

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA  
CELULAR E MOLECULAR

RAFAELA MANFRO RORATO ANDREATTA

**PESQUISA DE HERPESVÍRUS 6 EM AMOSTRAS DE  
TECIDO CEREBRAL DE PACIENTES SUBMETIDOS À  
CIRURGIA COMO TRATAMENTO PARA EPILEPSIA**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira  
Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Virgínia Minghelli Schmitt

Porto Alegre, Março de 2011

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA  
CELULAR E MOLECULAR

RAFAELA MANFRO RORATO ANDREATTA

**PESQUISA DE HERPESVÍRUS 6 EM AMOSTRAS DE TECIDO CEREBRAL  
DE PACIENTES SUBMETIDOS À CIRURGIA COMO TRATAMENTO PARA  
EPILEPSIA**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira  
Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Virgínia Minghelli Schmitt

Porto Alegre,  
Março de 2011

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR**

**RAFAELA MANFRO RORATO ANDREATTA**

**PESQUISA DE HERPESVÍRUS 6 EM AMOSTRAS DE TECIDO CEREBRAL  
DE PACIENTES SUBMETIDOS À CIRURGIA COMO TRATAMENTO PARA  
EPILEPSIA**

**Porto Alegre  
2011**

**RAFAELA MANFRO RORATO ANDREATTA**

**PESQUISA DE HERPESVÍRUS 6 EM AMOSTRAS DE TECIDO CEREBRAL  
DE PACIENTES SUBMETIDOS À CIRURGIA COMO TRATAMENTO PARA  
EPILEPSIA**

**Dissertação apresentada como  
requisito para obtenção do grau de  
Mestre pelo Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Celular e  
Molecular da Faculdade de  
Biociências da Pontifícia  
Universidade Católica do Rio Grande  
do Sul.**

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira**

**Co-orientadores: Prof<sup>a</sup>. Dra. Virgínia Minghelli Schmitt**

**Porto Alegre  
2011**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Carlos Alexandre S. Ferreira, pelo apoio, atenção e compreensão sempre. Muito Obrigada!

À Prof. Dra. Virgínia Minghelli Schmitt, por me apoiar em todos os momentos e pelo incentivo desde a graduação. Pelo carinho, pelos ensinamentos e pela amizade construída ao longo da minha trajetória acadêmica. Não existem palavras para expressar o quanto sou grata.

Ao Prof. Dr. Ney A. Azambuja, por tornar possível a realização desta pesquisa, pela atenção, apoio e compreensão. Muito Obrigada!

Ao Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa, por confiar a mim a responsabilidade da realização desta pesquisa, e pela atenção.

A todos os professores docentes do PPGBCM da PUCRS que de alguma forma contribuíram para minha formação profissional.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Às ICs Kayene e Nathália, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu filho Arthur – amor da minha vida – que me dá forças em todos os momentos.

Aos meus pais, Eloi e Minglan, pelo apoio, incentivo e amor em todos os momentos. Obrigada por estarem ao meu lado em todos os momentos e acreditarem em mim! Amo vocês.

À minha irmã Giovana, pela assistência e carinho sempre. Eu te amo, minha irmã.

Por fim, ao meu marido Marcelo, por ser meu maior incentivador. Obrigada pelo carinho, compreensão, paciência e apoio sempre. Por todos desabafos e choros, por ser o meu companheiro e melhor amigo. Pelas incontáveis viagens. Obrigada pelo amor, por estar comigo e por sempre acreditar em mim! Eu te amo.

## RESUMO

O Herpesvírus Humano tipo 6 (HHV-6) é um vírus da família *Herpesviridae* associado ao desenvolvimento de roséola infantil ou exantema súbito, doença caracterizada por febre alta, *rash* cutâneo e ocasionalmente convulsões febris. A prevalência mundial de infecção por HHV-6 é alta. Estima-se que cerca de 83% das crianças até 13 meses e mais de 95% das com idade até 2 anos já entraram em contato com o vírus. Existem duas variantes do HHV-6 já identificadas, as variantes A e B, sendo o HHV-6B o agente principal relacionado aos casos de roséola infantil.

Epilepsia é um termo aplicado a um grupo de patologias crônicas caracterizadas, principalmente, pela ocorrência de crises epiléticas. As epilepsias representam em torno de 1% dos distúrbios neurológicos que afetam a população mundial. As crises são provocadas por uma disfunção da atividade elétrica cerebral associada a anormalidades estruturais e metabólicas causadas, em alguns casos, pela presença de vírus no sistema nervoso central.

Por apresentar características como neurotropismo e latência no sistema nervoso central, procuramos relacionar o HHV-6 com a epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM). Através de reação em cadeia da polimerase (PCR), pesquisamos a presença do vírus em 42 amostras de hipocampo de 14 pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM) submetidos a amígdalo-hipocampectomia (AH) ou lobectomia temporal anterior (LTA) como tratamento para a epilepsia. Três amostras de cada paciente foram analisadas: cabeça, corpo e cauda do hipocampo. O DNA do HHV-6 foi detectado em 12 dos 14 pacientes (85,7%) com ELTM. Três pacientes foram positivos em todas as três amostras, 4 pacientes foram positivos em duas amostras e 5 em apenas uma amostra. Com relação à origem das amostras, 7 foram positivas na cabeça do hipocampo, 8 no corpo do hipocampo e 7 na cauda do hipocampo, demonstrando não haver um sítio de preferência para o estabelecimento do vírus. A positividade para HHV-6 encontrada nos pacientes deste estudo é maior do que os dados encontrados na literatura. Uma possível explicação para esta elevada positividade poderia ser as diferenças na concepção do estudo, com três amostras coletadas de cada paciente, o que

pode ser mais representativo do que a coleta de apenas uma amostra. Nossos resultados reforçam a hipótese de um possível papel da infecção pelo HHV-6 na epilepsia.

