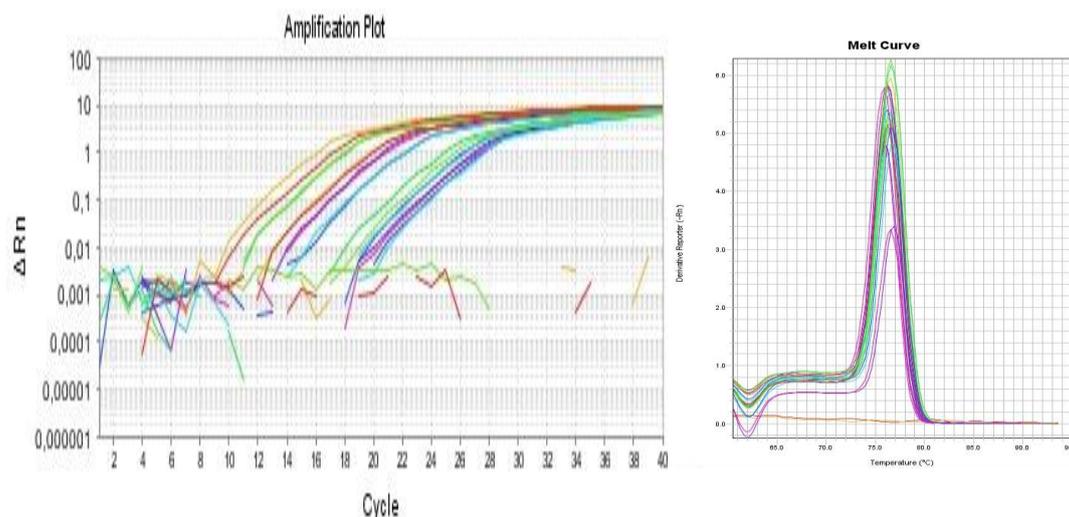


**FIGURA 14:** Genes virais menos expressos, com base no valor médio de RPKM entre os momentos 16h-pi e 32h-pi.

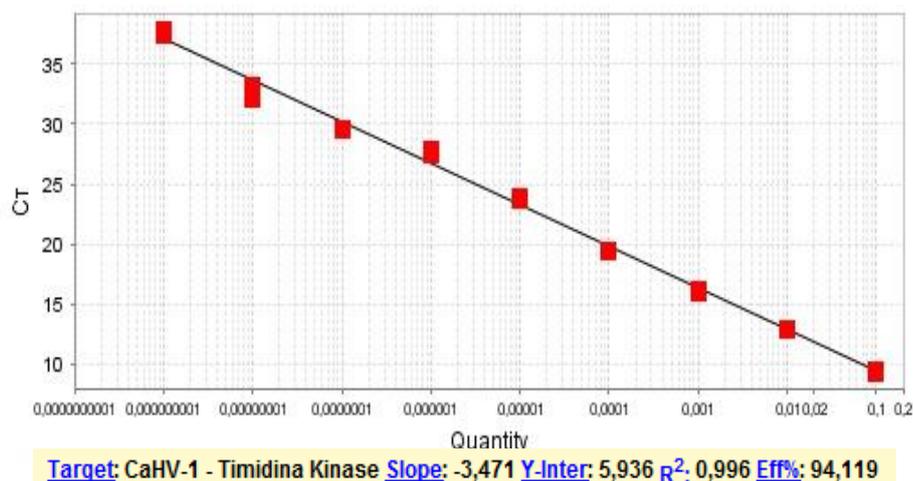
### 5.9 Análise da replicação viral por qPCR intracelular

Foi verificado a replicação de DNA viral na infecção de CaHV-1 em cultura de células MDCK. Isso foi observado através da amplificação de DNA viral com alvo para a região do gene da timidina quinase, durante os momentos da infecção, conforme verificado na **figura 15**. A especificidade do alvos foi avaliada pela temperatura de *melting* e curva de dissociação. Foi observado que houve a formação de picos único na temperatura de *melting* esperada para amplificação

do gene alvo ( $T_{mTK}:75^{\circ}C\pm 1$ ), demonstrando que a reação foi específica. Foi obtida 9 pontos na curva padrão, pela diluição seriada na razão 10, um *slope* de -3,471 e o coeficiente de regressão linear ( $R^2$ ) de 0,996, como observado **na figura 16**. Para avaliar a eficiência da curva padrão, o  $R^2$  deve apresentar valor maior que 0,99 e *slope* próximo de 3.33 (SVEC et al., 2015; LARIONOV et al., 2005).



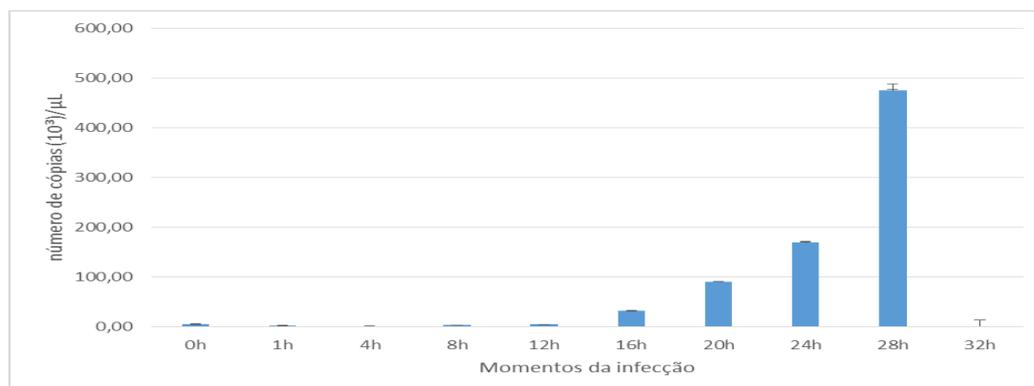
**FIGURA 16:** Reação de amplificação dos genes da timidina quinase (TK) pela qPCR em amostras de DNA de cultura infectada. Curva de amplificação dos alvos da timidina quinase (à esquerda). Curva da dissociação com temperatura de melting média de  $75^{\circ}C$  (à direita).



**FIGURA 15:** Curva padrão absoluta com 9 pontos de diluição na razão 10 e dados de eficiência com *slope* de -3,471,  $R^2$  de 0,996 e eficiência de 94,119%

A **figura 17** demonstra a quantificação viral em relação a evolução temporal do curso da infecção. Dessa forma, foi realizado a quantificação viral gerada

durante as etapas de infecção, sendo obtido as cargas virais como segue em **tabela 4**.



**FIGURA 17:** Quantificação da carga viral (por número de cópias) intracelular de cultura celular infectada, durante os momentos da infecção.

**TABELA 4:** Momentos a infecção e a quantificação da carga viral relacionados com a fase de infecção.

Momento	Carga viral médio (número de cópias virais/µL)	Fases da infecção
0h	5.190,18	Adsorção DNA viral (inóculo)
1h	2.612,97	Ingresso viral e expressão de genes celulares de reposta imediata
4h	1.657,44	Transcrição de genes imediatos (RS1)
8h	3.667,56	Transcrição genes virais Início da Replicação de DNA
12h	5.340,68	Transcrição genes virais Replicação de DNA
16h	32.032,05	Transcrição parcial dos genes virais (imediato, iniciais e tardios - 57 genes) Replicação de DNA viral
20h	91.046,99	Transcrição de todos genes virais (iniciais, imediatos e tardios -76 genes) Replicação de DNA viral
24h	169.301,92	Replicação de DNA viral Transcrição genes virais (76 genes)
28h	475.064,68	Montagem e egresso viral (ápice da amplificação de DNA viral)
32h	1.182,04	Evasão viral extracelular

Foi observado no curso da evolução temporal da infecção, pelos ciclos de amplificação do alvo da timidina kinase, a ocorrência da replicação de DNA viral, com pico no momento 28h-pi. No momento inicial da infecção (0h) foi detectado DNA viral proveniente do inóculo, constituído de partículas virais infecciosas. No momento seguinte, 1h-pi, verificou-se um decréscimo na quantificação do DNA viral, possivelmente em decorrência do ingresso viral, da resposta celular contra o patógenos e regulação de processos celulares. As células MDCK são competentes em interferon, e a resposta de IFN tipo I é um fator que inibe fortemente a replicação de vírus (SEITZ et al., 2010). O interferon induz a expressão de um amplo espectro de genes, como a proteína quinase de cadeia dupla dependente de RNA (PKR), porém, para estabelecer a infecção produtiva, os vírus desenvolveram mecanismos para superar os efeitos deletérios da PKR (HE, 2006). Assim, no momento 4h-pi, ocorre uma queda mais acentuada no número de cópias de DNA viral, podendo ser em decorrência do favorecimento da transcrição de genes virais e síntese de proteínas, necessárias para o início da replicação de DNA viral, associado ao estresse celular. As células, em resposta ao estresse, interrompem ou reprogramam a síntese de proteínas necessárias para sobreviverem ao estresse, como uma resposta protetora (FINNEN e BANFIELD, 2016). Assim, como se verifica os processos biológicos do momento 4h-pi, em tabela em apêndice.

Ainda no momento 4h-pi, foi detectado o primeiro gene viral RS1, como mencionado anteriormente. Sendo que, para replicação do DNA viral são necessárias sete proteínas de replicação, dentre elas UL9 (proteína de ligação à origem), ICP8 (proteína de ligação a DNA de cadeia simples), UL30 / UL42 (polimerase) e UL5 / UL8 / UL52 (helicase / primase) (WELLER e CHEN, 2012).

Foi verificada a expressão desses genes no momento 16h-pi, com exceção de UL5, que foi detectado no momento seguinte, pela análise de transcriptoma. No momento 32h-pi, houve a redução drástica da carga viral intracelular, possivelmente em decorrência da saída dos vírions extracelularmente. Como se observa nos processos biológicos do genes celulares regulados positivamente, dentre eles: *Proteína direcionada para membrana* (GO: 0006612) e *Transporte mediado por vesícula* (GO: 0016192). Durante o egresso viral da célula, os herpesvírus utilizam a via secretória por

exocitose (HOGUE et al., 2014). Além disso, os herpesvírus manipulam extensivamente as membranas hospedeiras para ter acesso aos espaços extracelulares e se disseminar para outras células (JOHNSON e BAINES, 2011).

## 6. Conclusões

As análises de expressão e diferencial de expressão gênica viral e celular permitiram avaliar a atividade viral e celular durante a infecção em cultura de células.

Na análise dos genes virais foram observadas as expressões dos 76 genes codificantes do genoma viral, sendo estes expressos em sua totalidade no momento 20h-pi.

Durante a expressão dos genes virais imediatos, iniciais e tardios, não se observou o efeito cascata de indução temporal entre estes genes, pois genes tardios foram expressos precocemente com genes imediatos e estes continuaram sua expressão tardiamente.

Foi verificada a atividade multifuncional de vários genes e seus produtos atuando em vários momentos e eventos da infecção, como US1, RL2, US4 e UL27.

Foi possível observar a elevação de PTGS2 (COX-2) na infecção pelo CaHV-1, em concordância com outros herpesvírus, dada sua possível importância terapêutica e farmacológica.

A ontologia gênica celular permitiu associar a expressão de genes virais com os processos celulares durante a infecção.

A quantificação da carga viral pela qPCR permitiu acompanhar a evolução da replicação do DNA viral correlacionando com as etapas da infecção.

## 7. Referências Bibliográficas

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D., WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 5 ed. Porto Alegre: ArtMed, 2010.
- ALCAMI, A.; SARAIVA, M. Chemokine binding proteins encoded by pathogens. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 666, p.167-79, 2009.
- ANGEL, P.; KARIN, M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1072, 129-157, 1991.
- AUBERT, M.; RICE, S.A.; BLAHO, J. Accumulation of herpes simplex virus type 1 early and leaky-late proteins correlates with apoptosis prevention in infected human Hep-2 cells. **Journal of Virology**, v.75, n.2, p. 1013-1030.
- AVRUCH, J. MAP kinase pathways: The first twenty years. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1773, P. 1150–1160,2007.
- BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature**, v.392, p.565–568, 1998
- BARNERTT, B.C. DOLAN, A.; TELFORD, E.A. DAVISON, A.; MCGEOCH, D.J. A novel herpes simplex virus gene (UL49A) encodes a putative membrane protein with counterparts in other herpesviruses. **Journal General Virology**, n.8,p. 2167-2171, 1992.
- BOROZAN, I.; WATT, S. N.; FERRETTI, V. Evaluation of Alignment Algorithms for Discovery and Identification of Pathogens Using RNA-Seq. **Plos One**, v.8, n.10, e76935, 2013.
- BORST, E.M.; WAGNER, K. SODEIK, A.B.B. J. The Essential Human Cytomegalovirus Gene UL52 Is Required for the Cleavage-Packaging of the Viral Genome. **Journal of Virology**, v.82, n.5, p. 2065-2078, 2008.
- BRYANT, N.A., DAVIS-POYNTER, N.; VANDERPLASSCHEN, A.; ALCAMI, A. Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins. **The EMBO Journal**, v.22, n.4, p.833-846, 2003.
- CAERS, J.; HOSE, D.; KUIPERS, I.; BOS,T.; VAN VALCKENBORGH, E.; MENU, E.; DE BRUYNE, E.; GOLDSCHMIDT, H.; VAN CAMP, B.; KLEIN, B.; VANDERKERKEN, K. Thymosin  $\beta$ 4 has tumor suppressive effects and its decreased expression results in poor prognosis and decreased survival in multiple myeloma. *Haematologica*, v. 95, p.163-167; 2010.
- CAI, W.; SCHAFFER, P. Herpes Simplex Virus Type 1 ICP0 Regulates Expression of Immediate-Early, Early, and Late Genes in Productively
- CARRINGTON-LAWRENCE, S. D.; WELLER, S. K. Recruitment of Polymerase to Herpes Simplex Virus Type 1 Replication Foci in Cells Expressing Mutant Primase (UL52) Proteins. **Journal of Virology**, v. 77, n. 7, p. 4237-4247.
- CARVALHO, W.A.; CARVALHO, R.D.S.; RIOS-SANTOS, F.; Analgésicos Inibidores Específicos da Ciclooxigenase-2: Avanços Terapêuticos. **Rev Bras Anestesiol.**, v.54, n.3, p. 448 – 464, 2004.
- CAVIGNAC, Y.; ESCLATINE, Herpesviruses and Autophagy: Catch Me If You Can! **Viruses**, v.2, p.314-333, 2010.