Palavras-chave: Herpervírus humano tipo 6, HHV-6, Epilepsia do Lobo Temporal Mesial

## **ABSTRACT**

Human herpesvirus 6 (HHV-6) is a Betaherpesvirus associated with Roseola Infantum (Exanthema Subitum) in primary infection. Due to its neurotropic characteristic and latency in the central nervous system, many reports associate HHV-6 with epilepsy, febrile seizures, multiple sclerosis and others neurologic diseases. In this study, HHV-6 DNA was investigated in 42 hippocampal samples from 14 patients with mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) submitted to amygdalohippocampectomy (AH) or anterior temporal lobectomy (ATL) surgeries using a nested polymerase chain reaction (PCR). Three samples from each patient were collected and analyzed: from hippocampal head, body and tail. HHV-6 was detected in twelve of fourteen patients (85.7%) with MTLE. Analyzing the samples resulting positive for HHV-6, all three samples were positive in three patients, in four patients two samples were positive and in five patients only one sample was positive. According to the origin of samples, seven samples from hippocampal head were positive, eight from hippocampal body and seven from hippocampal tail, showing no preferential site for viral establishment. HHV-6 positivity found in patients of the present study is higher than data found in the literature. A possible explanation would be differences in the study design, with three samples collected from each patient, which could be more representative than only one sample. Our results corroborate the hypothesis of a possible role of HHV-6 infection in epilepsy.

Keywords: Human Herpesvirus 6, viral DNA, Mesial Temporal Lobe Epilepsy



## LISTA DE ABREVIACOES

HHV-6 – Herpesvírus Humano tipo 6

PBMC – Células Mononucleares do Sangue Perifrico

HIV – Vrus da Imunodeficincia Humano

HBLV - Vrus Linfotrpico de Células B Humano

HHV-7 – Herpesvírus Humano tipo 7

ORF – Matriz de Leitura Aberta (*open reading frame*)

DR – Repetições diretas

Células NK – Células Natural Killer; Células assassinas naturais

EM – Esclerose Múltipla

ELT – Epilepsia do Lobo Temporal

ELTM – Epilepsia do Lobo Temporal Mesial

AH – Amigdalohipocampectomia

LTA – Lobectomia Temporal Anterior

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Corte coronal da porção média do hipocampo esquerdo.  
Representação da região CA1, local de origem das amostras estudadas..... 7

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....</b>	<b>1</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 HERPESVÍRUS HUMANO TIPO 6 (HHV-6).....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1 Breve Histórico.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.2 Características do Vírus.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.3 Incidência.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.4 Manifestações Clínicas.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.5 Transmissão.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2 EPILEPSIA.....</b>	<b>5</b>
<b>1.2.1 Epilepsia do Lobo Temporal Mesial.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2.2 Tratamento cirúrgico em pacientes com epilepsia.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3 INFECÇÕES VIRAIS NO SISTEMA NERVOSO E EPILEPSIA.....</b>	<b>7</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>9</b>
<b>CAPÍTULO 2 - ARTIGO.....</b>	<b>10</b>
<b>CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>24</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>26</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>32</b>

## **CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

### **1 INTRODUÇÃO**

#### **1.1 HERPESVÍRUS HUMANO TIPO 6 (HHV-6)**

##### **1.1.1 Breve Histórico**

Pode-se dizer que o descobrimento do HHV-6 foi consequência do aprimoramento e avanço da tecnologia que permite o cultivo prolongado *in vitro* de linfócitos primários. Este vírus foi isolado pela primeira vez em 1986, a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes adultos portadores de doenças linfoproliferativas ou do vírus da imunodeficiência humano (HIV) (Braun et al, 1997, Stoeckle, 2000). A descoberta deste novo herpesvírus foi confirmada por laboratórios em diversos continentes. O HHV-6 foi denominado primeiramente Vírus Linfotrópico de Células B Humano (HBLV) por apresentar tropismo por células B e ser associado a linfoma de células B em indivíduos portadores de HIV. Posteriormente, estudos mais aprofundados demonstraram o tropismo por células T CD4+ e outros tipos celulares, e assim, seguindo normas do Comitê Internacional de Taxonomia Viral e, não relacionando o nome ao tropismo, o vírus foi denominado Herpesvírus Humano Tipo 6 (Braun et al, 1997; Cermelli et al, 2003; De Bolle et al, 2005; Gallo, 2006).

##### **1.1.2 Características do Vírus**

O HHV-6 é um vírus que pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Betaherpesvirinae*, e, junto com o HHV-7, forma o gênero *Roseolovirus* (Caserta et al, 2001). A partícula viral é formada por um envelope, um tegumento e um capsídeo icosaédrico, que contém uma molécula de DNA dupla fita linear (Bernstein e Schleiss, 1996) de aproximadamente 160.000 pb, com variações de tamanho entre as variantes (Gompels et al, 1995; Dominguez et al, 1999; Stoeckle, 2000; Dockrell, 2003). O genoma do vírus contém uma região central única (U) de aproximadamente 142.000 pb, contendo as matrizes

de leitura aberta (ORFs) U1-U100 e 8-9.000 pb de repetições terminais diretas (DR) em ambas extremidades (Dockrell, 2003; Mori, 2009). Foram identificadas as variantes A e B do HHV-6, distintas por características genéticas, imunológicas e moleculares, que, apesar de apresentarem grau de similaridade de nucleotídeos maior do que 90%, possuem patogênese e manifestações clínicas diferentes (Dockrell, 2003; Yamashita e Morishima, 2005; Mori, 2009).

O HHV-6 apresenta tropismo por células T CD4+, porém há relatos de infecção em diversos tipos celulares como monócitos, macrófagos, linfócitos B, células NK, astrócitos, células dendríticas, epiteliais e endoteliais (Kosuge, 2000; Caserta et al, 2001; Mori, 2009). O vírus entra na célula através de interação com o receptor celular CD46, uma glicoproteína que está presente na membrana das células nucleares e está fisiologicamente envolvida na regulação da ativação do complemento, prevenindo a ativação espontânea do complemento nas células autólogas (Santoro, 1999; De Bolle et al, 2005).

A persistência do vírus após a infecção primária, o estabelecimento de latência e eventual reativação são características importantes de ambas variantes do HHV-6, como em outros vírus da família *Herpesviridae* (Kosuge, 2000). A reativação do vírus pode ocorrer por diferentes estímulos, sendo comum em pessoas com imunossupressão, seja pós-transplante de órgão ou como consequência de infecção pelo HIV, e, apesar de ser assintomática na maioria dos casos, pode causar febre, encefalite ou convulsões febris (Stoeckle, 2000; De Bolle et al, 2005; Yoshikawa e Asano, 2000). Em pessoas imunocompetentes, a reativação do vírus pode ocorrer durante a gravidez ou em casos de coinfeção com outros vírus como o HHV-7, sarampo e o vírus da dengue (Laina et al, 2010).

Pesquisas vêm estudando a existência de integração do genoma do vírus nos cromossomos de alguns indivíduos, entre 0,2 – 0,8% da população, característica que parece ser única do HHV-6 comparado aos outros vírus da mesma família. Existe suspeita que a presença de sequências de repetições teloméricas (TRS) na extremidade terminal direita de cada DR esteja diretamente relacionada com a capacidade de integração cromossômica do HHV-6 (Clark et al, 2006; Leong et al, 2007; Hall et al, 2008; Achour et al, 2009; Arbuckle et al, 2010).

### 1.1.3 Incidência

A infecção pelo HHV-6 é muito comum e acontece geralmente na infância. Estima-se que cerca de 83% das crianças até 13 meses e mais de 95% das com idade até 2 anos já entraram em contato com o vírus (Reddy e Manna, 2005). A infecção primária em adultos imunocompetentes é rara, porém, quando acontece, pode causar encefalites e complicações neurológicas (Isaacson et al, 2005; Bernstein e Schleiss, 1996; Gilden et al, 2007).

A soroprevalência do vírus é alta, em aproximadamente 95% dos adultos é possível encontrar anticorpos anti-HHV-6 no soro e detectar o DNA do vírus na saliva e nas PBMC (Zerr et al, 2005). Existe registro de infecção por HHV-6 em todos os continentes e não há diferença significativa entre habitantes de países desenvolvidos ou subdesenvolvidos, gênero ou etnias (Braun et al, 1997; Stoeckle, 2000; Cermelli et al, 2003).

### 1.1.4 Manifestações Clínicas

As doenças relacionadas à variante A do HHV-6 ainda não são bem compreendidas (Tavakoli et al, 2007), existem estudos imunológicos e moleculares que dão suporte à associação do HHV-6A com a esclerose múltipla (EM), porém esta associação não está absolutamente comprovada (Cermelli e Jacobson, 2000; Opsahl e Kennedy, 2005; Fotheringham et al, 2007; Pietiläinen et al, 2009; Yao et al, 2010). O HHV-6B é o principal agente etiológico da roseola infantil ou exantema súbito (Braun et al, 1997), doença caracterizada por uma elevação na temperatura corporal (febre em torno de 40°C), seguido de 2 a 6 dias sem febre mas com o aparecimento de um *rash* cutâneo que persiste por 1 a 4 dias. As convulsões são uma complicação que pode ocorrer durante o episódio febril, enquanto outros sintomas neurológicos são mais raros (Stoeckle, 2000; Yoshikawa e Asano, 2000; Caserta et al, 2001). Estudos mostram que a variante B do vírus é responsável direta ou indiretamente pela ocorrência de convulsões febris em um terço das crianças de idade até 2 anos (Theodore et al, 2008). Esta variante também está associada à febre não relacionada à roseola infantil (Isaacson et al, 2005). A infecção primária pode levar a complicações neurológicas como encefalite,

encefalopatia e epilepsia (Laina et al, 2010). A encefalite pode ocorrer em adultos e crianças imunocompetentes, porém em pacientes imunossuprimidos, existem fortes indícios de que o HHV-6 está intimamente relacionado com o desenvolvimento de encefalite límbica aguda pós-transplante (Tyler, 2009). Além disso, existe registro desta variante também ter sido encontrada em pacientes com EM (Tyler, 2003). Alguns estudos sugerem que a variante A do HHV-6 tem maior potencial neurotrópico que a variante B, porém a presença do HHV-6B no sistema nervoso central já foi demonstrada em diversos estudos de tecido cerebral proveniente de lobectomia de pacientes com epilepsia do lobo temporal (Donati et al, 2003; Eeg-Olofsson, 2003; Fotheringham et al, 2007) e em astrócitos do hipocampo de pacientes com encefalite límbica pós-transplante (Theodore et al, 2008).

A influência do HHV-6B no controle do ciclo celular foi descrita *in vitro*, mostrando que proteínas virais são capazes de inativar a proteína supressora tumoral p53 e interagir com a maquinaria celular através de algum mecanismo ainda não esclarecido. Além disso, pode gerar uma parada na fase G1/S do ciclo celular e, possivelmente, também na fase G2/M, por um mecanismo independente da p53 (Oster et al, 2005; Oster et al, 2006; Oster et al, 2008).