- CHARVAT RA, ZHANG Y, O'CALLAGHAN DJ. Deletion of the UL4 gene sequence of equine herpesvirus 1 precludes the generation of defective interfering particles. **Virus genes**, v.45, n. 2, p. 295-303, 2012.
- CHEUNG TC, HUMPHREYS IR, POTTER KG et al. Evolutionarily divergent herpesviruses modulate T cell activation by targeting the herpesvirus entry mediator cosignaling pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v.102, n.37, p.13218-13223, 2005.
- CLASE, A.C.; LYMAN, M.G.; DEL RIO, T.; RANDALL, J.A.; CALTON, C.M.; ENQUIST, L.W.; BANFIELD, B.W. The pseudorabies virus Us2 protein, a virion tegument component, is prenylated in infected cells. **Journal of Virology**, v.77, n. 22, p. 12285-98, 2003.
- DAHLBOM, M.; JOHNSON, M.; MYLLYS, V. et al. Seroprevalence of canine herpesvirus-1 and *Brucella canis* in Finnish breeding kennels with and without reproductive problems. **Reprod Domest Anim**, v.44, n.1, p.128-31, 2009. .
- DAVIS, D.A.; RINDERKNECHT, A.S.; ZOETEWEIJ, J.P.; AOKI, Y.; READ-CONNOLLY, E.L.; TOSATO, G.; BLAUVELT, A.; YARCHOAN, R. Hypoxia induces lytic replication of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. **Blood**, v. 97, p. 3244-3250, 2001.
- DECARO, N.; AMORISCO, F.; DESARIO, C. et al. Development and validation of a real-time PCR assay for specific and sensitive detection of canid herpesvirus 1. **Journal of Virological Methods**, v. 169, p.176-180, 2010.
- DERAKHSHAN, M.; WILLCOCKS, M.M.; SALAKO, M.A.; KASS, G.E.; CARTER, M.J. Human herpesvirus 1 protein US3 induces an inhibition of mitochondrial electron transport. **J. Gen. Virol.**, v. 87, p. 55-59, 2006.
- DERUELLE, M.J.; FAVOREEL, H.W. Keep it in the subfamily: the conserved alphaherpesvirus US3 protein kinase. **J Gen Virol.**, v. 92, n.11, p.18-30, 2011.
- DING, C.; CANTOR, C.R. A high-throughput gene expression analysis technique using competitive PCR and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight MS. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, n.6, 3059-3064, 2003.
- DRAKE, J. W.; HWANG, C.B.C. On the mutation rate of herpes simplex virus type 1. **Genetics**, v.170, n.2, p.969-970, 104.040410, 2005;
- DUMBÉLÉ, D.; KASTNER, P. Fold change rank ordering statistics: a new method for detecting differentially expressed genes. **BMC Bioinformatics**, v.15, 2014.
- FAVOREEL, H.W.; BROEKE, C. V.D.; DESPLANQUES, A.; DERUELLE, M.; MINNEBRUGGEN, G. V.; NAUWYNCK, H.; GLORIEUX, S.; OPDENBOSCH, N.V.; DE REGGE, N. Alphaherpesvirus use and misuse of cellular actin and cholesterol. **Veterinary Microbiology**, v.143, p. 2-7, 2010.
- FINNEN, R.L.; BANFIELD, B.W. Alphaherpesvirus Subversion of Stress-Induced Translational Arrest. **Viruses**, v.8, n. 81, p. 1-12, 2016.
- FLEISCHMANN, W.R. Jr. Viral Genetics. In: BARON, S. **Medical Microbiology**, 4.ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Cap. 43. (Acesso: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8439/>).
- FLORES, E.F.; KREUTZ, L.C. Multiplicação dos vírus. In: **Virologia Veterinária**, 2.ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2012, p.113-143.

- FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M.; VARELA, A.P. M. Herpesviridae. In: *Virologia Veterinária*, 2.ed. Santa Maria: Editora UFSM, p.505-570, 2012.
- GALOSI, C.M. Canine herpesvirus 1: etiologic agent and disease. **Analecta Veterinaria**, v.27, n.2, 2007.
- GEISS, B.J.; TAVIS, J.E.; METZGER, L.M.; LEIB, D.A.; MORRISON, L.A. Temporal Regulation of Herpes Simplex Virus Type 2 VP22 Expression and Phosphorylation. **Journal of Virology**, v.75, n.22, p.10721-10729, 2001
- GELMAN, I.H.; SILVERSTAEIN, S. Identification of immediate early Genes from herpes simplex virus that transactivate the virus thymidine kinase gene. **Proc. Nati. Acad. Sci. USA**, v. 82, pp. 5265-5269, 1985.
- GLASS, K.; GIRVAN, Annotation Enrichment Analysis: An Alternative Method for Evaluating the Functional Properties of Gene Sets. **Scientific Reports**, n. 4191, p.1-9, 2014.
- GLAUNSINGER, B.A. Modulation of the Translational Landscape During Herpesvirus Infection. **Annual review of virology**, v.2, n. 1, p.311-333. 2015.
- GONG, D.; KIM, Y.H.; XIAO, Y.; DU, Y; XIE, Y.; LEE, K.K.; , FENG, J.; FARHAT, N.; ZHAO, D. ; SHU, S.; DAI, X.; CHANDA, S.K.; RANA, T.M.; KROGAN, N.J.; SUN, R.; WU, T.T. A Herpesvirus Protein Selectively Inhibits Cellular mRNA Nuclear Export. **Cell Host Microbe**, v.20, n.5, p.642-653, 2006.
- GRINDE, B. Herpesviruses: latency and reactivation – viral strategies and host response. **Journal of Oral Microbiology**, v5, p.1-10, 2013.
- GRUFFAT, H.; MARCHIONE, R.; MANET, E. Herpesvirus Late Gene Expression: A Viral-Specific Pre-initiation Complex Key. **Frontiers in Microbiology**, v.7, n. 869, 2016.
- GUO L, WU WJ, LIU LD, WANG LC, ZHANG Y. Herpes Simplex Virus 1 ICP22 Inhibits the Transcription of Viral Gene Promoters by Binding to and Blocking the Recruitment of P-TEFb. **PLOS ONE**, v.7, n.9, 2012.
- GUO, H.; SHEN, S.; WANG, L. et al. Role of tegument proteins in herpesvirus assembly and egress. **Protein & Cell**, v.1, n. 11, p 987–998, 2010.
- HARKNESS, J.M.; KADER, M.; DELUCA, N.A. Transcription of the herpes simplex virus 1 genome during productive and quiescent infection of neuronal and nonneuronal cells. **Journal of Virology**, v.88, n.12, p.6847-6861, JVI.00516-14, 2014.
- HASHIMOTO, A.; KATSUYA H. Pathological Finding in a surviving pup transplacentally infected with canine herpesvirus. **Research Bulletin of Faculty of Agriculture of Gifu University**, v. 49, p.391-399, 1984.
- HAY, J.; RUYECHAN, W.T. Alphaherpesvirus DNA replication. In: Arvin, A.; Campadelli-Fiume, G.; Mocarski, E. et al., editors. **Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis**. Cambridge: Cambridge University Press; 2007.
- HE, B. Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, p. 393–403, 2006.
- HIGGS MR, PRESTON VG, STOW ND. The UL15 protein of herpes simplex virus type 1 is necessary for the localization of the UL28 and UL33 proteins to viral DNA replication centres. **The Journal of General Virology**, v.89, n.7, p.70-79, 2008.

HOGUE, I.B.; BOSSE, J.B.; ENGEL, E.A.; SCHERER, J.; HU, J.- R.; DEL RIO, T.; ENQUIST, L. Fluorescent Protein Approaches in AlphaHerpesvirus Research. **Viruses**, v.7, p. 5933–5961, 2015.

HOGUE, I.B.; BOSSE, J.B.; ENGEL, E.A.; SCHERER, J.; HU, J.- R.; THIBERGE, S.Y.; ENQUIST, L. Cellular Mechanisms of Alpha Herpesvirus Egress: Live Cell Fluorescence Microscopy of Pseudorabies Virus Exocytosis, **Plos Pathogens**, v.10, e1004535, 2014.

HUANG, C. WU, C-Y. Characterization and expression of the pseudorabies virus early gene UL54. **Journal of Virological Methods**, v.119, p. 129-136, 2004.

HUANG, S.; HANSON, L. Temporal Gene Regulation of the Channel Catfish Virus (Ictalurid Herpesvirus 1). **Journal of Virology**. v.72, n.3, p.1910-1917. 1998.

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses, 2016. Disponível em: < <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. Acessado em: 18/11/2016.

JACKSON, R.J.; HELLEN, C.U.; PESTOVA, T.V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v.11, p.113–127, 2010.

JACOBS A.; BRAKEFIELD, X. O.; FRAEFEL, C. HSV-1-Based Vectors for Gene Therapy of Neurological Diseases and Brain Tumors: Part I. HSV-1 Structure, Replication and Pathogenesis. **Neoplasia**, v. 1, n.5, p.387-401, 1999.

JENKINS, F.; HOFFMAN, L.J. Overview of Herpesvirus. Infectious Disease. In **Infectious causes of cancer**, p. 33-49, 2000.

JIN, F.; LI, S.; ZHENG, K.; ZHUO, C.; MA, K.; CHEN, M.; WANG, Z. Silencing Herpes Simplex Virus Type 1 Capsid Protein Encoding Genes by siRNA: A Promising Antiviral Therapeutic Approach, **Journal Plos One**, v.9, e96623, 2014.

JONES, M.; DRY, I. R.; FRAMPTON, D. et al. RNA-seq Analysis of Host and Viral Gene Expression Highlights Interaction between Varicella Zoster Virus and Keratinocyte Differentiation. **PLOS Pathogens**, v. 10, e1003896, 2014

KALEJTA, R. F. Tegument Proteins of Human Cytomegalovirus. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.72, n.2, p. 249–265, 2008.

KANG, M.K.; ROY, B.B.; FINNEN, R.L.; LE SAGE, V.; JOHNSON, S.M.; ZHANG, H.; BANFIELD, B.W. The Us2 gene product of herpes simplex virus 2 is a membrane-associated ubiquitin-interacting protein. **Journal of Virology**, v. 87, n.17, p. 9590- 9630.

KENNEDY, P. G. E.; ROVNAK, J.; BADANI, H. et al. A comparison of herpes simplex virus type 1 and varicella-zoster virus latency and reactivation. **Journal of General Virology**, v. 96, p. 1581–1602, 2015.

KENNEDY, D.; JÄGER, R.; MOSSER, D.D.; SAMALI, A. Regulation of Apoptosis by Heat Shock Proteins. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 66, n. 5, p. 327–338, 2014.

KIBLER, P.K.; DUNCAN, J.; KEITH, B.D.; HUPEL, T.; SMILEY, J.R. Regulation of herpes simplex virus true late gene expression: sequences downstream from the US11 TATA box inhibit expression from an unreplicated template. **Journal of Virology**, v.66, n.12, p. 6749-6760, 1991.

KLINEDINST, D. K.; CHALLBERG, M. D. Helicase-Primase Complex of Herpes Simplex Virus Type 1: a Mutation in the UL52 Subunit Abolishes Primase Activity. **Journal of Virology**, v. 68, n.6, p. 3693-3701, 1994.

KNIPE, D.M. The role of viral and cellular nuclear proteins in herpes simplex virus replication. **Adv Virus Res.**, v.37, p. 85-123, 1989.

KOMAZIN-MEREDITH G, SANTOS WL, FILMAN DJ, HOGLE JM, VERDINE GL, COEN DM. The Positively Charged Surface of Herpes Simplex Virus UL42 Mediates DNA Binding. **The Journal of biological chemistry**. V. 283, n. 10, p. 6454-6161, 2008.

KUMAR, S.; GUPTA, S. Thymosin Beta 4 Prevents Oxidative Stress by Targeting Antioxidant and Anti-Apoptotic Genes in Cardiac Fibroblasts. **Plos One**, v. 6, n. 10, e26912, 2011.

LABIUK, S.L; LOBANOV, V.; LAWMAN, Z.; SNIDER, M.; BABIUK, L.A.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. Bovine herpesvirus-1 US3 protein kinase: critical residues and involvement in the Aposphorylation of VP22. **J Gen Virol.**, v.91, p. 1117-1126, 2010.

LÆGREID, A.; HVIDSTEN,T.R.; MIDELFART,H.; KOMOROWSKI, J.; SANDVIK, A.K. Predicting Gene Ontology Biological Process From Temporal **Gene Expression Patterns**. *Genome Res*, v.13, n.5, p.965-979, 2003.

LAM, Q.; SMIBERT, C. A.; KOOP, K. E.; LAVERY, C.; CAPONE, J. P.; WEINHEIMER, S. P.; SMILEY, J. R. Herpes simplex virus VP16 rescues viral mRNA from destruction by the virion host shutoff function. **The EMBO Journal**, v15, n.10, 2575–2581, 1996

LARIONOV, A; KRAUSE, A.; MILLER, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. **BMC Bioinformatics**, v.6, 62, p.1-16, 2005.

LEDBETTER. E.C. Canine Herpesvirus-1 ocular diseases of mature dogs. **New Zealand Veterinary Journal**. E-pub ahead of print, p.1-9, 2013.

LEE, Y.; LEE, J.; SUGDEN, B. The Unfolded Protein Response and Autophagy: Herpesviruses Rule! **Journal of Virology**, v.86, n. 3, p. 1168-1172, 2009.

LI, J.; HOU J.; SUN, L. et al. From Gigabyte to Kilobyte: A Bioinformatics Protocol for Mining Large RNA-Seq Transcriptomics Data. **Plos One**, v.10, n.4, e0125000, 2014.

LI, X.; RAO, S.; WANG, Y. et al. Gene mining: a novel and powerful ensemble decision approach to hunting for disease genes using microarray expression profiling. **Nucleic Acids Research**, v.32, n.9, p.2685-2694, 2004.

LI, X.; ZHENG, L.; PENG, F.; QI, C.; ZHANG,X.; ZHOU, A.; LIU, Z.; WU, Z. Recombinant thymosin beta 4 can promote full-thickness cutaneous wound healing. **Protein Expression and Purification**, v.56, p. 229–236, 2007.

LIANG, X.; PICKERING, M.T.; CHO, N.H.; CHANG. H.; VOLKERT, M.R.; KOWALIK, T.F.; JUNG, J.U. Deregulation of DNA damage signal transduction by herpesvirus latency-associated M2. **Journal of Virology**, v. 80, n.12, 5862-5874.

LIEU, P. T., WAGNER, E. K. Two Leaky-Late HSV-1 Promoters Differ Significantly in Structural Architecture, **Virology**, v. 272, n.1, p. 191-203, 2000.

- LYMAN, M.G.; RANDALL, J.A.; CALTON, C.M.; BANFIELD, B.W. Localization of ERK/MAP kinase is regulated by the alphaherpesvirus tegument protein Us2. **Journal of Virology**, v.80, n.14, p.7159-7168.
- LODISH, H.; BERK, A.; KAISER, C.A.; KRIEGER, M.; BRETSCHER, T.; PLOEGH, H.; AMON, A. **Biologia celular e molecular**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- MALHOTA, J.D.; KAUFMAN, R. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. **Semin Cell Dev Biol.**, v. 18, n.7, p.16-31, 2007.
- MANNING, A.; BUCHAN, A.; SKINNER, G. R. The immunological relationship between canine herpesvirus and four other herpesviruses. **Journal of General Virology**, v. 69, 1988.
- MARUZURU, Y.; SHINDO, K.; LIU, Z.; OYAMA, M.; KOZUKA-HATA, H.; ARII, J.; KATO, A.; KAWAGUCHI, Y. Role of herpes simplex virus 1 immediate early protein ICP22 in viral nuclear egress. **Journal of Virology**, v.88, n.13, p.7445-7454, 2014.
- MATIS, J.; KÚDELOVÁ, M. Early shutoff of host protein synthesis in cells infected with herpes simplex viruses. **Acta Virol.** v. 45, n.5, p.269-77. 2001.
- MBONG EF, WOODLEY L, DUNKERLEY E, SCHRIMPF JE, MORRISON LA, DUFFY C. Deletion of the Herpes Simplex Virus 1 UL49 Gene Results in mRNA and Protein Translation Defects That Are Complemented by Secondary Mutations in UL41. **Journal of Virology**, v.86, n. 22, p. 12351-12361. 2012.
- MCKINNEY, C.; ZAVADIL, J.; BIANCO, C.; SHIFLETT, L.; BROWN, S.; MOHR, I. Global reprogramming of the cellular translational landscape facilitates cytomegalovirus replication. **Cell Reports**, v.6, v. 1, p. 9-17, 2014.
- METTENLEITER, T.C.; KLUPP, B.G.; GRANZOW, H. Herpesvirus assembly: an update. **Virus Res.**, v.43, n.2, p: 222-234, 2009.
- MISZCZAK, D.; CYMERYYS, J. A game of survival: herpesvirus strategies of autophagy manipulation. **Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej** (Advances in Hygiene and Experimental Medicine), v.68, p. 1406-1414. 2014
- MIYOSHI, M.; OKAZAKI, K.; TAKIGUCHI, M.; KIDA, H.; HASHIMOTO, A. The immediate early gene of canine herpesvirus is transcribed through early and late phases. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.64, n. 7, p. 627-631. 2002.
- MUELLER, S. N.; JONES, C. M.; CHEN, W.; KAWAOKA, Y.; CASTRUCCI, M. R.; HEATH, W. R.; CARBONE, F. R. Antigen-Specific CD8+ T Cells Can detect the Early Expression of Glycoprotein B from Herpes Simplex Virus. **Journal of Virology**, v.77, n. 4, p. 2445–2451.
- MUYLAERT, I.; ZHAO, Z.; PER, E. UL52 Primase Interactions in the Herpes Simplex Virus 1 Helicase-Primase are affected by antiviral compounds and mutations causing drug resistance. **The journal of biological chemistry**, v. 289, n. 47, p. 32583-32592, 2014.
- NAGEL, C-H.; ALBRECHT, N.; HOLM-MILOVIC, K.; MARIYANNA, L.; KEYSEN, B.; ABEL, B.; WESELOH, B.; HOFMANN, T.G.; EIBL, M.; HAUBER, J. Herpes Simplex Virus Immediate-Early Protein ICP0 Is Targeted by SIAH-1 for Proteasomal Degradation. **Journal of Virology**, v.85, n.15, p.7644-7657, 2011.