### **1.1.5 Transmissão**

O principal veículo de transmissão do HHV-6B é a saliva, e do HHV-6A ainda não foi exatamente descrito (Collot et al, 2002; De Bolle et al, 2005). Existem estudos que consideram a transmissão vertical do HHV-6 (intrauterina ou perinatal) (De Bolle et al, 2005), além disso, a detecção do vírus no trato genital de gestantes dá suporte a este dado (Pass, 2004). Ainda, a presença do vírus no trato genital feminino gera especulações sobre a possibilidade da transmissão sexual do vírus (Baillargeon et al, 2000).

Um novo dado acrescentado recentemente cita a transmissão congênita. A infecção congênita do HHV-6 tem sido considerada como resultado da reativação da infecção materna que atravessa a placenta. No entanto, a integração cromossômica do HHV-6 pode ser um modo importante e exclusivo de transmissão de infecção congênita (Hall et al, 2008).

## 1.2 EPILEPSIA

Epilepsia é um termo aplicado a um grupo de patologias crônicas, cuja principal manifestação clínica - crises epiléticas - é provocada por uma disfunção cerebral, podendo se originar de diversas situações e mecanismos fisiopatológicos (Pedley, 2005). A base fisiopatológica deste distúrbio está associada à ocorrência de descargas neuronais intermitentes e excessivas resultantes de fenômenos de despolarização e repolarização excessivos nas membranas dos neurônios envolvidos (Da Costa et al, 1992; Cordas e Moreno, 1999). As crises epiléticas podem ter expressão motora, sensorial e autonômica, ou alterar o estado de consciência, o estado emocional, a memória, a cognição, ou o comportamento (Fisher et al, 2005). O histórico familiar, de trauma cerebral e de doença neurológica são fatores de risco para epilepsia, e este risco pode ser aumentado quando existe exposição a situações que predispõem a crises epiléticas. Embora o risco de transmissão vertical seja baixo, e mais de 90% dos pacientes com epilepsia não tenham histórico familiar de epilepsia (Weil et al, 2010), o desenvolvimento da epilepsia se dá, em muitos casos, pela interação de patologia cerebral adquirida e predisposição genética (Pedley, 2005).

A epilepsia é uma das desordens neurológicas crônicas mais comuns, afetando entre 0,5-1% da população mundial, dos quais 60% dos casos são de epilepsia focal (Majores, 2007; Gelžinienė et al, 2008). A ocorrência é maior em países menos desenvolvidos ou em desenvolvimento, onde a frequência de desnutrição e doenças infecciosas é maior e, além disso, o sistema de saúde é deficiente. A epilepsia é mais comum na infância, devido a maior exposição e vulnerabilidade a riscos, como traumatismos cranianos por acidente, e a doenças infecciosas, como meningites (Da Costa e Palmira, 1998).

Entre adultos, a epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM) é a síndrome epilética mais comum, sendo responsável por 50-75% dos casos (Yacubian, 1998; Andrade-Valença et al, 2006; Dourado et al, 2007).



### **1.2.1 Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM)**

A ELTM é a síndrome epiléptica mais comum no homem, correspondendo a aproximadamente 60% das epilepsias no lobo temporal (ELT), está frequentemente associada à esclerose mesial temporal (Andrade-Valença et al, 2006), sendo a esclerose hipocampal a principal patologia focal nos pacientes com ELTM (Thom et al, 2010).

A ELTM é caracterizada pela presença de anormalidades nas estruturas límbicas temporais, e ocorre, na maioria dos casos, devido à esclerose hipocampal (caracterizada por perda neuronal e gliose), porém pode decorrer também de traumas ou infecções cerebrais (Engel, 1996; Engel 2001; Cersósimo et al, 2011). Outra característica importante da ELTM é a recorrência crônica de convulsões (Majores, 2007), e sua importância clínica é dada pela alta prevalência e o desenvolvimento de farmacoresistência (Andrade-Valença et al, 2006). A ELTM com esclerose hipocampal é a causa mais comum de epilepsia refratária, porém pode ser abolida na maioria dos pacientes com tratamento cirúrgico (Cersósimo et al, 2011).

### **1.2.2 Tratamento cirúrgico em pacientes com epilepsia**

Aproximadamente 20% dos pacientes com epilepsia se tornam não responsivos ao tratamento medicamentoso. Estes pacientes com epilepsia refratária geralmente usam altas doses das drogas antiepilépticas, a maioria faz terapia com mais de um medicamento e são expostos a um considerável aumento de efeitos adversos. Em torno de 50% destes casos, os pacientes são candidatos ao tratamento cirúrgico (Siegel, 2004; Gelžinienė et al, 2008; Palmi e Da Costa, 1998; Palmi et al, 1998).

Dos pacientes submetidos à cirurgia para epilepsia, estima-se que entre 50-70% sejam para o tratamento da epilepsia do lobo temporal (ELT) refratária (Paglioli e Cendes, 2000), em que é indicada a ressecção cirúrgica da amígdala e da formação hipocampal (Isolan et al, 2007). Na maioria dos casos em que o tratamento de escolha é cirúrgico, os pacientes apresentam esclerose hipocampal (Gelžinienė et al, 2008).

Duas técnicas utilizadas para este tipo de ressecção cirúrgica da amígdala e da formação hipocampal são a amígdalo-hipocampectomia (AH) seletiva, pela técnica de Niemeyer, cujo objetivo é ressecar a parte anterior do hipocampo, parte do parahipocampo, o giro dentado, o úncus e a parte temporal da amígdala (Hori et al, 1993; Isolan et al, 2007), e a lobectomia temporal anterior (LTA), pela técnica de Spencer, que além de retirar a amígdala, hipocampo e giro para-hipocampal, também retira 3 a 4 cm do neocortex anterior temporal (Paglioli et al, 2004) (Figura 1).