NAIR, N. UNNIKRISHNAN; SANKARAN, P.G; BALAKRISHNAN, N. Quantile-Based Reliability Analysis, **Statistics for Industry and Technology**, 2013.

NAKABAYASHI, J.; SASAKI, A. The function of temporally ordered viral gene expression in the intracellular replication of herpes simplex virus type 1 (HSV-1). **Journal of Theoretical Biology**, v.261, n.7, p156-164, 2009.

O'CALLAGHAN, D. J.; COLLE, C. F.; FLOWERS, C. C.; SMITH, R. H., et al. Identification and Initial Characterization of the IR6 Protein of Equine Herpesvirus 1. **Journal of Virology**, v. 68, n. 9, p. 5351-5364, 1994.

OLÁH, P.; TOMBÁ CZ, D.; PÓKA, N. et al. Characterization of pseudorabies virus transcriptome by Illumina sequencing. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 130, p.2-9, 2015.

OSTERRIEDER, N., NEUBAUER, A., BRANDMÜLLER, C., et al. The Equine Herpesvirus 1 IR6 Protein That Colocalizes with Nuclear Lamins Is Involved in Nucleocapsid Egress and Migrates from Cell to Cell Independently of Virus Infection. **Journal of Virology**, v.72, n. 12, p. 9806–9817, 1998.

OSTERRIEDER, N.; HOLDEN, R.; BRANDMÜLLER, C.; et al. The Equine Herpesvirus 1 IR6 Protein Is Nonessential for Virus Growth in Vitro and Modified by Serial Virus Passage in Cell Culture. **Journal of Virology**, v. 217, n. 0138, p. 442-451, 1996.

PABINGER, S.; RÖDIGER, S.; KRIEGNER, A.; VIERTLINGER, K.; WEINHÄUSEL, A. A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. **Biomolecular Detection and Quantification**, v.1, p. 23–33, 2014.

PALUDAN, S.P.; BOWIE, A. G.; HORAN, K. A. FITZGERALD, K. Recognition of herpesviruses by the innate immune system, **Nature Review Immunology**, v. 11, p. 143-154, 2011.

PAPAGEORGIU, K.V.; SUÁRES, Z. N.M.; WILKIE, G. S. et al. Genome Sequence of Canine Herpesvirus. **Plos One**, 0156015, 2016.

PAREEK CS. Transcriptome Analysis on RNA-seq Data. **Next Generation: Sequencing & Applications**, S1:002, p.1-2, 2015.

PARK, S.-J.; HUH, J.-W.; KIM, Y.-H. et al. Selection of Internal Reference Genes for Normalization of Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) Analysis in the Canine Brain and Other Organs. **Mol Biotechnol.**, v. 54, n. 1, p.47-57, 2013.

PAULUS, C.; SOLLARS, P. J.; PICKARD, G. E.; ENQUIST, L. W. Transcriptome Signature of Virulent and Attenuated Pseudorabies Virus-Infected Rodent Brain. **Journal of Virology**, v.80, n.4, p.17 73-1786.

PAULUSSEN, M.; LANDUYT, B.; SCHOOF S, L.; LUYTEN, W.; ARCKENS, L. Thymosin beta 4 mRNA and pep, tide expression in phagocytic cells of different mouse tissues. **Peptides**, v. 10, p. 1822-1832, 2009.

QUONIAM, L.; TARAPANOFF, K; ARAUJO JUNIOR, R.; ALVARES, L. Inteligência obtida pela aplicação de data mining em base de teses francesas sobre o Brasil. **Ciência da Informação**. v.30, n.2, pp.20-28. 2001. RAHAU, M.; WOLFF, M. H. Reciprocal effects of Varicella-zoster virus (VZV) and AP1: activation of jun, fos and ATF-2 after VZV infection and their importance for the regulation of viral genes. **Virus Research**, n. 92, 2003. RAIOL, T.;

PAIVA, D.; SIMI, K.C.R.; SILVA, C.M.S.; WALTER, M.E. et al. Transcriptome Analysis Throughout RNA-seq. In: PASSOS, G.A. **Transcriptomic in Health and Disease**, Springer International Publishing, Londres, p. 42-69, 2015.

RAO X, LAI D, HUANG X. A New Method for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Data Analysis. **Journal of Computational Biology**, v.20, n. 9, p. 703-711, 2013.

RÉMOND, M.; SHELDRIK, P.; LEBRETON, F. et al. Gene organization in the UL region and inverted repeats of the canine herpesvirus genome. **Journal of General Virology**, v.77, p. 37-48, 1996.

RICE, S.A.; DAVIDO, D.J. HSV-1 ICP22: hijacking Host nuclear functions to enhance viral infection. **Future Microbiology**, v. 8, n.3, p. 311-321, 2013.

ROBINSON, A.J.; CREARAR, S.K.; SHARMA, N.W.; MULLER, W.J.; BRADLEY, M.P. Prevalence of serum antibodies to canine adenovirus and canine herpesvirus in the European red fox (*Vulpes vulpes*) in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 83, p. 356-361, 2005.

ROBINSON, M.D.; SMYTH, G.K. Small-sample estimation of negative binomial dispersion, with applications to SAGE data. **Biostatistics**, v.9, n.2, 321-332, 2008.

ROIZMAN, B.; THAYER, N. Herpesvirus - Family: Herpesviridae, Acesso em: 20/12/2016 (<http://stdgen.northwestern.edu/stdgen/bacteria/hhv2/herpes.html>).

ROIZMANN, B.; DESCROSIERS, R.C.; FLECKENSTEIN, B. et al. The family Herpesviridae: an update. **Archive of Virology**, v.123, p.425-449, 1992.

ROIZMANN, B.; TADDEO, B. The strategy of herpes simplex virus replication and takeover of host cell. In Human Herpesvirus: **Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis**. Arvin, A. Capadelli-Fiume; Mocarski, Cambridge University Press, 2007.

ROSANI, U.; L. VAROTTO, L.; DOMENEGHETTI, S.; ARCANGELI, G.; ALLAVICINI, A.; VENIER, P. Dual analysis of host and pathogen transcriptomes in ostreid herpesvirus 1 - positive *Crassostrea gigas*. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 11, 4200-4212, 2015.

SAID, A.; DAMIANI, A.; OSTERRIEDER, N. Ubiquitination and degradation of the ORF34 gene product of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) at late times of infection. **Virology**, v.460-461, p.11-22, 2014

SANDRI-GOLDIN, R.M.; MENDONZA, D.E. A herpesvirus regulatory protein appears to act post-transcriptionally by affecting mRNA processing, **Genes & Development**, v. 6, p. 848-863, 1992.

SEITZ, C.; FRENSING, T.; HÖPER, D.; KOCHS, G.; REICHL, UDO. High yields of influenza A virus in Madin-Darby canine kidney cells are promoted by an insufficient interferon-induced antiviral state. **J. Gen. Virol.**, v. 91, p 1754-1763.

SHAUL, Y.D.; SEGER, R. The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1773, p. 1213-1226, 2008.

SHELBY, B.D.; NELSON, A.; MORRIS.  $\gamma$ Herpesvirus Neoplasia: A Growing Role for COX-2. **Microscopy Research and Technique**, v. 68, p. 120-129, 2005.

SHIPP LE, LEE JV, YU CY, PUFALL M, ZHANG P, et al. Transcriptional Regulation of Human Dual Specificity Protein Phosphatase 1 (DUSP1) Gene by Glucocorticoids. **PLoS ONE**, v.5, n. 10, e13754, 2010.

SMIBERT, C.A.; POPOVA,B.; XIAO, P.; CAPONE, J.P.; SMILEY, J.R. Herpes simplex virus VP16 forms a complex with the vírion host shutoff protein vhs. **Journal of Virology**, v. 68, n.4, p. 2339-46.

SMITH, C.A.; BATES, P.; RIVERA-GONZALZ, R.; GU, B.; DELUCA, N. Transcriptional Regulatory Protein of Herpes Simplex Virus Type 1, Forms a Tripartite Complex with TATA-Binding Protein and TFIIB. **Journal of Virology**, v.67, n.8, p. 4676-4687, 1993.

SONG, R.; KOYUNCU, O.O.; GRECO, T.M. et al. Two Modes of the Axonal Interferon Response Limit Alphaherpesvirus Neuroinvasion. **MBio**, v.7, n.1, e02145-15, 2016.

SPERTZEL, R.O.; HUXSOLL, D.L.; McCONNEL, S.J.; BINN, L.N.; YAGER, R.H. Recovery and characterization of a Herpes-like from dog kidney cell culture. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. V. 120, p. 651-655, 1965.

STEINGBERG M. W.; CHEUNG, T.C; WARE C.F. The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNRSF14) in immune regulation. **Immunol. Rev.**, v.244, n.1, p.169-87, 2011.

STEWART, S.E.; DAVID-FERREIRA, J.; LOVELACE, E.; LANDON, J.; STOCK, N. Herpes-Like Virus Isolated from Neonatal and Fetal Dogs, **Science**, 1965, v.148, p. 1341-1343.

STINSKI, M.F.; MEYER, J.L. Immediate–early viral gene regulation and function. Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E. In: Human Herpesviruses: **Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis**, Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

STRIEBINGER, H.; FUNK, C.; RASCHBICHLER, V. SUSANNE M. S. M. BAILER. Subcellular Trafficking and Functional Relationship of the HSV-1 Glycoproteins N and M. **Viruses**, v. 8, n.83, p.1-13, 2016.

SU, L. KNIPE, D.M. Herpes simplex virus alpha protein ICP27 can inhibit or augment viral gene transactivation, **Virology**, v. 70, n. 2, p. 496-504.

SVEC, D.; TICHOPAD, A.; NOVOSADOVA, V.; PFAFF, M.W.; KUBISTA, M. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. **Biomolecular Detection and Quantification**, v.3, p.9–16, 2005.

TADDEO B1, ZHANG W, ROIZMAN B. Role of herpes simplex virus ICP27 in the degradation of mRNA by vírion host shutoff RNase. **Journal of Virology**. v. 84, n. 19, p.10182-90, JVI.00975-10, 2010.

TAI, S.H.S.; NIIKURA,N.; CHENG, H.H.; KRUGER, J.M.; WISE, A.G.; MAES, R.K. Complete genomic sequence and an infectious BAC clone of feline herpesvirus-1 (FHV-1). **Virology**, v.401, n.5, p.215-227, 2010.

TAKÁCS, I.F.; TOMBÁ CZ,D.; BERTA, B.; PRAZSÁK, I.; PÓKA,N.; BOLDOGKÖI, Z. The ICP22 protein selectively modifies the transcription of different kinetic classes of pseudorabies virus genes. **BMC Molecular Biology**, v.14, 2, 2013.

- UPRICHARD, S.L.; KNIPE, D.M. Conformational changes in the herpes simplex virus ICP8 DNA-binding protein coincident with assembly in viral replication structures. **Journal of Virology**, v.77, n.13, 7467-7476, 2003.
- VAN DE WALLE, G.R.; KAUFER, B.B.; CHBAB, N.; OSTERRIEDER, N. Analysis of the herpesvirus chemokine-binding glycoprotein G residues essential for chemokine binding and biological activity. **J Biol Chem.**, v284, n.9, p. 5968-76, 2009.
- VAN DE WALLE, G.R.; MAY, M.L. SUKHUMAVASI, W.; VON EINEM, J.; OSTERRIEDER, N. Herpesvirus chemokine-binding glycoprotein G (gG) efficiently inhibits neutrophil chemotaxis in vitro and in vivo. **Journal of Immunology**, v. 179, n. 6, p. 4161-4169, 2007.
- VAN LEEUWEN, H.; ELLIOT, G.; O'HARE, P. Evidence of a Role for Nonmuscle Myosin II in Herpes Simplex Virus Type 1 Egress. **Journal of Virology**, v.76, n. 7, p. 3471–3481, 2002.
- VERHAGEN, J.; HUTCHINSON, I.; ELLIOT, G. Nucleocytoplasmic Shuttling of Bovine Herpesvirus 1 UL47 **Protein in Infected Cells**. *Journal of Virology*, v. 8, n. 2, p. 1059-1063, 2006.
- WAGNER, E. K.; COSTA, R.H.; DEVI, K.G.; DRAPER, K.G.; FRINK, R.J.; HALL, L.M. Herpesvirus mRNA. **Developments in Molecular Virology**, v.7, p79-99, 1985.
- WANG, J.B.; McVOY, M. A. A 128-Base-Pair Sequence Containing the pac1 and a Presumed Cryptic pac2 Sequence Includes cis Elements Sufficient To Mediate Efficient Genome Maturation of Human Cytomegalovirus, **Journal of Virology**, v.86, n. 9, p. 4432-4439, 2011.
- WEI, P. J. Regulation of herpes simplex virus gene expression. **Gene**, v. 271, p 117-130, 2001.
- WELLER, S.K.; COEN, D. Herpes Simplex viruses: Mechanisms of DNA Replication. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, p.1-15, 2012.
- WERTHEIM, J.O.; SMITH, M.D.; SMITH, D.M. et al. Evolutionary origins of human herpes simplex viruses 1 and 2. *Mol Biol Evol.*v.31, n.9, p. 2356-64, 2014.
- WITHMARSH, A. Regulation of gene transcription by mitogen-activated protein kinase signaling pathways. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v.1773, p. 1285–1298, 2007.
- WOŹNIAKOWSKI, G.; SAMOREK-SALAMONOWICZ, E. Animal herpesviruses and their zoonotic potential for cross-species infection. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 22, n. 2, p.191–194, 2015.
- XIAO, W.; PIZER, L. I.; WILCOX, K. W. Identification of a promoter-specific transactivation domain in the herpes simplex virus regulatory protein ICP4. **Journal of Virology**, v.71, n.3, p. 1757–1765, 1997.
- YAHASZ, S.A.; STEVENS, J.G. Glycoprotein b is a specific determinant of herpes simplex virus type 1 neuroinvasiveness. **Journal of Virology**, v.67, n.10, p. 5948-5954, 1993.
- YAMADA, H.,; JIANG, Y.-M.; OSHIMA, S.- I.; DAIKOKU, T.; YAMASHITA, Y.; TSURUMI, T.; NISHIYAMA, Y. Characterization of the UL55 gene product of herpes simplex virus type 2. **Journal of General Virology**, v. 79, 1989–1995, 1998.

YU, D.; WELLER, S.K. See comment in PubMed Commons below Herpes simplex virus type 1 cleavage and packaging proteins UL15 and UL28 are associated with B but not C capsids during packaging. **Journal of Virology**, v.72, n.9, p.7428-39, 1998.

ZANELLA, J. R. C; FLORES, E.F. Vacinas com marcadores antigênicos contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina e o vírus da doença de Aujeszky. **Ciência Rural**, v.25, n.2, 1995.

ZARUBIN, T.; HAN, J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. **Cell Research**, v.15, p.11–18, 2005.

ZHANG, Y.; FEURINO, L.W.; ZHAI, Q.; WANG, H.; FISHER, W.E.; CHEN, C.; QIZHI, Y.; LI, M. Thymosin beta 4 is overexpressed in human pancreatic cancer cells and stimulates proinflammatory cytokine secretion and JNK activation **Cancer Biology & Therapy**, v.7, n.3, 1-5, 2008.