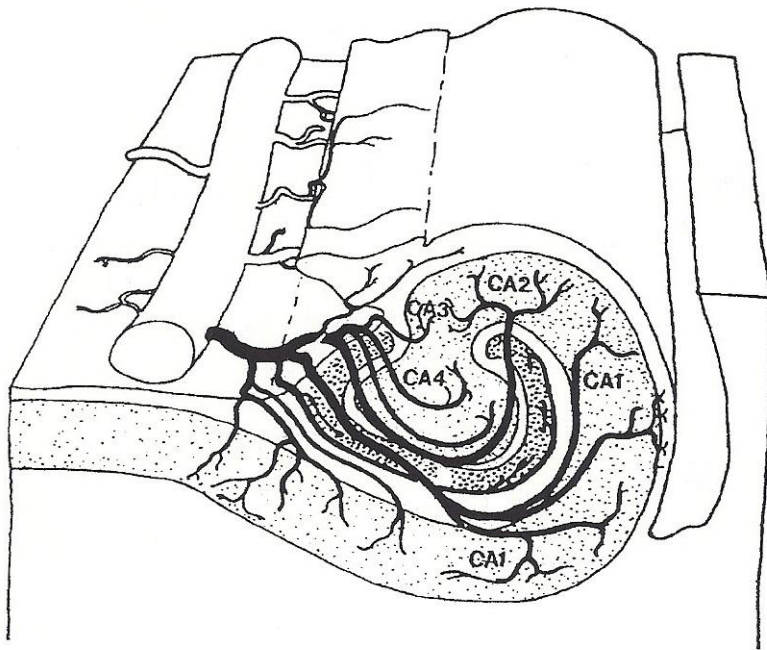


Figura 1: Corte coronal da porção média do hipocampo esquerdo. Representação da região CA1, local de origem das amostras estudadas. Fonte: adaptado de Marinkovic, 1992.

### 1.3 INFECÇÕES VIRAIS NO SISTEMA NERVOSO E EPILEPSIA

Enquanto não é possível determinar a etiologia de uma grande proporção das epilepsias e, portanto, elas são classificadas como idiopáticas, algumas são associadas a anormalidades estruturais e metabólicas, incluindo as de origem viral (Getts et al, 2008). Os vírus são os agentes mais comuns aos quais o ser humano é exposto pré-, peri- e pós-nascimento (Eeg-Olofsson,

2003), e uma grande variedade é capaz de provocar modificações nos circuitos neuronais associados às convulsões (Getts et al, 2008).

As convulsões febris são o tipo mais comum de convulsões na infância. Estudos que relatam vírus como etiologia de convulsões febris vêm aumentando, e sugerem diferentes mecanismos possíveis como: a febre em si; um grau de febre que ultrapasse o limite individual de temperatura convulsiva; e citocinas elevadas ou resposta anormal do sistema imunológico à infecção (Millichap e Millichap, 2004; Millichap e Millichap, 2006).

O papel do HHV-6 na etiologia das convulsões febris ainda é inconclusivo e diversos fatores podem estar envolvidos. A febre com alta temperatura pode ser uma explicação suficiente para a ocorrência das convulsões febris, porém outras situações foram propostas como possíveis explicações: (1) um processo de destruição das células pode ocorrer como consequência da invasão do vírus no sistema nervoso central; e (2) a existência de fatores neurotrópicos, encefalopáticos ou mecanismos mediados pela resposta imunológica (Millichap e Millichap, 2006).

Além do HHV-6, outros vírus da família Herpesviridae são muito comumente relacionados a complicações neurológicas. Apesar de não ter mecanismo de infecção definido, o vírus Herpes Simplex-1 (HSV-1) pode causar encefalite, com a ocorrência de convulsões devido à replicação do vírus acompanhada de inflamação no lobo temporal mesial. O vírus Herpes Simplex-2 (HSV-2) causa, principalmente, o herpes genital, porém pode levar a complicações como meningite asséptica e radiculopatia, além de causar mielite em indivíduos imunossuprimidos. O vírus Epstein-Barr (EBV) pode causar meningite asséptica, encefalomielite e neurite. O vírus Varicela Zoster (VZV) pode causar, além do herpes zoster, encefalite e meningite. O Citomegalovírus (CMV) pode causar doenças neurológicas em recém-nascidos por infecção congênita. A infecção congênita por CMV geralmente é assintomática, mas pode levar a perda auditiva e déficit intelectual. Outras complicações neurológicas incluem microcefalia, convulsões e hipotonia (Gilden et al, 2007, Persson et al, 2009, Perng e Jones, 2010).

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral:

Realizar uma pesquisa molecular de herpesvírus humano tipo 6 em amostras de tecido cerebral obtido de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial farmacorresistente submetidos a tratamento cirúrgico.

### 1.2.2 Objetivos específicos:

- Realizar pesquisa de DNA viral nas amostras de tecido cerebral.
- Avaliar a presença do vírus em cada região do hipocampo coletada e estimar se existe um sítio preferencial de estabelecimento do vírus.
- Apresentar o percentual de positividade de HHV-6 em cada paciente e de acordo com as regiões do hipocampo coletadas.