ZHAO, Y.; TIAN, T.; NAKAJIMA, S.; SAITO, Y.; TAKAHASHI, S.; YAO, J.; PATON, A.W.; PATON, J.C.; KITAMURA, M. Subtilase cytotoxin activates MAP kinases through PERK and IRE1 branches of the unfolded protein response. **Toxicology Science**, v. 120, n. 1, 79-86, 2011.

ZHU, Z.; SCHAFFER, P. A. Intracellular localization of the herpes simplex virus type 1 major transcriptional regulatory protein, ICP4, is affected by ICP27. **Journal of Virology**, v.69, n.1; p. 49-59, 1995.

ZWART, M.P.; TROMAS, N.; ELENA, S.F. Model-Selection-Based Approach for Calculating Cellular Multiplicity of Infection during Virus Colonization of Multi-Cellular Hosts. **Plos One**, v.8, n.5, e64657, 2013.

## 8. Apêndice

**TABELA 5:** Análise da ontologia gênica dos Processos Biológicos dos genes regulados positivamente com base o valor de Fold Change do momento 1h-pi

<b>Processo biológico (GO)</b>	<b>FE</b>	<b>P-value</b>
Resposta celular ao estímulo endógeno (GO:0071495)	11,20	5,45E-5
Resposta celular à substância orgânica (GO:0071310)	8,96	1,26E-4
Resposta ao composto organonitrogenado (GO:0010243)	14,00	2,29E-4
Resposta ao composto de Nitrogênio (GO:1901698)	14,00	2,29E-4
Resposta à radiação (GO:0009314)	14,00	2,29E-4
Resposta ao estímulo extracelular (GO:0009991)	11,20	3,61E-4
Resposta celular ao estímulo químico (GO:0070887)	7,47	4,77E-4
Resposta ao composto cíclico orgânico (GO:0014070)	7,47	4,77E-4
Resposta ao hormônio (GO:0009725)	7,47	4,77E-4
Transdução de sinal (GO:0007165)	3,73	7,7E-4
Resposta celular ao estímulo (GO:0051716)	3,73	7,7E-4
Diferenciação celular do músculo esquelético (GO:0035914)	10,50	8,55E-4
Regulação da transcrição do promotor da RNA polimerase II em resposta ao estresse (GO:0043618)	26,89	1,13E-02
Regulação da transcrição do DNA molde em resposta ao estresse	24,97	1,62E-02

**TABELA 6:** Análise da ontologia gênica dos Processos Biológicos dos genes regulados positivamente com base o valor de Fold Change do momento 4h-pi.

<b>Processo Biológico (GO)</b>	<b>FE</b>	<b>P-value</b>
Regulação da cascata ERK1 e ERK2 (GO:0070372)	13,59	6,58E-4
Regulação da transcrição de DNA molde (GO: 0006355)	2,00	2,51E-6
Regulação da transcrição do promotor da RNA polimerase II em resposta ao estresse (GO: 0043618)	16,80	4,05E-4
Regulação positiva da transcrição, DNA molde (GO: 0045893)	2,37	4,1E-4
Resposta celular ao estímulo extracelular (GO: 0031668)	8,00	6,64E-4
Regulação da atividade quinase (GO: 0043549)	2,30	7,08E-4
Diferenciação de células musculares esqueléticas (GO: 0035914)	10,00	9,23E-4
Regulação negativa de resposta à estímulos (GO:0048585)	3,81	6,52E-5
Regulação negative à transdução de sinal (GO:0009968)	3,81	3,13E-4

**TABELA 7:** Análise de ontologia gênica dos Processos Biológicos dos genes regulados positivamente, com base no valor de Fold Change, do momento 16h-pi

<b>Processo Biológico (GO)</b>	<b>FE</b>	<b>P-value</b>
Regulação negativa da morte celular (GO: 0060548)	4,63	2,96E-02
Regulação da morte celular programada (GO: 0043067)	3,63	4,29E-02

**TABELA 8:** Análise de ontologia gênica dos Processos Biológicos dos genes regulados positivamente, com base no valor de Fold Change, do momento 20h-pi.

<b>Processo Biológico (GO)</b>	<b>FE</b>	<b>P-value</b>
Proteína dependente de sinal de reconhecimento de partícula (SRP) direcionada a membrana (GO: 0006614)	12,20	1,20E-04
Processo metabólico do colesterol (GO: 0008203)	9,33	5,93E-03
Transcrição viral (GO: 0019083)	9,17	6,85E-03
Processo catabólico do mRNA transcrito nuclear (GO: 0000184)	8,79	9,69E-03
Início transcricional (GO: 0006413)	8,37	9,97E-04
Processamento de RNAr (GO: 0006364)	6,21	7,08E-04
Processo metabólico da coenzima (GO: 0006732)	6,19	2,54E-04
Transição de fase do ciclo celular (GO: 0044770)	5,39	2,62E-02
Processo de biossíntese de pequenas moléculas (GO: 0044283)	4,11	4,13E-02
Resposta ao hormônio (GO: 0009725)	3,34	2,21E-03
Processo metabólico do ácido carboxílico (GO: 0019752)	3,00	4,05E-02
Processo metabólico do fósforo (GO: 0006793)	2,24	3,60E-03
Resposta celular à substância orgânica (GO: 0071310)	2,22	2,73E-02

**TABELA 9:** Análise de ontologia gênica dos Processos Biológicos dos genes regulados positivamente, com base no valor de Fold Change, do momento 24h-pi.

<b>Processo Biológico (GO)</b>	<b>FE</b>	<b>P-value</b>
Transdução de sinal por mediador de classe p53 (GO: 0072331)	17,25	1,20E-02
Via de sinalização apoptótica intrínseca (GO: 0097193)	14,24	3,57E-02
Regulação da transcrição a partir do promotor da ARN polimerase II (GO: 0006357)	3,38	4,29E-02
Regulação do processo de desenvolvimento (GO: 0050793)	3,20	1,07E-02
Diferenciação celular (GO: 0030154)	2,68	1,47E-02
Resposta ao produto químico (GO: 0042221)	2,41	3,27E-02
Regulação positiva do processo celular (GO: 0048522)	2,33	6,36E-03

**TABELA 10:** Análise de ontologia gênica dos Processos Biológicos dos genes regulados **negativamente**, com base no valor de Fold Change, do momento 24h-pi.

<b>Processo Biológico (GO)</b>	<b>FE</b>	<b>P-value</b>
Regulação negativa da replicação do genoma viral (GO: 0045071)	39,57	1,67E-03
Via de sinalização de interferon tipo I (GO: 0060337)	37,69	1,25E-04
Resposta de defesa ao vírus (GO: 0051607)	19,19	7,91E-05
Resposta ao interferão-gama (GO: 0034341)	16,49	1,52E-02
Desenvolvimento de vasos sanguíneos (GO: 0001568)	7,64	2,01E-02
Regulação da produção de citocinas (GO: 0001817)	7,47	1,65E-03
Regulação da migração celular (GO: 0030334)	6,17	1,06E-02
Estrutura anatômica envolvida na morfogênese (GO: 0048646)	5,28	4,73E-02
Regulação positiva do processo de organismos multicelulares (GO: 0051240)	4,32	3,22E-03

**TABELA 11:** Análise de ontologia gênica dos Processos Biológicos dos genes regulados **positivamente**, com base no valor de Fold Change, do momento 28h-pi.

<b>Processo Biológico (GO)</b>	<b>FE</b>	<b>P-value</b>
Resposta à proteína desdobrada mediada por PERK (GO: 0036499)	51,78	1,11E-02
Via de sinalização apoptótica intrínseca pelo mediador de classe p53 (GO: 0072332)	17,26	1,37E-02
Diferenciação celular do músculo esquelético (GO: 0035914)	16,95	1,52E-02
Regulação da transcrição a partir do promotor de RNA polimerase II em resposta ao estresse (GO: 0043618)	14,34	3,94E-02
Resposta ao dano ao DNA, transdução de sinal pelo mediador da classe p53 (GO: 0030330)	12,79	1,32E-02
Resposta à substância tóxica (GO: 0009636)	7,13	1,48E-02
Regulação da angiogênese (GO: 0045765)	6,87	2,04E-02
Resposta ao estímulo mecânico (GO: 0009612)	6,81	2,20E-02
Regulação da localização de proteínas ao núcleo (GO: 1900180)	6,78	2,29E-02
Resposta celular ao estímulo externo (GO: 0071496)	6,10	1,96E-02
Resposta à hipóxia (GO: 0001666)	5,92	9,21E-03
Resposta ao peptídeo (GO: 1901652)	5,30	1,61E-03
Regulação negativa do ciclo celular (GO: 0045786)	4,80	5,42E-03
Resposta celular ao composto de nitrogênio (GO: 1901699)	4,31	2,06E-02
Resposta celular ao composto contendo oxigênio (GO: 1901701)	4,10	8,09E-05
Diferenciação celular do músculo esquelético (GO: 0035914)	3,88	4,02E-03
Resposta ao hormônio (GO: 0009725)	3,69	4,25E-03
Resposta celular ao estímulo endógeno (GO: 0071495)	3,40	2,26E-03
Resposta ao composto cíclico orgânico (GO: 0014070)	3,27	2,75E-02
Regulação negativa da transdução de sinal (GO: 0009968)	3,05	2,49E-02
Regulação da proliferação celular (GO: 0042127)	2,96	5,49E-04
Regulação do processo apoptótico (GO: 0042981)	2,93	3,44E-03
Regulação positiva do processo metabólico celular (GO: 0031325)	2,18	8,15E-03

**TABELA 12:** Análise de ontologia gênica dos Processos Biológicos para Apoptosis com diferencial de expressão gênica positiva, com base no valor de Fold Change, do momento 28h-pi.

<b>Processo Biológico (GO)</b>	<b>FE</b>	<b>P-value</b>
Via de sinalização apoptótica intrínseca pelo mediador de classe p53 (GO: 0072332)	17,26	1,37E-02
- Transdução de sinal por mediador de classe p53 (GO: 0072331)	13,35	8,15E-06
- Transdução de sinal intracelular (GO: 0035556)	3,17	1,93E-05
- Via de sinalização apoptótica intrínseca (GO: 0097193)	10,02	6,89E-04
- Via de sinalização apoptótica (GO: 0097190)	6,38	4,20E-03
- Regulação do processo apoptótico (GO: 0042981)	2,93	3,44E-03
- Regulação da morte celular programada (GO: 0043067)	3,01	1,17E-03
- Regulação da morte celular (GO: 0010941)	3,01	3,65E-04
- Resposta ao dano ao DNA, transdução de sinal pelo mediador da classe p53 (GO: 0030330)	12,79	1,32E-02
- Sinal de transdução em resposta ao DNA danos (GO: 0042770)	11,10	3,33E-02

**TABELA 13:** Análise de ontologia gênica dos Processos Biológicos dos genes regulados positivamente, com base no valor de Fold Change, do momento 32h-pi.

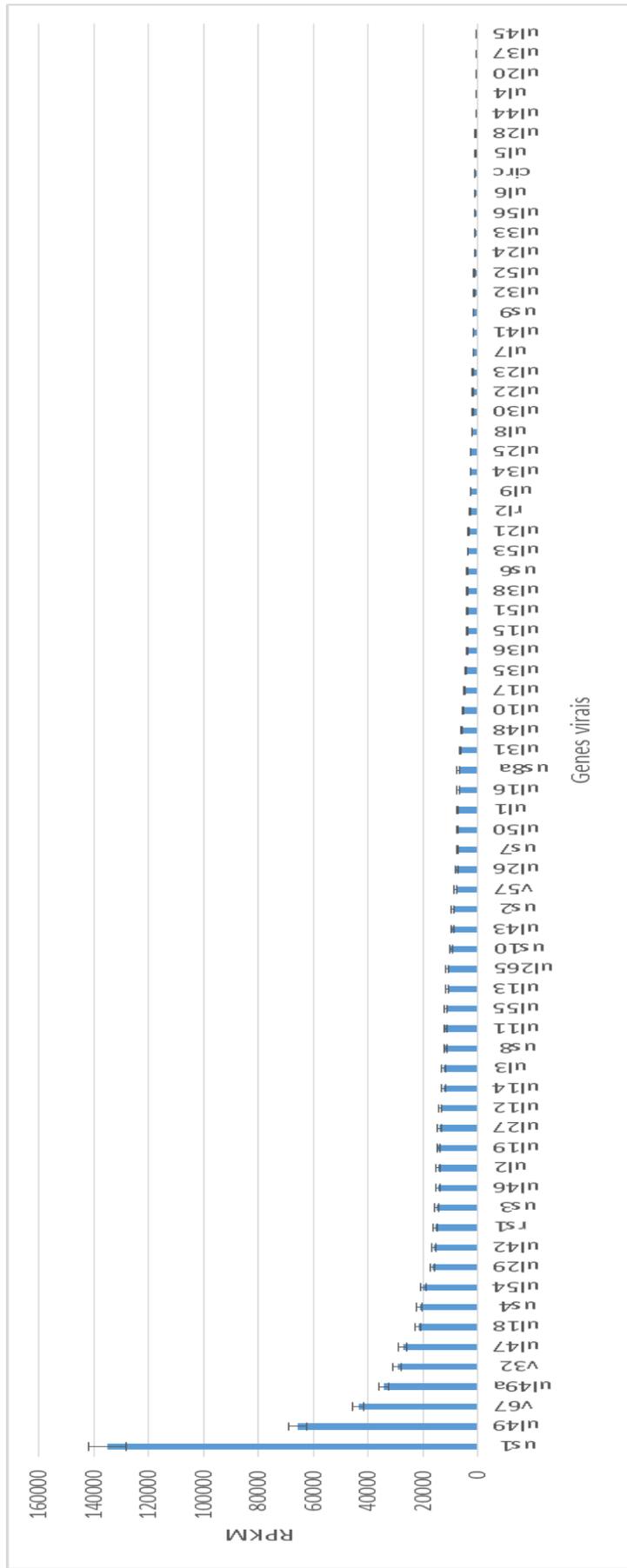
<b>Processo Biológico (GO)</b>	<b>FE</b>	<b>P-value</b>
Processo metabólico do composto contendo piridina (GO: 0072524)	6,88	2,29E-02
Processo metabólico de glicose (GO: 0006006)	6,37	4,47E-02
Resposta celular à hipóxia (GO: 0071456)	6,06	2,45E-02
Regulação da transição G1 / S do ciclo celular mitótico (GO: 2000045)	5,97	2,80E-02
Regulação da via de sinalização extrínseca apoptótica (GO: 2001236)	5,75	1,49E-02
Resposta à inanição (GO: 0042594)	5,68	1,69E-02
Proteína direcionada para membrana (GO: 0006612)	5,61	1,91E-02
Resposta ao fármaco (GO: 0042493)	3,47	9,31E-03
Resposta celular ao estímulo do fator de crescimento (GO: 0071363)	3,44	1,06E-02
Regulação positiva do processo apoptótico (GO: 0043065)	3,01	3,06E-02
Resposta aos lipídios (GO: 0033993)	2,88	3,34E-04
Regulação da migração celular (GO: 0030334)	2,84	1,89E-02
Via de sinalização da proteína do receptor ligado à enzima (GO: 0007167)	2,82	2,20E-02
Resposta ao hormônio (GO: 0009725)	2,75	5,95E-03
Regulação negativa da atividade catalítica (GO: 0043086)	2,73	7,04E-03
Resposta ao composto cíclico orgânico (GO: 0014070)	2,68	2,92E-03
Regulação negativa do processo metabólico das proteínas celulares (GO: 0032269)	2,58	6,76E-03
Organização de projeção de células (GO: 0030030)	2,53	2,16E-02
Regulação negativa do processo de biossíntese de macromoléculas celulares (GO: 2000113)	2,40	2,40E-03
Regulação da organização de componentes celulares (GO: 0051128)	2,39	1,36E-08
Transporte mediado por vesícula (GO: 0016192)	2,35	2,88E-03
Processo de ciclo celular (GO: 0022402)	2,34	4,99E-02
Regulação negativa do processo de biossíntese de macromoléculas (GO: 0010558)	2,30	5,47E-03
Regulamento do desenvolvimento de organismos multicelulares (GO: 2000026)	2,03	2,80E-02
Diferenciação celular (GO: 0030154)	2,01	3,99E-07
Biogênese de componentes celulares (GO: 0044085)	1,84	2,75E-02
Regulação da qualidade biológica (GO: 0065008)	1,71	5,37E-03
Resposta aos glicocorticóides (GO: 0051384)	14,97	1,32E-4
Resposta celular aos UV (GO: 0034644)	65,50	4,72E-4
Homeostase de glucose (GO: 0042593)	8,73	6,21E-4

**TABELA 14:** A evolução temporal das expressões dos genes virais de CaHV-1 durante a infecção em células MDCK.

<b>Momentos infecção</b>	<b>16h-pi</b>	<b>20h-pi</b>	<b>24h-pi</b>	<b>28h-pi</b>	<b>32h-pi</b>
<b>Gene viral</b>	<b>RPKM</b>	<b>RPKM</b>	<b>RPKM</b>	<b>RPKM</b>	<b>RPKM</b>
<b>CIRC</b>	0	1543	1126	320,6	1113,3
<b>RL2</b>	5702,1	1890	2791,4	1150,4	2248,2
<b>RS1</b>	12413	14250,3	14941,7	21525,3	15257
<b>UL1</b>	12245	5931,7	8161,9	2950,7	6923
<b>UL10</b>	5712,4	5184,9	5144,2	3687,7	7156,2
<b>UL11</b>	13452,3	16720,1	11440,7	4673,9	12108,9
<b>UL12</b>	26239,3	13837	12259,7	3950,5	11946,1
<b>UL13</b>	7284,7	9946,9	12585,7	12836,6	12500,3
<b>UL14</b>	7854,5	9832,7	12434,7	19455,1	12364
<b>UL15</b>	652,4	4898,5	5534	4116,6	4290,3
<b>UL16</b>	7871,8	6572,9	7736,1	6146,4	7046,6
<b>UL17</b>	6931,1	3967,3	4690,9	5375,6	3413,4
<b>UL18</b>	22668,7	26046,7	23954,2	12059,7	23631,5
<b>UL19</b>	22939,3	14160,6	15587,2	7105,3	11330,1
<b>UL2</b>	13693,3	16823,4	15087,4	12373,7	13955,7
<b>UL20</b>	0	975,1	1000,6	417,1	553,7
<b>UL21</b>	1822,7	2951	3463,3	4943,8	3010,2
<b>UL22</b>	2393,8	1403,7	1886,9	1073,2	1834,2
<b>UL23</b>	0	2128	2738	1838,3	1706,1
<b>UL24</b>	0	1656,1	1720,6	861,3	1197,8
<b>UL25</b>	0	2742,6	3358,4	2320	3964,8
<b>UL26</b>	6621,2	8103	6926,8	8218,7	8164,2
<b>UL265</b>	6773,8	12866,5	10416,5	12431,9	12371,1
<b>UL27</b>	15194,9	11663,7	11292,9	21074,9	10657,8
<b>UL28</b>	1261,7	691,6	903,8	176,8	525,6
<b>UL29</b>	12756,1	18588,7	18411,8	18183,7	13925,7
<b>UL3</b>	4799,5	17315,1	13964,7	11915	13710,5
<b>UL30</b>	404,7	2223,6	2184,9	2254,3	1884,7
<b>UL31</b>	18532	4125,2	3938,7	1517,8	3732,9
<b>UL32</b>	0	1652,4	1804,3	1911,6	1192,7
<b>UL33</b>	0	719	1809,6	337,2	2405,7
<b>UL34</b>	0	3905,4	3633,5	848,3	4048,6
<b>UL35</b>	0	6429,2	6937,3	3101,4	5909,9
<b>UL36</b>	3908,2	3870,8	4247,6	4215,2	3368,1
<b>UL37</b>	0	324,5	1061,3	528,4	561,1
<b>UL38</b>	6256,2	3961,1	3714,4	1379	3257,8
<b>UL4</b>	0	1349,8	974,2	363,3	546,6
<b>UL41</b>	0	2375,1	2001,5	1494,7	1517,3
<b>UL42</b>	24351,2	14503,9	16822,4	11174,7	13787,7
<b>UL43</b>	11909,1	7423,8	10184,3	7060,8	9621,3

**TABELA 14** (continuação): Todos os genes virais expressos a partir do momento 16h-pi e seus respectivos valores de RPKM.

<b>Momentos infecção</b>	<b>16h-pi</b>	<b>20h-pi</b>	<b>24h-pi</b>	<b>28h-pi</b>	<b>32h-pi</b>
<b>Gene viral</b>	RPKM	RPKM	RPKM	RPKM	RPKM
<b>UL44</b>	0	952,9	1160	442,2	803,2
<b>UL45</b>	0	691,8	600,4	121,6	323
<b>UL46</b>	14427,6	15661	14107,8	14448,1	14296,3
<b>UL47</b>	15272,4	20824,4	27792,1	45353,4	27529,4
<b>UL48</b>	15805,6	2993,5	3931,2	2480	3628,2
<b>UL49</b>	68479,6	79716,2	60667,2	46232,1	73920,9
<b>UL49A</b>	43913,1	30439,2	27873,5	34759,5	35036
<b>UL5</b>	0	1105	1218,1	410,3	857,1
<b>UL50</b>	12485,1	6008,3	5248,7	6576,7	6153,2
<b>UL51</b>	4263,9	4511,5	4210,1	1624,8	4060,1
<b>UL52</b>	467,7	1615,9	1835,7	571,4	1510,1
<b>UL53</b>	7064,4	2791,8	2911,2	1710,2	3090,1
<b>UL54</b>	27031,4	21379,2	19213,9	15375,4	16740,8
<b>UL55</b>	25401,9	7804,1	8536	9338,1	7105,2
<b>UL56</b>	0	209,9	1662,4	1472,7	1306,7
<b>UL6</b>	691,1	209,9	1662,4	307,6	1306,7
<b>UL7</b>	1629,9	1641,4	2231,4	968,2	1867,2
<b>UL8</b>	3785,1	2203,5	2029,2	586,8	1473,6
<b>UL9</b>	565,2	2226,2	2260,2	5441	2581,4
<b>US1</b>	91252,5	130403,8	115818,3	179013,8	159029,7
<b>US10</b>	4873	11802,9	10633,8	5024,7	16385,4
<b>US2</b>	4873	7889,3	7257,7	16685,1	8138,4
<b>US3</b>	9527,3	15227,2	16271,2	19300,5	15468,4
<b>US4</b>	27551,2	20414,7	19735,8	16880,5	21588,9
<b>US6</b>	11041,7	1513,2	2267,5	1732,6	1766
<b>US7</b>	8281,3	5771,1	9787,7	5135,8	8296,2
<b>US8</b>	7304,9	13921,7	13829,3	8934,2	14903,3
<b>US8A</b>	12090	6935,5	6002,1	3048,8	6925,3
<b>US9</b>	0	1826,4	1992,2	1605,7	1421
<b>V32</b>	54970,4	28643,5	23983,5	11782,9	26887,3
<b>V57</b>	0	13102,6	10832,7	5550,6	10760,1
<b>V67</b>	93434,6	37519,6	33709,2	11810,1	40932,2



**FIGURA 18:** Expressão de genes pela média de RPKM ao longo da infecção

## 9 Trabalho para ser enviado à revista *Brazilian Journal of Microbiology*

### Isolation and molecular characterization of canid alphaherpesvirus type 1

Jacqueline Kazue Kurissio<sup>a, b\*</sup>, Taís Fukuta da Cruz<sup>a, b</sup>, Danilo Ribolli<sup>a</sup>, João Pessoa Araújo Jr<sup>a, b\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute, University of São Paulo State (UNESP), Botucatu, SP, 18618-970, Brazil.

<sup>b</sup> Biotechnology Institute (IBTEC), São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP 18618-970, Brazil.

\*Corresponding Authors: Jacqueline Kazue Kurissio and João Pessoa Araújo Jr, Laboratório de Virologia e Diagnóstico Molecular, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Jr. s/n, Botucatu-SP, 18618-970, Brazil. [jkkurissio@yahoo.com.br](mailto:jkkurissio@yahoo.com.br); [jpessoa@ibb.unesp.br](mailto:jpessoa@ibb.unesp.br)

#### Abstract

The canid alphaherpesvirus type 1 (CaHV-1) causes an infectious disease that affects dogs worldwide. It is considered responsible for causing reproductive, respiratory, ocular and neurologic problems causing death in neonates and immunocompromised adults. The CaV-1 was isolated from kidney tissue of a neonate puppy naturally infected with systemic and acute death. The viral propagation was realized in MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) cell culture. The inoculated cell culture after 24 hours showed cytopathic effects characteristic of herpesvirus. The Giemsa staining of the cell monolayer infected evidenced the cellular changes like inclusions intracellulars, marginalization of the chromatin, rounding of morphology and cytolysis. Viral structures and ultrastructural cellular changes during lytic infection were observed in the transmission electron microscope (TEM) in both positive and negative staining. The sequences analyzed of Sanger sequencing of the product of PCR of viral DNA obtained from

culture virus and infected tissue fragment, showed identity between 97 and 100% for thymidine kinase, glycoprotein B and the DNA polymerase genes sequences previously published. There was no amplification of nucleic acids of other agents both in cell culture and in tissue sample from newborn puppy for canine adenovirus and micoplasma. Furthermore, the sequencing of the complete genome was performed by NGS (Next Generation Sequencing). The complete sequence obtained identified the CaHV-1 strain BTU-1, showing 125,187 bp with 99.6% of identity with the reference sequence (KT819633.1). The molecular weight was estimated about  $77.3 \times 10^6$  kDa. The application of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) from the viral concentrate, allowed estimate the size of the genome of approximately 125 kbp, corroborating the size of the sequence in genomic analysis. Phylogenetic analysis showed that the CaHV-1 strain BTU shares the same strain with reference strain 0194 and the same cluster as FeHV-1, sharing the same ancestor, in the case of human herpesvirus type 3 and Cercopithecine 9, both *Varicellovirus*.

Key words: herpesvirus, virus, genome, CaHV-1, NGS, resequencing.

## 1. Introduction

The Canid alphaherpesvirus type 1 (CaHV-1) belongs to the family *Herpesviridae*, subfamily *Alphaherpesvirinae*, and *Varicellovirus* genus. The CaHV-1 is an infectious agent specific to canids and infect dogs, foxes and coyotes (Strive et al. 2007). Morphologically, the CaHV-1 has a linear and double-stranded DNA of 125 kbp, contained in icosahedral capsid, surrounded by a proteinaceous matrix dubbed the tegument and then by a lipid envelope containing membrane-associated proteins, the estimated size is between 120 to 300nm in diameter (Papageorgiou et al., 2016; Davidson et al., 2009, Strandberg and Aurelian, 1969; Carmichael and Strandber, 1965).

CaHV-1 infection can lead to reproductive, respiratory, ocular, and neurologic problems, causing death in neonates and immunocompromised adults (Kawakami et al., 2010, Ledbetter et al., 2009, Percy et al. 1968). Canine neonatal mortality rate can occur between 17-30% in the first two months of life (Indrebø et al., 2007). However, CaHV-1 was diagnosed in 22.8% of puppies who

died with three weeks of life. Seroprevalence surveys verified the occurrence of infected adults between 40-80% in the population evaluated (Larsen et al, 2015). In some countries was found a high rate of positive animals (above 90%), as described in United Kingdom (Reading and Field, 1998 and 1999).

The CaHV-1 was first isolated in primary cell culture, from organ tissue of neonatal puppies with symptoms of acute infection and post mortem fatal hemorrhagic changes (Carmichael et al., 1965a). In other reports, cytopathogenic changes were observed in primary cell culture DKTC (Dog Kidney Tissue Culture) from apparently healthy dogs (Spertzel et al 1965, Smith et al., 1970). The viral diagnostic techniques include detection of viral antigens, virus isolation cultures, evaluation of morphological structures in transmission electron microscopy, detection of viral nucleic acids or nucleic acid test (NAT - Nucleic Acid Test) (Rabenau et al., 2007). Despite technological advances in detection and diagnosis viral infections, viral isolation is still considered an important method for identification, multiplication, characterization, studies of viral agents and recognition of emerging diseases (Goldsmith et al, 2013; Leland & Ginocchio 2007; Olgilvie, M., 2001; Hsiung, 1984). Besides that, the viral production allows obtaining total viral antigens faster than in microbial protein expression vectors. In addition, prokaryotic hosts may not be suitable for expression of eukaryotic viral proteins due to the toxicity of the foreign macromolecule, either to differences in protein folding machinery (protein folding) or lack of co or posttranslational modification in bacteria (Aydin et al., 2012).

However, after viral isolation in cell cultures, the use of molecular methods are still needed for the precise identification of the viruses (Hematian et al., 2016), which helps to reduce the time, cost and increase the diagnostic certainty (Leland & Ginocchio, 2007). Therefore, this study aims to characterize the morphology and genome of the CaHV-1. For this purpose, it was applied molecular techniques and massive sequencing (Next-Generation Sequencing) to analysis of genomic DNA from virus isolated in permissive culture cell, identified morphologically by transmission electron microscope.

## **1. Material and Methods**

### **1.1 Viral isolation**

For viral isolation it was used a fragment of kidney collected from a deceased canine neonate 21 days of age, English Bulldog breed that showed constant vocalization, abdominal pain and swelling, diarrhea and episodes of emesis. Thus, the inoculum was prepared from a 10% suspension (w / v) of macerated kidney fragment with culture medium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) supplemented with 100 IU penicillin G procaine, 100 µg/µL of streptomycin sulfate and 2.5 g / mL amphotericin B (Gibco), filtered in sterile membrane of 0.45 micrometers. The culture of MDCK cells (Madin-Darby Canine Kidney) were used for the virus isolation. Thus, a bottle of 25 cm<sup>2</sup> with MDCK cells with 100% of confluence were cultured and maintained in culture medium (DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum - FBS) for inoculation. For viral adsorption was applied 1 mL of the inoculum over the cell monolayer and incubated for 1 hour at 34 °C under constant stirring. The cell monolayer was washed 3 times with 3 mL of medium. Then 9 mL of culture medium supplemented with 1% FBS was added on the infected cells. The inoculated cell culture was incubated at 34 °C and monitoring the cytopathic effects was conducted every 24 hours, with an inverted optical microscope at 5X and 10X objective. The calculation of the TCID<sub>50</sub> (infectious dose in tissue culture 50%) was accomplished by the method of Reed and Muench (1938).

### **1.2 Ultrastructural evaluation of cell infected and virions MDCK**

A culture of MDCK cells was infected with viral supernatant isolated from the second passage. At 5th day post-inoculation and 70% cytopathic effect on cell monolayer, the supernatant was removed and done three washes with PBS solution over the monolayer cell. Three milliliters of Karnovsky's fixative (2.5% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2) was applied to the cell monolayer which was then scraped with scraper and transferred to a tube 1.5 mL microcentrifuge. The sample was centrifuged at 6000xg for 10min. The obtained cell pellet was washed once with 1 mL of

ultrapure water and then centrifuged at 600xg. The sample was prepared for electron microscopy as described by Sesso (1998). The ultrathin sections were made with the ultramicrotome Ultracut UCT (Leica®). The cut was placed on a copper grid coated with carbon film of 200 mesh for electron microscopy and contrasted with ethyl acetate-5% uranyl. It also promoted the extracellular virions display through negative staining. The viral concentrate was applied on the grid for electron microscopy with 200 mesh and contrasted with uranyl acetate at 1%. Contrast samples were observed in the transmission electron microscope CM 100 (Philips®).

### **1.3 Culture stained infected cell with Giemsa.**

A culture of MDCK cells was cultivated on circular coverslips 12 x 0.11 mm contained in cell culture 24-well plate. Three days post-inoculation (p.i.) staining was performed with the dye Giemsa, for visualization of cellular changes in morphology at light microscopy (M.O.).

### **1.4 DNA extraction of viral isolation samples**

The total DNA extraction from the renal tissue fragment used as the inoculum virus isolation was performed. For this was used the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) following the manufacturer's instructions. In addition, aliquots of 200 µL of the supernatant of the cell culture were collected during viral infection in MDCK cells for DNA extraction using the Illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit kit (GE Healthcare Life Science), according to the instructions of manufacturer.