## **CAPÍTULO 2 – ARTIGO**

# Detection of Human Herpesvirus 6 in Brain Tissue Samples From Patients Who Underwent Surgery as Treatment for Refractory Mesial Temporal Lobe Epilepsy

Rorato Andreatta, RM; Da Costa, JC; Azambuja, NA; Fell, N; Ferreira, CAS; Schmitt, VM

**Artigo submetido ao periódico Journal of Neurovirology em 28 de abril de 2011.**

Detection of Human Herpesvirus 6 in Brain Tissue Samples from Patients Who Underwent Surgery as Treatment for Refractory Mesial Temporal Lobe Epilepsy

Rorato Andreatta, RM<sup>1</sup>; Da Costa, JC<sup>2</sup>; Azambuja, NA<sup>2</sup>; Fell, N<sup>3</sup>; Ferreira, CAS<sup>4</sup>; Schmitt, VM<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina, Hospital São Lucas e Instituto do Cérebro, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup>Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Laboratório de Imunologia e Microbiologia da Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

Av. Ipiranga, 6681, Prédio 12

90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author:

Virginia Minghelli Schmitt

[vmschmitt@pucrs.br](mailto:vmschmitt@pucrs.br)

Telephone number: 55 51 33203512/33534514

Fax number: 55 51 33203612

## Abstract

Human herpesvirus 6 (HHV-6) is a *Betaherpessvirus* associated with Roseola Infantum (Exanthema Subitum) in primary infection. Due to its neurotropic characteristic and latency in the central nervous system, many reports associate HHV-6 with epilepsy, febrile seizures, multiple sclerosis and others neurologic diseases. In this study, HHV-6 DNA was investigated in 42 hippocampal samples from 14 patients with mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) submitted to amygdalohippocampectomy (AH) or anterior temporal lobectomy (ATL) surgeries using a nested polymerase chain reaction (PCR). Three samples from each patient were collected and analyzed: from hippocampal head, body and tail. HHV-6 was detected in twelve of fourteen patients (85.7%) with MTLE. Analyzing the samples resulting positive for HHV-6, all three samples were positive in three patients, in four patients two samples were positive and in five patients only one sample was positive. According to the origin of samples, seven samples from hippocampal head were positive, eight from hippocampal body and seven from hippocampal tail, possibly indicating the absence of preferential site for viral establishment. HHV-6 positivity found in patients of the present study is higher then data found in the literature. A possible explanation would be differences in the study design, with three samples collected from different portions of the hippocampus of each patient, what seem to be more representative than only one sample. Our results corroborate the hypothesis of a possible role of HHV-6 infection in epilepsy.

**Keywords:** Human Herpesvirus 6, viral DNA, mesial temporal lobe epilepsy, hippocampus

## Introduction

Human Herpesvirus 6 (HHV-6) was discovered in 1986 and first isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of immunosuppressed adult patients with lymphoproliferative diseases or with Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection (Braun et al. 1997, Stoeckle 2000). It is estimated that 83% of children are infected with HHV-6 by the age of 13 months, and more than 95% are infected by 2 years (Reddy and Manna 2005). HHV-6 is a *Betaherpessvirus* that infects several cell types, particularly CD4+ T cells and central nervous system (CNS) cells. As a member of the *Herpesviridae* family, important characteristics of HHV-6 are persistence after primary infection, establishment of latency in PBMCs, salivary glands and the CNS, and eventual reactivation (Kosuge 2000; De Bolle et al. 2005).

Two variants of the virus have been identified, A and B, which are distinct by genetic, immunological and molecular characteristics. In spite of their degree of nucleotide similarity higher than 90%, HHV-6A and B have distinct clinical manifestations and pathogenesis (Dockrell 2003; Yamashita e Morishima 2005; Mori 2009). HHV-6B is the causative agent of Roseola Infantum (or Exanthema Subitum) (Braun et al. 1997). Diseases related to variant A are not well understood, but there are immunological and molecular studies that support the association of HHV-6A with multiple sclerosis (Pietiläinen et al. 2009; Yao et al. 2010). In recent years, due to its neurotropic characteristic, HHV-6 has been investigated as an etiologic agent of mesial temporal lobe epilepsy (MTLE), with most of the results pointing a possible role of HHV-6 in epilepsy development (Uesugi et al. 2000; Donati et al. 2003; Fotheringham et al. 2007; Theodore et al. 2008; Niehusmann et al. 2010).

Epilepsy is one of the most common chronic neurological disorders, affecting around 0.5-1% of world population (Majores 2007; Gelziniene et al. 2008). The main clinical manifestation - seizures - is caused by a brain dysfunction, which may originate from different situations and physiopathological mechanisms. Epilepsy is more common in childhood, due to major exposure and vulnerability to risks such as accidental head injuries by accident, and infectious diseases, such as meningitis (Da Costa and Palmi, 1998).



MTLE is the most common epilepsy syndrome in humans, accounting for approximately 60% of temporal lobe epilepsy (TLE). It is frequently associated with mesial temporal sclerosis (Semah et al. 1998; Engel 2001; Andrade-Valença et al. 2006; Menzler et al. 2011), being hippocampal sclerosis the main focal pathology in these patients (Thom et al. 2010). An important and clinically relevant characteristic of MTLE is the chronic recurrence of seizures (Wieser and ILAE 2004), once it is highly prevalent and predisposes to the development of pharmacoresistance (Semah et al. 1998; Engel 2001; Wieser and ILAE 2004; Andrade-Valença et al. 2006; Cersósimo et al. 2011). MTLE is the most common indication for epilepsy surgery (Engel 1996; Engel 2001; Paglioli et al. 2004; Berg 2008).

In this preliminary study, we analyzed hippocampal samples of MTLE patients submitted to amygdalohippocampectomy or anterior temporal lobectomy surgeries, aiming to investigate the presence of HHV-6 and its positivity according to region of sample's origin.