### **1.5 PCR, Semi-nested PCR (snPCR) and nested PCR (nPCR) to CaHV-1**

For reaction of detection of CaHV-1 by PCR was employed an external primer (CHV1) and an inner (CHV4) as described in **Table 1**. The PCR for the glycoprotein B gene, reaction conditions were: 95 °C for 5 min, 40 cycles of repetitions at 95 °C for 30 s; 52 °C for 30 s and 72°C for 30 s, then the final denaturation at 72 ° C for 3min. The PCR products, were applied to 1.5% agarose

gel, stained with SYBR Safe Stain (Invitrogen) and subjected to electrophoresis and visualized under ultraviolet light (UV). The products of reaction and bands cut from gel were purified using the Illustra kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE HealthCare) following the manufacturer's guidelines. The purified DNA was subjected to sequencing by Sanger, the ABI 3500 platform and the BigDye 3.0 kit (Applied Biosystems®). The sequences obtained were analyzed in MEGA 6.0 software and compared with the sequences available in GenBank database, by means of BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) browser.

**Table 1.** Oligonucleotides used in amplification reaction of CaHV-1 genes

Primer	Sequence 5'→3'	Region	Product (bp)	Gene target (Genbank)
gB-677 (Forward)	TACATGTGCCACCATC	187	677	Glycoprotein B (AF361073, HQ846625, AY582737)
gB-677 (Reverse)	GGTGACAAGCTGTAGTTC	844		

### 1.6 PCR to the other infectious agents

The DNA sample of renal tissue was subjected to PCR for *Mycoplasma spp* (Van Kuppeveld et al., 1992), canine adenovirus types 1 and 2 (Hu et al., 2001), canine parvovirus (Decaro et al., 2005), *Ehrlichia canis* (Sirigireddy et al., 2005), *Ehrlichia spp* (Baneth et al., 2009), canine distemper (Elia et al., 2006), *Brucella spp* (Ratushna et al., 2006) and *Leptospira spp* (Heinemann et al., 2000). The culture of MDCK cells was assayed by PCR for the detection of *Mycoplasma spp* (Van Kuppeveld et al., 1992), canine adenovirus types 1 and 2 (Hu et al., 2001) and CaHV-1 (as described above) prior to inoculation. All reactions were performed according to the description of each author.

### 1.7 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Production and virus concentration was performed as described above in roller type bottles from 200mL medium of infected culture supernatant of the obtained pellet was washed and resuspended in 100µL of TE solution (10mM Tris, 1mM EDTA [pH 8.0]) and added protease inhibitor (1x). The sample was incubated at 37 in a water bath for 10 min., Followed by addition of 5µL of proteinase K (20mg / ml) and vortexing. After that, 100µL was applied to agarose

1.8% Low Melting and placed in the mold plugs for solidification. Then, the formed plugs were immersed in 2 ml of CS solution (6 mM Tris; 1mM NaCl; 100mM EDTA; 0.5% Brij-58, 0.2% sodium deoxycholate, 0.5% sodium laurilsarcosil) and incubated at 37 ° C for approximately 16h. Then, four washes were taken 30 minutes with 2 mL of TE solution at room temperature. Electrophoresis was carried out in CHEF-DR III system (BioRad Laboratories, USA) agarose 1% gel prepared in 0.5X TBE running under the following conditions: pulse time of 5 to 40s, 6V / cm, angle 120 ° for 21 hours. The gel was stained with GelRed for 1 hour and visualized under UV light. The electrophoresis gel image was analyzed in Alphaview FluorChem FC2 v.3.2.2 software from Cell Biosciences, Inc. to estimate the CaHV-1 genome size, with reference to the molecular weight marker Labda Ladder PFG Marker (New England Biolabs), applied to agarose gel.

### **1.10 Resequencing of complete genome by NGS**

The resequencings were made from supernatant of MDCK culture cell infected with CaHV-1 isolated five days post inoculation and 100% lysis. The infected supernatant was centrifuged at 2.000xg at 4 ° C for 30min. The clarified supernatant was collected and subjected to ultracentrifugation at 20.000x g at 4 °C for 2 hours in a Sorvall ultracentrifuge with a SW30 rotor. The obtained pellet was resuspended in 200 µL Tris-EDTA (1X) and the DNA extracted with the kit illustra GenomicPrep Blood Mini Spin Kit (GE Healthcare Life Science). The samples were prepared for DNA library using the Nextera XT Kit (Illumina). The preparation of libraries for sequencing was performed with the kit High output up to 400 M cluster - V2 150 cycles (Illumina). Sequencing was performed on the Illumina platform 500/550 Nextseq pair-end sequences and 150 bp.

Analysis of sequences and assembly of the viral genome has been performed using Geneious R8 v.8.1.7 software, with the reference genome CaHV-1 strain 0194 (Genbank KT819633.1).

The molecular weight of the complete genome CaHV-1 BTU-1 strain was estimated based on the size of the sequence and the amount of adenine (A),

cytosine (C), guanine (G) and thymine (T) as described by Sambrook & Russell (2001).

### 1.11 Phylogenetic analysis

Sequences of *Varicellovirus* gender, the *Alphaherpesvirinae* subfamily GenBank, for the glycoprotein B gene (UL27) of CaHV-1 strain 0194 species (819,633), FeHV-1 (FJ78159), BoVH-1 (JN787952), BoVH-5 (AY261359), EHV-1 (KT324733), EHV-3 (KM051845), EHV-4 (AF030027), EHV-9 (AP010838) were compared to perform phylogenetic analysis. It was used as outgroup the sequence of the glycoprotein B gene of Human Herpesvirus 5 (FJ713492), a member of the subfamily *Betaherpesvirinae*. For the analysis was used MEGA6.06 software for alignment of the sequences we used the ClustalW program. Evolutionary distances were calculated using the method LogDet (Kumar-Tamura) in units of the number of base substitutions per site, with 5000 bootstrap replicates. The LogDet model of nucleotide sequence substitution was used in the analysis because it is less affected by the bias of the nucleotide composition (Linderberg et al., 2003).

## Results

### 2.1 Microscopic evaluation of MDCK cells infected with CaHV-1

By the inverted optical microscopy after 24 hours of inoculation it was observed focal cytopathic effects consistent with canine herpesvirus, characterized by cell grouping (clusters), rounded cells and refractile with lifting and detachment of the monolayer cells (Fig. 1). From the fifth day, cytolysis was observed in 75% of the cells, which were already suspended. Giemsa staining showed (Fig.2) cytopathic effects foci, similar to that observed in inverted optical microscope. There was monolayer cell detachment due to cellular degeneration and cytolysis, rounded morphology and cell atrophy. The core center was lighter and pale appearance, indicating the presence of viral inclusion. Furthermore, it was observed clutter and marginalization of chromatin in the region of perinuclear membrane.

In the observation by optical microscopy in Giemsa staining, the nucleus of the infected cells showed up clearer, with little presence of chromatin with migration to the perinuclear region. The cytopathogenic effects such as rounding of the infected cells, the cell monolayer detachment, nuclear and cytolysis changes were evidenced by staining, as shown in Fig. 2.

## **2.2 Viral titration**

In the measurement of infective particles in cell culture, viral titer by limiting dilution was  $10^{4,56}$  TCID<sub>50</sub> / mL.

## **2.3 Ultrastructural evaluation of MDCK cells infected with CaHV-1**

In transmission electron microscopy, the positive staining, the CaHV-1 particles showed dense nucleocapsid contained in the seed coat, wrapped the envelope membrane, which had viral glycoproteins on its surface. The virion size was estimated to be approximately 150 nm (Fig. 4B). In some cells, we observed the presence of naked virus with the capsid in intranuclear region (Fig. 3), and also loads contained within intracytoplasmic vesicles. The nucleus of the infected cells showed up clearer, with little presence of chromatin, as well as migration to the perinuclear region. In some infected cells, it was found reduplication of the nuclear membrane with invaginations and karyorrhexis regions (Fig. 3A). Cytoplasm showed signs of degeneration and numerous vesicles of various sizes. Mitochondria were increased and changes in its membranes was also found. In transmission electron microscopy, staining negative for viral concentrate was observed the presence of viral particles aggregated into cell matrix protein. It was also observed an isolated viral particle morphology and characteristics of herpesvirus structures, as shown in Fig. 4B.

## **2.4 PCR results**

DNAs aliquot of the inoculum and culture of MDCK cells that have undergone PCR for Mycoplasma spp, canine adenovirus types 1 and 2, the test showed negativity. The PCR products amplified for gene of CaHV-1 showed

expected bands, confirmed by analysis of sequences generated by sequencing Sanger.

## **2.5 Sequencing of viral genes by Sanger**

The sequences analyzed from the infected kidney tissue fragment and isolation of viral supernatant both showed 100% identity for the glycoprotein B gene with the sequences deposited in GenBank (accession number AF361073 and HQ 846,625).

## **2.6 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE-Pulse Field Gel Electrophoresis)**

From the electrophoresis gel obtained from PFGE, based on molecular weight, CaHV-1 genome has been estimated at 125,218 bp.

## **2.7 Genome resequencing complete by NGS**

The 9,931,106 sequences analyzed obtained from 1 sequencing NGS were found 572,015 reads aligned with the genome of canine herpesvirus. The analyzed sequences showed a genome of 125,187 bp, with a UL region (long only) of 97,457 bp, one US region (one short) of 7,678 bp, terminal repeat TRL and TRS, and internal repetition IRL and IRS. In the presence of 39,536 CG regions, representing 31.6%, 76 genes coding DNA sequences (CDS, coding DNA sequence) and 21 repeating regions. The genomic sequence obtained showed 99.6% identity with the reference genome KT819633.1. molecular divergence of 122 amino acids and 407 nucleotides. CDS with greater divergence in the amino acid sequences was UL50, 38 amino acids, and a sequence of 927 bases was obtained 92% identity (927/853). Then the UL52 gene with 11 divergent amino acid, with 98.9% identity (3063/3028), UL47 (8 amino acids), RS1 (7 amino acids) and UL46 (5 amino acids). The CDS with their respective differences are set out in Table 2 (addendum). The molecular weight of the

complete genome CaHV-1 BTU-1 strain was estimated at 77,302,430 Daltons and 0194 reference strain genome was 77,293,624 Daltons.

The genomic sequence CaHV-1 obtained from the resequencing was deposited in GenBank under accession number KX828242. Due to differences identified in some amino acids was designated as BTU-1 strain.

## 2.8 Phylogenetic analysis

The analysis involved 12 nucleotide sequences. The codon positions were included 1 + 2 + 3 + noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated. A total of 2356 positions set in the final data. The analysis showed similarity with other species *Varicellovirus* and presented bootstrap values above 80 (Fig. 5). In evolutionary analysis, CaHV-1 BTU-1 strain, shared the same branch that the 0194 strain and the same clade with FeHV-1. These species showed a monophyletic relationship relative to HHV-3 and CeHV-9.

## 2. Discussion

We presented the viral isolation of canine herpesvirus, which enabled the structural, morphological and molecular characterization of the agent. The successful isolation of CaHV-1 in MDCK cells may be due to the susceptibility of these cell types and permissivity of renal origin viral agents (Wehner and Smith, 1983; Percy, 1971). Unlike other alphaherpesviruses, which can infect cells of other types *in vitro* hosts, such as herpes simplex virus (HSV - herpes simplex virus) (Karasneh & Shukla, 2011). The only CaHV-1 infected cell lines derived from dog (Nakamichi et al., 2000). Therefore, the CaHV-1 is a species-specific viruses both *in vivo* and *in vitro* (Arii et al., 2009). Thus, attempts viral infection in Vero cells were also performed, but cytopathic effect was only observed in MDCK and DH82 cells (data not shown). Thus, the characteristic cytopathic effects were demonstrated in canine herpesvirus viral isolation similar to those reported by Carmichael et al. (1965b); and Navarro et al. (2003). It was therefore observed dead cells often round up, grouping cell evolving to detached from monolayer cell. It noted the rapid spread on cell culture post-inoculation (about 24 hours)

and destruction of infected cells, as characteristic of herpesvirus as described by Roizmann et al. (1992).

In TEM by positive staining was possible to estimate the size of the viral particle at 150 nm, as reported by other authors (Spertzel et al. 1965 Strandberg & Carmichael, 1965, Smith et al. 1968). However, the size of alphaherpesviruses estimated by negative staining can range 120-300 nm. This is due to the variability of the thickness of the seed coat and can be allocated to the envelope integrity, which makes them impervious and maintain the semi-spherical shape. Virions with damaged envelopes are more permeable to staining and present aspect of "fried egg" (sunny-side up) with irregular shape and diameter generally larger than an intact virion (Roizmann & Furlong 1974), as seen in **Fig. 4B**. Viral aggregates present in the negative staining were also observed, from the viral concentrate as reported by Poste (1972b). However, the structure remained intact viral been observed structural features common to herpesvirus.

The presence of naked viruses, the capsid only with the intranuclear region may be due to viral DNA synthesis and assembly of capsids occur in the nucleus only. In some herpesvirus-envelopment can occur and re-jacketing as it transits through the cytoplasm (Baines & Roizman, 1991), as viewed in Fig. 3, as also occurs in HSV (Banes & Jones, 2011). The full or empty capsids noticed by the density difference may indicate the presence in the genome and / or viral polypeptides also observed by Schrag et al. (1989). In **Fig. 3A**, some virions contained in vesicles were observed both free in the cytoplasm and intranuclear also displayed by Johnson et al. (1970) and Poste (1972a). Reduplication of the nuclear membrane, with regions of invaginations and karyorrhexis (**Fig. 3B**), also reported by Strandberg & Aurelian (1969) were observed. Changes in cellular structures induced by infection and viral activity have been described by some authors, such as viral inclusion corpuscle (Carmichael et al. 1965b, Johnson et al. 1969, Johnson et al. 1970).

In viral titer, the low value of TCID<sub>50</sub> may be due to the low virus production. However, it left to isolate obtained from infected tissue, with two passages in cell culture. Thus, several attempts were performed in order to optimize the viral titer, including using the technique with tubes as described by Navarro (2005).

However, the results were similar (data not shown). Even with the reduction in temperature of incubation of the infected cells as described by Aurelian, (1969) and as recommended for respiratory viruses (Lednicky and Wyatt, 2012). According to Percy et al. (1971) in viral isolation from organ fragments (liver, kidney, lung and spleen) from experimentally infected dogs, low infectivity was obtained in cells inoculated only to the  $10^{-1}$  dilution. This it may indicate a feature of some herpesvirus with respect to low viral replication (Roizmann et al., 1992).

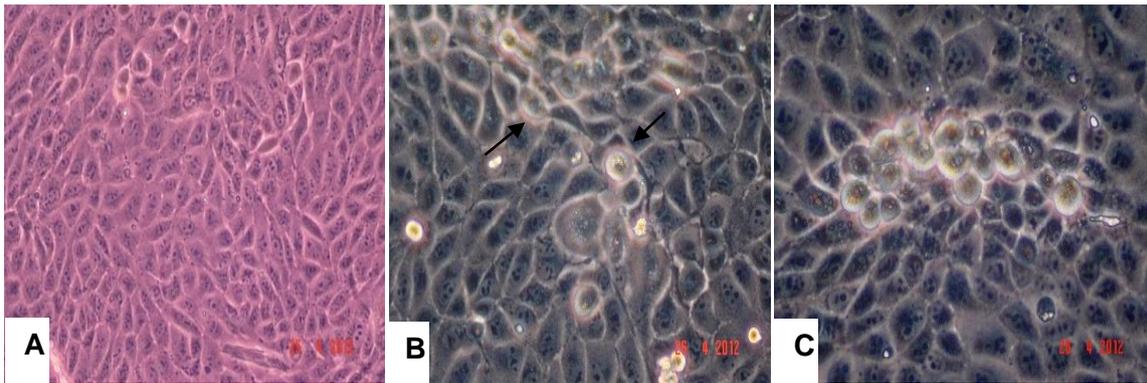
The negativity of the PCR mycoplasma and canine adenovirus types 1 and 2, ruled out the possibility of contamination of the inoculated organ and cell culture to these agents, which are considered as cell culture contaminants (Spertzel et al. 1965 Kuppeveld et al. 1994). Moreover, canine adenoviruses can also produce cytopathic effects in MDCK cells and can cause death in young dogs (Almes 2010).

We presented demonstrates that viral isolation of CaHV-1 was successful allowing visualization of characteristic cytopathic effects of viral structures and intracellular changes in infected cells. The use of molecular techniques can aid in the detection and identification of viruses in culture. Whereas some viruses may have similar cytopathic effects and cases of coinfection with other types of herpesvirus they have been reported by Sampaio et al. (2012) and Tang et al. (1997). Furthermore, there is evidence of other types of herpesvirus in dogs beyond CaHV-1, as Epstein Barr Virus (HHV-4) (Huang et al, 2012; Milman et al, 2011; Chiou et al., 2005). Furthermore, the molecular detection permits the identification of contamination with microbiological agents in cell cultures that do not cause cytopathic effects, or cytolysis. This condition is essential in the production of vaccines to ensure that only the virus of interest is being produced, avoiding the presence of other concomitant agents, undesirably (Baigent et al, 2006;. Vögtlin et al., 1999). It also allows the monitoring of the virus in cell culture with the production of kinetic, genetic and structural change (Emma & Kamen, 2013; Schatzmayr, 2003). Thus, the sequences obtained from the DNA polymerase gene region, glycoprotein B and thymidine kinase from viral isolation and animal tissue fragment naturally infected, showed identity 97-100% with the sequences already published, confirming the identification of canine herpesvirus. In addition to full viral genomic resequencing, from CaHV-1 of the insulation product, allowing the identification of BTU-1 strain. The complete genome of

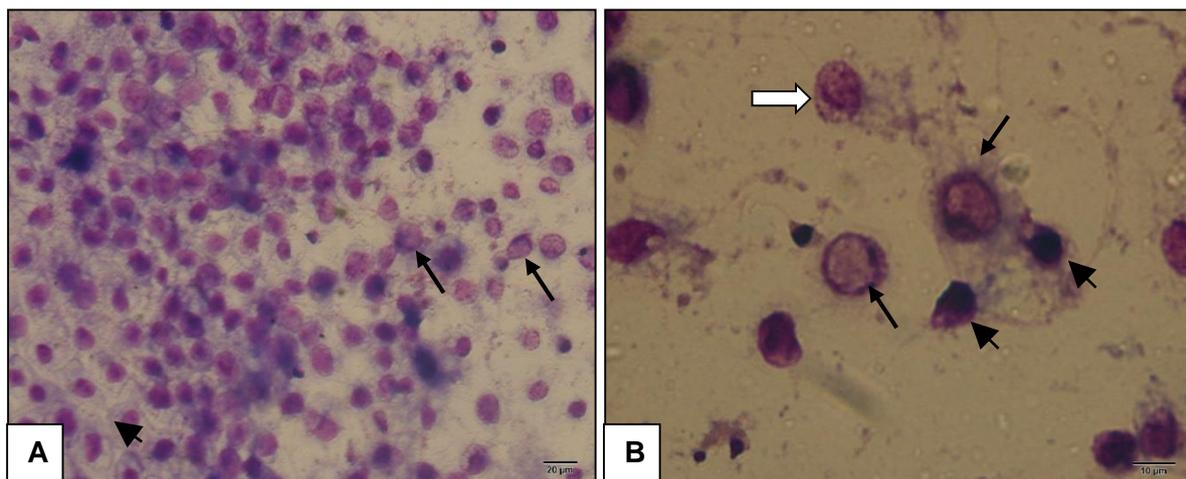
CaHV-1 strain BTU-1 found 99.6% identity relative to the reference genome, but also differences were found of 122 amino acids and 407 nucleotides. This fact indicates a genotypic characteristic of the BTU-1 strain. The molecular weight CaHV-1 genome BTU-1 strain was estimated at 77,302,430 Daltons. Comparatively, HHV-3 (X04370) of 124,884 bp has about 77,067. 674 kDa and feline herpesvirus (FJ478159) to 135,797 bp was estimated to be about 83,853,968 kDa (estimated at 80 million kDa by Herman et al, 1984). However, Lust (1974) had estimated molecular weight of canine herpesvirus in 63 million Daltons, by sedimentation equilibrium neutral sucrose gradients. This difference stems from the methodology employed. Phylogenetic analysis was based on the glycoprotein B gene, which is considered one of the most conserved among genes and homologous herpesvirus (Franti et al., 1998). Moreover, glycoprotein B subunit vaccine used in the production CaHV-1 prophylaxis of breeding bitches. Molecular phylogenetic analysis demonstrated similarity of CaHV-1 BTU-1 strain with other species within the genus *Varicellovirus*. Strains BTU-1 and 0194 showed to share the same branch, indicating genomic similarity (Fig. 5). The bootstrap values of 5,000 replicates indicate reliability and robustness analysis.

### **3. Conclusion**

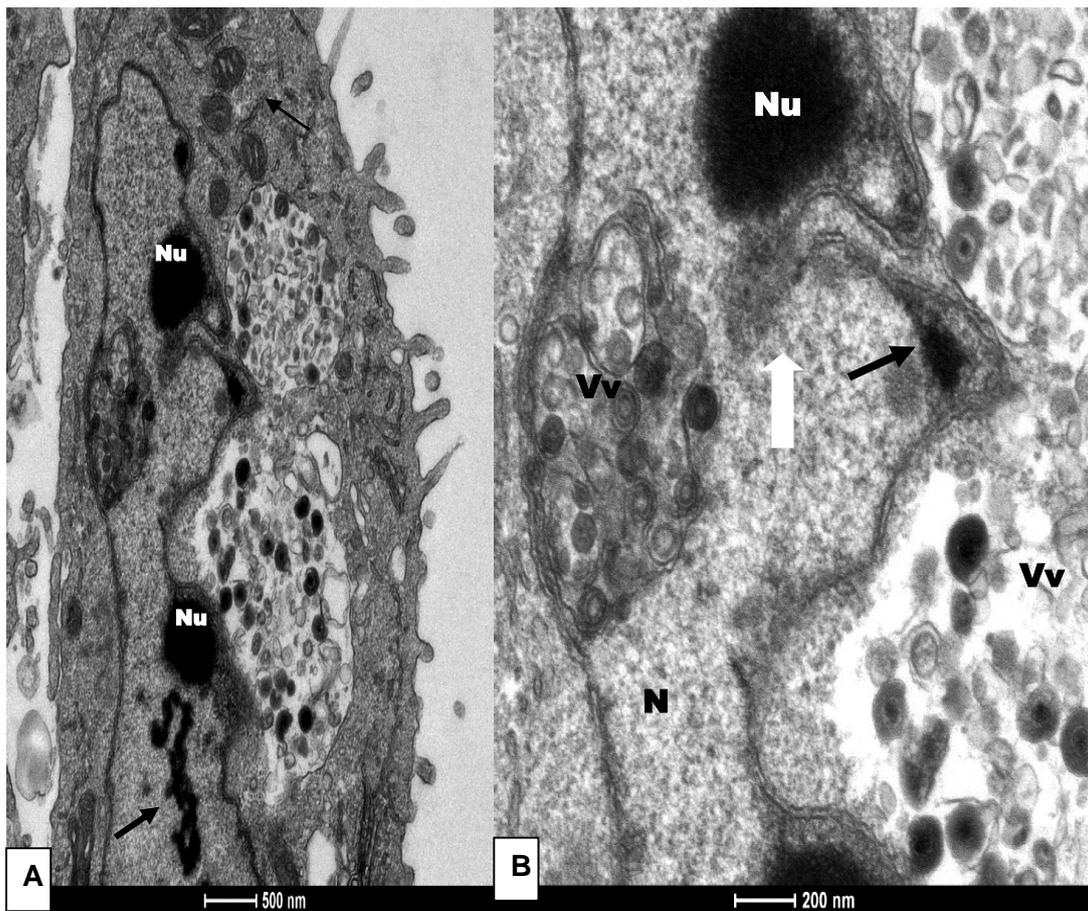
Viral isolation CaHV-1 was successfully performed allowing the identification and description of the characteristic cytopathic effects of viral structures and intracellular changes. Moreover, multiplication and virus production led to the evaluation of the viral structure and application of molecular techniques for genotypic characterization. The transmission electron microscopy allowed the visualization and identification CaHV-1 viral structural. With the massive sequencing by NGS it was possible to assemble the complete genome sequence of canine herpesvirus identified in Brazil. NGS also showed with the reference 99.6% identity to the sequence used as reference that was sequenced isolates from the United Kingdom, indicating small variation. Thus, the application of massive sequencing technologies and analysis tools possible to estimate with higher efficiency molecular characterization data of the agents studied.



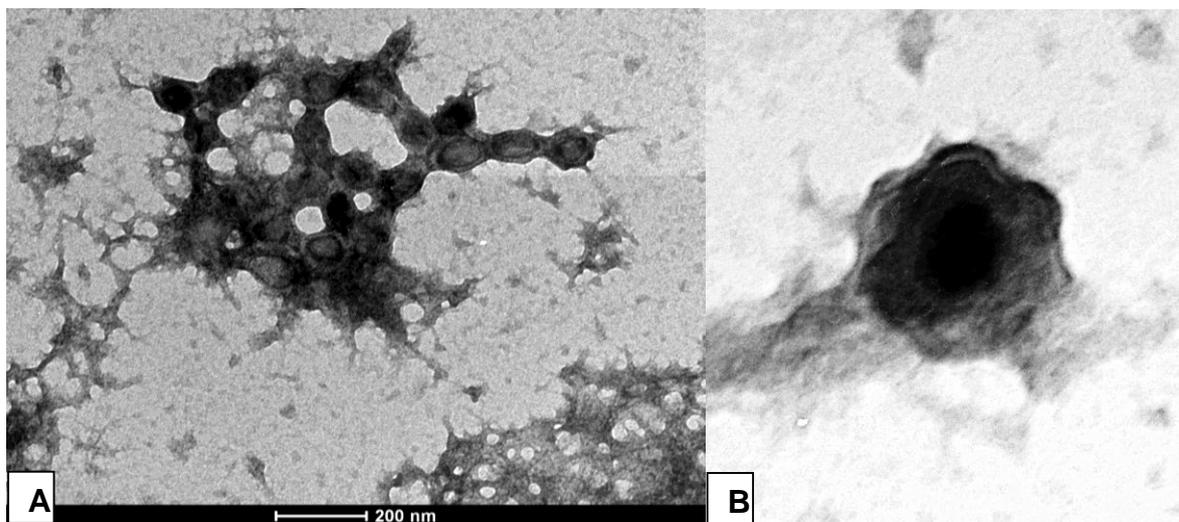
**Fig. 1.** Culture cells infected with CaHV-1 with cytopathic effects. **A** - Monolayer of MDCK cells on the day of inoculation. **B** - 24 hours post-inoculation starting CPE with refractile cells and rounding (arrow), cell swelling (arrowhead); **C** - CPE characteristic of focus CaHV-1 with grouping of cells presenting a "bunch of grapes" detaching from cell monolayer (40X objective).



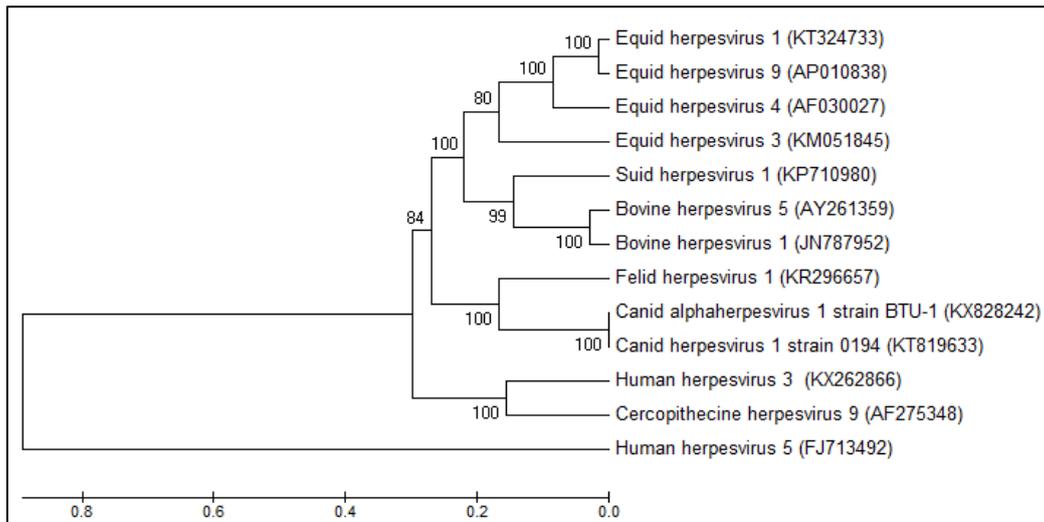
**Fig. 2 -** MDCK cell culture infected with HCV-1 stained with the dye Giemsa. **A** - 40X objective - viral inclusion with cell display (arrows); cells releasing cell monolayer and even whole cells in monolayer cells (arrowhead). Scale bar 20  $\mu$ M. **B** - 100X objective with immersion oil - cells display with marginalization of chromatin to perinuclear region, indicating the presence of viral inclusion in the cell (arrow), picnotic cells (arrowhead) and karyolysis (white arrow). Scale bar 10  $\mu$ M



**Fig. 3** - The presence of vesicles containing intranuclear viral particles and cytoplasmic. **A** - viral vesicles (Vv) clear and pale nucleus due to the small amount of chromatin also presents with clotted appearance (arrow), nucleoli located on the periphery of the cell nucleus (Nu) and increased mitochondria (arrow). **B** - anisocariótico cell nucleus (N) and Nucleolar (Nu), presence of invagination and disruption of the nuclear membrane (white arrow) heterochromatin (black arrow) and viral vesicles (Vv) bordering the nuclear membrane.



**Fig. 4.** Transmission electron microscopy from viral concentrated in negative staining. **A** - particles aggregate of CaHV-1. Scale bar 200 nm. **B** - Viral particle isolated of CaHV-1.



**Fig. 5.** Phylogenetic trees unrooted based on the glycoprotein B gene between species of the genus *Varicellovirus*. The branch of human herpesvirus 5 / HHV-5 (FJ713492) as outgroup. Dendogram presenting length of the branches proportional to the number of measured changes and the rate associated with clusters in the bootstrap test (5000 repetitions) are shown next to the branches close to us. The tree was drawn to scale, with lengths of branches in the same units as the evolutionary distances.

## References

- Almes M.K., Janardhan K.S., Anderson J., Hesse R.A., Patton, K.M., 2010. Fatal canine adenovirus Pneumonia in two litters of bulldog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 22, 780-784.
- Arii, J.; Kato, K.; Kaqaguchi, Y.; Tohya, Y. Akashi, H. 2009. Analysis of herpesvirus host specificity determinants using herpesvirus genomes as bacterial artificial chromosomes. *Microbiology and Immunology* 53, 433–441.
- Avila V.P.F., Rodrigues N.C., Cesaro C., Esmeraldino A.T., Fallavena L.C.B., Braga A.C., Cerva C., 2011. Herpesvirus canino em filhotes da raça Golden Retriever - relato de caso. *Clínica Veterinária* 92, 52-56.
- Aydin, H., Azimi, F. C., Cook, J. D., Lee, J. E., 2012. A Convenient and General Expression Platform for the Production of Secreted Proteins from Human Cells. *Journal of Visualized Experiments: JoVE* 65, 40-41.
- Baigent, S., Nair, V., Currie, R., 2006. Real-time quantitative PCR for Marek's disease vaccine virus in feather samples: applications and opportunities. *Developmental Biology (Base1)* 126, 271-81.
- Baneth, G., Harrus, S., Ohnona, F. S., Schlesinger, Y., 2009. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. *Veterinary Microbiology* 136, 321–325.
- Boya, P., Pauleau, A.-L., Poncet, D. et al. 2004. Viral proteins targeting mitochondria: controlling cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1659, 178-189.
- Brum M.C. & Weiblen R., 2012. Detecção, Identificação e Quantificação de Vírus In: Flores, E.F. *Virologia Veterinária*. Editora UFSM, Santa Maria, pp. 55-82.
- Carmichael, L.E., 1970. Herpesvirus canis: aspects of pathogenesis and immune response. *Journal American Veterinary Medicine* 156, 1714-1721.
- Carmichael, L.E., Squire, R.A., Krook, L., 1965a. Clinical and pathological features of a fatal disease of newborn pups. *American Journal of Veterinary Research* 26, 803-814,
- Carmichael, L.E., Strandberg, J.D., Barnes F.D., 1965b. Identification of a cithopathogenic agent infectious for puppies as canine herpesvirus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 120, 644-650.
- Chiou SH, Chow KC, Yang CH, Chiang SF, Lin CH., 2005. Discovery of Epstein-Barr virus (EBV)-encoded RNA signal and EBV nuclear antigen

leader protein DNA sequence in pet dogs. *Journal of General Virology* 86(4):899-905.