## **Materials and Methods**

### **Patients and Samples**

Samples were collected from 14 drug resistant patients with mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis who underwent amygdalohippocampectomy (AH) or anterior temporal lobectomy (ATL) surgery treatment at São Lucas Hospital of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) - Brazil. Three samples from sector CA1 of the hippocampus were taken from each patient - one from anterior, one from middle and one from posterior hippocampus - totalizing 42 samples, and named head, body and tail, respectively (Isolan et al. 2007). Immediately after surgery, samples were stored in sterile tubes and frozen at -80°C in the Neurosciences Laboratory of the Biomedical Research Institute (IPB) at PUCRS.

Inclusion criteria were very restrictive to ensure patients' diagnosis of MTLE. All patients underwent preoperative imaging and neuropsychological testing, had clinical history and clinical manifestations compatible with MTLE. Also, all patients were pharmacoresistant, presented high level of seizures frequency (according to Engel's scale) and had unilateral or markedly

asymmetric hippocampal atrophy. No patient had a history of trauma or cases of familial epilepsy.

Samples were obtained from consecutive surgeries performed between April 2009 and August 2010. The same medical team was responsible for all procedures. To guarantee precision and reproducibility of samples collection, all were performed by the same neurosurgeon using the Niemeyer's technique of resection for AH and Spencer's technique for ATL. In both techniques, hippocampus and amygdale were removed initially, followed by the removal of lateral cortex, if it was the case. Anatomopathological tests showed compatible signals of hippocampal sclerosis in all collected samples.

### **Ethics**

Samples used in this study represent a portion of brain tissue obtained from patients undergoing surgical treatment of epilepsy. This material is routinely discarded after surgery and was used only for the purposes presented here, namely HHV-6 molecular detection. All participants signed a written informed consent. This study was approved by the Ethics Committee of PUCRS (Protocol 09/04601).

### **DNA extraction**

DNA from brain tissue samples was isolated using the extraction kit DNA Purelink Genomic™ (Invitrogen), according to manufacturer's specifications.

### **DNA viability control**

To test the viability of DNA extracted from samples, a PCR was performed with primers specific for the human beta-globin gene: GH20 (5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3') and PC04 (5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3') (Manos et al. 1989). Total reaction volume (25µL) contained 10mM Tris-HCl pH 8.5, 50mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 400nM dNTPs, 25pmol of each primer, 0.5U Taq DNA polimerase and 5.0-6.0 µg of DNA. DNA amplification program consisted of an initial denaturation at 95°C for 5min, 35 cycles at 95°C for 1min, 55°C for 1min and 72°C for 1min, and a final extension at 72°C for 7min. Electrophoresis was performed in a 1.5% agarose gel containing 0.5µg/mL ethidium bromide with TBE buffer, followed by visualization under UV light.

## **HHV-6 detection**

A nested PCR for detection of human herpesvirus 6 DNA was performed according to Wilborn et al (1994). Primers used were specific for a highly conserved region of viral genome, the major antigenic structural protein (p100) (external P1: 5'-GGG ACG CGA ATC GGA GGA AGC-3' and P2: 5'-CGA CGC GAT CGC TGA CTC GC-3'; internal P3: 5'-TCC GAA GCT TCG GGT AAC GGA GAA CGA-3' and P4: 5'-ATT CAG GCC TCA GAA CCA TCT GTT C-3'). Amplicons of the first and second reactions were 456bp and 187bp, respectively. Visualization of nested PCR products was performed under UV light, following electrophoresis in a 2% agarose gel containing 0.5µg/mL ethidium bromide in TBE buffer. DNA extracted from HHV6A – Strain GS (Advanced Biotechnologies Inc.) was used as a positive control. A sample from hippocampus of a patient with temporal neocortical dysplasia was used as a negative control of the study.

## **Results**

### **DNA viability control**

PCR for human beta-globin gene resulted in the expected amplicon production, indicating that extracted DNA from samples were suitable for amplification.

### **HHV-6 detection**

Out of the 14 patients with MTLE, 12 were positive for HHV-6 in at least one sample (85.7%). Samples from hippocampus head were positive in 7 patients (50.0%); in 8, hippocampus body samples were positive (57.1%); and in 7, hippocampus tail samples were positive (50.0%). Among patients with positive result for HHV-6, 4 (33.3%) had two positive samples (3 in hippocampus body and tail samples, and 1 in head and body samples) while in 3 (25.0%) all samples resulted positive for HHV-6. The sample from hippocampus of a patient with temporal neocortical dysplasia resulted negative for HHV-6.

## Discussion

In recent years, HHV-6 has been proposed as a possible causative agent of febrile seizures and epilepsy. Uesugi and colleagues investigated the presence of HHV-6 by PCR in brain tissue samples from the mesial and lateral temporal lobe of 17 patients with epilepsy who underwent temporal lobectomy. Viral DNA was found in 6 of 17 patients (35%): 3 were positive in hippocampal samples, 2 were positive in lateral temporal lobe and 1 was positive in both regions (Uesugi et al., 2000). In our study, all patients had MTLE and all samples were collected from hippocampus. The different characteristics of patients and site of sample collection may explain differences in results, once 85.7% of our study patients were positive for HHV-6 in at least one collected sample. Donati and colleagues (2003) investigated the presence of HHV-6 in brain tissue samples from 8 patients with MTLE and 7 patients with neocortical epilepsy (NE). Authors found HHV-6B DNA with significantly higher viral load in sections of hippocampus in 4 of 8 patients with MTLE, and in no sample from patients with NE, suggesting that a relationship may exist between HHV-6 and MTLE (Donati et al. 2003). Despite in our study no HHV-6 variant was investigated, also a high rate of HHV-6 positivity was detected based on the use of multiple hippocampus regions.