Davison, A. J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G. S., McGeoch, D. J., Minson, A. C., Thiry, E. (2009). The Order *Herpesvirales*. *Archives of Virology*, 154(1), 171–177.

De Palma, V.E., Ayala, M.A., Gobello, C., Echeverria, M.G., Galosi, C.M., 2010. An atypical clinical presentation for the first isolation of Canid herpesvirus 1 in Argentina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 62, 1267-1270.

Decaro, N., Elia, G., Martella V., Desario, C., Campolo, M., Trani, L.D., Tarsitano, E., Tempesta, M., Buonavoglia, C., 2005. A real time PCR assay for rapid detection and quantification of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. *Veterinary Microbiology* 105, 1,19-28.

Decaro, N., Amorisco, F., Desario, C., Lorusso, E., Camero, M., Bellacicco, A.L., Sciarretta, R., Lucente, M.S., Martella, V., Buonavoglia, C., 2010. Development and validation of a real-time PCR assay for specific and sensitive detection of canid herpesvirus 1. *Journal of Virological Methods* 169, 176-18.

Doerr, H.W., 2013. Replacement of biologic by molecular techniques in diagnostic virology: Thirty years after the advent of PCR technology - do we still need conventional methods? *Medical Microbiology and Immunology* 202, 391–392.

Elia, G., Decaro, N., Martella, V., Cirone, F., Lucente, M.S., Lorusso, E., Di Trani, L., Buonavoglia, C., 2006. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 36, 171-176.

Emma, P., Kamen, A. 2013. Real-time monitoring of influenza virus production kinetics in HEK293 cell cultures, *Biotechnology Progress* 29 (1), 275-284.

Faulhaber J. R., Nelson P.J., 2007. Virus-Induced Cellular Immune Mechanism of Injury to the Kidney. *Clinical Journal of American Society of Nephrology* 2, S2–S5.

Franti, M., Aubinm J-T., Poirel, L., Djean-Gautheret, A., Candotti, D., Huraux, J-M., Agut, H. Definition and Distribution Analysis of Glycoprotein B Gene Alleles of Human Herpesvirus 7. 1998. *Journal of Virology* 72 (11), 8725-8730.

Gadsden, B.J., Maes, R.K., Wise, A.G., Kiupel, M., Lagohr, I.M. 2012. Fatal Canid herpesvirus 1 infection in adult dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24, 604-607.

Goldsmith, C.S., Ksiazek, T. G., Rollin, P.E., Comer, J.A., Nicholson, W.L., et al., 2013. Cell Culture and Electron Microscopy for Identifying Viruses in Diseases of Unknown Cause. *Emerging Infectious Diseases* 19 (6), 886-891.

Hashimoto, A., Hirai, K., Okada, K., Fujimoto, Y., 1979. Pathology of the placenta and newborn pups with suspected intrauterine infection of canine herpesvirus. *American Journal of Veterinary Research* 40, 1236-1240.

Hashimoto, A., Katsuya H. 1984. Pathological finding in a surviving pup transplacentally infected with canine herpesvirus. *Research Bulletin of Faculty of Agriculture of Gifu University* 49, 391-399.

Heinemann M.B., Garcia,J.F., Nunes, C.M,Gregori, F., Higa, Z.M.M., Vasconcellos, S.A., Richtzenhain, L.J. 2000. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Veterinary Microbiology* 73(4):261-267.

Hematian, A., Sadeghifard, N., Mohebu, R., Taherikalani, M., Nasrolahi, A., Amaraei, M., Ghafourian, S., 2016. Traditional and modern cell culture in virus diagnosis. *Osong Public Health and Research Perspective* 7, 77-82.

Herman, S.-C., Gaskell, R. R., Ehlers, B., Ludwig, H., 1984. Characterization of the feline herpesvirus genome and molecular Epidemiology of isolates from natural outbreaks and latent infections. *Current Topic in Veterinary Medicine and Animal Science* 27, 321-336.

Honess, R.W., Watson, D.H., 1977. Unit and Diversity in the herpesvirus. *Journal of General Virology* 37, 15-37.

Hsiung G.D., 1989. The impact of cell culture sensitivity on rapid viral diagnosis: A historical perspective. *Yale J Biol Med.*, 62(2):79-88.

Hu, R.L., Huang, G., Qiu, W.,Zhong, Z.F., Xia, X.Z., Yin, Z., 2001. Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerization Chain Reaction. *Veterinary Research Communication* 25, 77-84.

Huang SH, Kozak PJ, Kim J, et al., 2012. Evidence of an oncogenic gammaherpesvirus in domestic dogs. *Virology* 427(2):107-117. doi:10.1016/j.virol.2012.02.013.

Indrebø, A., Trangerud, C., Moe, L., 2007. Canine neonatal mortality in four large breeds. *Acta Veterinaria Scandinavica* 49 (Suppl 1): S2.

Inkelmann, M.A., Kommers, G.D. Trost, M.E., Barros, C.S.L., Figuera, R.A., Irigoyen, L.F., Silveira, I.P., 2012. Lesões do sistema urinário em 1063 cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 32, 761-771.

Johnson, G.R., Koestner, A., Kindig, O., Long, J.F. 1970. Effects of a pathogenic canine herpesvirus on canine brain cell culture and cerebellar explants. *Acta Neuropathology* 15, 97-113.

Johnson, G.R., Koestner, A., Kindig, O., Shaddock, J.A., 1969. Effects of a pathogenic canine herpesvirus on established thyroid adenocarcinoma cell culture. *Veterinary Pathology* 6, 289-309.

Karasneh, G. A., Shukla, D., 2011. Herpes simplex virus infects most cell types in vitro: clues to its success *Virology Journal* 8:481.

Kawakami, K., Ogawa, H., Maeda, K., Imai, A., Ohashi, E., Matsunaga, S., Tohya, Y., Ohshima, T., Mochizuki, M., 2010. Nosocomial outbreak of serious canine herpesvirus infectious tracheobronchitis (Kennel cough) caused by canine herpesvirus infection, *Journal of Clinical Microbiology* 48, 1176-1181.

Larsen, R.W., Kiupel, M., Balzer, H.-J., Agerholm, J.S., 2015. Prevalence of canid herpesvirus-1 infection in stillborn and dead neonatal puppies in Denmark. *Acta Veterinaria Scandinavica* 57(1), 1-7.

Ledbetter, E.C., Kim, S.G., Dubovi, E.J., Bicalho, R.C., 2009. Experimental reactivation of latent canine herpesvirus-1 and induction of recurrent ocular disease in adult dogs. *Veterinary Microbiology*. 138, 98-105.

Ledbetter, E.C., 2013. Canine Herpesvirus-1 ocular diseases of mature dogs. *New Zealand Veterinary Journal*. E-pub ahead of print:1-9.

Lee, J.S., Raja, P., Knipe, D.M., 2016. Herpesviral ICP0 Protein Promotes Two Waves of Heterochromatin Removal on an Early Viral Promoter during Lytic Infection. *mBio* 7(1), e02007-15. doi:10.1128/mBio.02007-15.

Leland, D.S., Ginocchio, C.C., 2007. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clinical Microbiology Reviews* 20(1):49-78.

Lieberman, P.M., 2006. Chromatin regulation of virus infection. *Trends in Microbiology* 14, 132-139.

Linderbeg, A.M., Andersson, P., Savolainen, C., Mulde, M.N., Hovi, T., 2003. Evolution of the genome of Human enterovirus B: incongruence between phylogenies of the VP1 and 3CD regions indicates frequent recombination within the species. *Journal of General Virology* 84, 1223–1235

Lust G., Carmichael L., 1974. Properties of canine herpesvirus DNA. Abstract. *Experimental Biology and Medicine* 46, 213-217.

Milman G, Smith KC, Erles K., 2011. Serological detection of Epstein-Barr virus infection in dogs and cats. *Vet Microbiol.* 150(1-2):15-20. doi:10.1016/j.vetmic.2010.12.013.

Navarro, C., Celedón, M., Pizarro, A., 2003. Detección de virus herpes canino tipo 1 no Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria* 35 (2), 227-231.

Navarro, C., Celedón, M., Pizarro, J., Gaggero, A., 2005. Virus herpes canino en Chile: propiedades biológicas. *Archivos de Medicina Veterinaria* 37(2), 133-137.

Ogilvie, M., 2001. Molecular techniques should not now replace cell culture in diagnostic virology laboratories. *Reviews in Medical Virology*. 11 (6), 351-354

Papageorgiou, K.V., Suárez, N.M., Wilkie, G.S., McDonald, M., Graham, E.M., Davison, A.J. 2016. Genome Sequence of Canine Herpesvirus. *Plos One* 11(5), 1-11.

Patel, J.R., Heldens, J.G.M., 2009. Review of companion animal viral disease and immunoprophylaxis. *Vaccine* 27, 491-504.

Percy, D.H., Carmichael, L.E., Albert, D.M., King, J.M., 1971. Lesions in puppies surviving infection with canine herpesvirus. *Veterinary Pathology* 8, 37-53.

Percy, D.H., Olande, J., 1968. Carmichael, L.E. Encephalitis in the Newborn pup due to a canine herpesvirus. *Pathology Veterinary* 5, 135-145.

Poste, G., 1972b. Characterization of a New Canine Herpes Virus. *Archiv für die gesamte Virusforschung* 36, 147-157.

Poste, G., Lecatsas, G., Apostolov, K., 1972a. Electron microscope study of the morphogenesis of a new canine herpesvirus in dog kidney cells. *Archiv Für Die Gesamte Virusforschung* 39, 317-329.

Prasad A, Remick J, Zeichner SL., 2013. Activation of human herpesvirus replication by apoptosis. *Journal of Virology* 87(19):10641-10650. doi:10.1128/JVI.01178-13.

Ratushna, V.G.; Sturgill, D.M.; Ramamoorthy, S.; Reichow, S.A.; He, Y.; Lathigra, R.; Sriranganathan, N.; Halling, S.M. Boyle, S.M.; Gibas, C.J. Molecular targets for rapid identification of *Brucella* spp. *BMC Microbiol.*, v. 22, P. 6- 13, 2006.

Reading, M.J., Field, H.J., 1999. A serological study of canine herpes virus-1 infection in the English dog population. *Archives of Virology*. 143: 1477-1488.

Reading, M.J., Field, H.J., 1999. Detection of high levels of canine herpes virus-1 neutralising antibody in kennel dogs using a novel serum neutralisation test. *Research in Veterinary Science* 66(3): 273-275.

Reed, L.J., Münch, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene* 27 (3), 493- 497.

Roizman B., Furlong, D., 1974. The replication of herpesvirus. In: FRAENKEL-CONRAT H, WAGNER, R.R. *Comprehensive Virology* 3, 229-403.

Roizmann, B., Descrosiers, R.C., Fleckenstein, B., Lopez, C., Minson, A.C., Studdert, M.J., 1992. The family Herpesviridae: an update. *Archive of Virology* 123,425-449.

Sambrook, J.; Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning – A laboratory manual*, 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sampaio, A.M., Guardia, A.C., Milan, A., Sasaki, A.N., Andrade, P.D., Bonon, S.H., Stucchi, R.S., Botelho Costa, S.C., Boin, I.F., 2012. Co-infection and Clinical Impact of Human Herpesvirus 5 and 6 in Liver Transplantation. *Transplantation Proceedings* 4, 2455-2458.

Schatzmayr, H.G., 2003. Novas perspectivas em vacinas virais. *Hist. Cien. Saude-Manguinhos* [on-line] 10 (2), 655-669

Schulze, C, Baumgärtner, W., 1998. Nested Polymerase Chain Reaction and In Situ Hybridization for Diagnosis of Canine Herpesvirus Infection in Puppies. *Veterinary Pathology*. 35, 209-217.

Sesso A., Fixação de sistemas biológicos. 1998. In Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas, Souza, W. *Sociedade Brasileira de Microscopia* 14-15.

Sirigireddy, K. R., Ganta, R. R., 2005. Multiplex detection of *Ehrlichia* and *Anaplasma* species pathogens in peripheral blood by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Molecular Diagnostics* 7, 308–316

Smith, R.F., Yamashiroya, H.M., Magis, J.M., 1970. Recovery of a canine herpesvirus from primary kidney culture derived from a closed dog colony. *Applied Microbiology*. 20 (3), 523-526.

Souza, W., Machado, R.D. 1998. Desidratação, Inclusão, Ultramicrotomia e Contratação. In: Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas, Souza, W. *Sociedade Brasileira de Microscopia*. 14-15.

Spear, P., Longnecker, R., 2003. Herpesvirus entry: an Update. *Journal of Virology* 77(9), 10179-10185.

Spertzel, R.O., Huxsoll, D.L., Mcconnel, S.J., Binn, L.N., Yager. R.H., 1965. Recovery and characterization of a Herpes-like from dog kidney cell

culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 120, 651-655.

Strandberg, D. J., Aurelian, L., 1969. Replication of canine herpesvirus - II Virus development and Release in infected dog kidney cells. *Journal of Virology* 4 (4), 480-489.

Strive, T., Hardy, C.M., Wright, J., Reubel, G.H. 2007. A virus vector based on canine herpesvirus of vaccine applications in canids. *Veterinary Microbiology* 119, 173-183.

Tang, Y.W., Espy, M.J., Persing, D.H., Smith, T.F., 1997. Molecular evidence and Clinical significance of herpesvirus coinfection in the central nervous system. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 2869-2872.

Van Kuppeveld, F.J.M., Johansson, K. Galama, J.M.D., Kissing, J., Bolske, G., Van Der Logt, J.T.M., Melcher, W.J.G., 1994. Detection of mycoplasma contamination in cell by mycoplasma group-specific. *Applied Environmental Microbiology* 60 (1), 149-152.

Van Kuppeveld, F.J.M., Logt, J.T.M., Angulo, A.F., Quint, W.G., Niester, H.G., Galama, J.M., Melcher, W.J., 1992. Genus and species identification of micoplasma by 16S RNA amplification. *Applied Environmental Microbiology* 58 (8), 2606-2615.

VanDevanter, D.R., Warrener, P., Bennett, Schultz, E.R., Coulter, Garber, R.L., Rose, T.M., 1996. PCR Detection and Analysis of Diverse Herpesviral Species by Consensus Primer. *Journal of Clinical Microbiology* 34(7) 1666–1671.

Verstegen, J., Dhaliwal, G., K. Verstegen-Onclin, K., 2008. Canine and feline pregnancy loss due to viral and non-infectious causes: A review. *Theriogenology* 70, 304-319.

Vögtlin, A., Bruckner, L., Ottiger, H. P., 1999. Use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of vaccine contamination by laryngotracheitis virus. *Vaccine* 17 (20-21) 2501-6.

Xu, X., Zhang, K., Huang, Y., Ding, L., Chen, G., Zhang, H., Tong, D., 2012. Bovine herpes virus type 1 induces apoptosis through Fas-dependent and mitochondria-controlled manner in Madin-Darby bovine kidney cells. *Virology Journal* 9, 202.