Fotheringham and colleagues investigated the presence of HHV-6B by PCR in brain tissue of patients with and without MTLE. Viral DNA was found in 11 of 16 (69%) patients with MTLE and in none of 7 patients without MTLE. Their results on the presence of HHV-6 in brain tissue of patients with MTLE suggest a possible etiology and pathogenic mechanism for MTLE (Fotheringham et al. 2007). Our study was designed to further investigate this hypothesis, collecting samples exclusively from patients with MTLE. The high HHV-6 positivity observed supports the conclusion of Fotheringham and colleagues.

Niehusmann and colleagues analyzed the presence of HHV-6 DNA in 38 patients with refractory TLE and different pathologies related to TLE. Viral DNA was found in 55.6% of patients with TLE which had a history of encephalitis, mesial temporal sclerosis and gliosis in the hippocampus without

neurodegeneration (Niehusmann et al. 2010). Patients from our study had no history of encephalitis; however all had hippocampal sclerosis and unilateral or asymmetric atrophy.

According to our knowledge, this is the first study available in the literature with samples collected from different hippocampus regions (anterior, middle and posterior). Previous studies collected only one sample from each patient and this may explain the higher HHV-6 positivity found in our study, once 9 out of the 12 HHV-6 positive patients presented negative results in at least one sample, pointing that in our study a single sample collection would not be representative of viral infection. In the eventual collection of samples from a unique specific site, our results would have been 50.0% positivity in the case of hippocampus head collection, 57.1% for hippocampus body and 50.0% for hippocampus tail samples, percentages similar to those found in the literature, reinforcing the importance of a representative sample collection. Also, collection of multiple samples from the same patient was performed in an attempt to identify if there is a preferential region of the hippocampus for HHV-6 persistence and/or latency. Our results suggest there is no preferential site for HHV-6 establishment of latency and/or persistency. Furthermore, they showed a considerable variation in HHV-6 hippocampus infection sites, which may be taken into account when evaluation of HHV-6 prevalence and its possible association with MTLE is investigated.

Studies conducted on patients' prognosis after epilepsy surgery show success rates of about 80.0%. Jeong and colleagues studied 93 patients with MTLE who underwent anterior temporal lobectomy, with 78 (84.0%) presenting remission of seizures (Jeong et al. 1999). Clusmann and colleagues studied 321 patients submitted to surgical treatment for refractory temporal lobe epilepsy, 81.9% of these patients were considered to have a good response after surgery (Clusmann et al. 2002). In our Institution we prospectively analyze the surgical outcome data for 2 to 11 years for 134 patients who specifically had MTLE and unilateral hippocampal sclerosis; and complete seizure freedom (Engel's Class IA) for years 1, 2, 5, and 10 were 85%, 77%, 74% and 66% and of Engel's class I were 89%, 86%, 83% and 81% (Paglioli et al. 2004). In this context, the follow up of the patients analyzed in this study may contribute to investigate if HHV-6 hippocampus infection and/or the hippocampus infection

extension may be correlated with elimination or maintenance of seizure episodes after lobotomy, once if HHV-6 has effectively a role in seizure severity and epilepsy development, extirpation of hippocampus portion infected with HHV-6 would be essential for surgical success.

Clinical and neuropathological data from surgical series of patients with MTLE and surgically proven hippocampal sclerosis have found a high incidence of initial precipitating cerebral injury or incidents such as complicated febrile seizures, trauma, hypoxia and intracranial infection, usually before the age of 4-5 years (Mathern et al. 1996; Engel 2001; Wieser and ILAE 2004; Engel 2008). Experimental studies have demonstrated that excessive or sustained production of pro-inflammatory cytokines can contribute to neuronal hyperactivity and neurodegeneration in epilepsy (Vezzani et al. 2002). Therefore, we can hypothesize that an initial HHV-6 infection could have injured preferentially the hippocampus promoting a series of inflammatory events resulting in hippocampal sclerosis and medically refractory epilepsy. Further studies will be conducted with patients of the present study in an attempt to investigate this hypothesis and the relationship between HHV-6 and epilepsy.

### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **Acknowledgments**

We thank Dr. Edison Luiz Durigon from Virology Laboratory, Universidade de São Paulo (USP) for providing HHV-6 culture samples and precious information. We also thank Dr. Simone Denise Salamoni from Neurosciences Laboratory (IPB-PUCRS) for helping with sample collection and storage and the medical team responsible for all surgical procedures. RMRA is a fellow of CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

## References

- Andrade-Valença LPA, Valença MM, Velasco TR, Leite JP (2006) Epilepsia do Lobo Temporal Mesial Associada à Esclerose Hipocampal. *J Epilepsy Clin Neurophysiol.* 12(1):31-36
- Berg AT (2008) The natural history of mesial temporal lobe epilepsy. *Curr Opin Neurol.* 21(2):173-178. doi: 10.1097/WCO.0b013e3282f36ccd
- Braun DK, Dominguez G, Pellett PE (1997) Human Herpesvirus 6. *Clin Microbiol Rev.* 10(3):521-567
- Cersósimo R, Flesler S, Bartuluchi M, Soprano AM, Pomata H, Caraballo R (2011) Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: Study of 42 children. *Seizure.* 20:131–137. doi:10.1016/j.seizure.2010.11.002
- Clusmann H, Schramm J, Kral T, Helmstaedter C, Ostertun B, Fimmers R, Haun D, Elger CE (2002) Prognostic factors and outcome after different types of resection for temporal lobe epilepsy. *J Neurosurg.* 97:1131-1141. doi: 10.3171/jns.2002.97.5.1131
- Da Costa J, Palmieri A (1998) Epilepsias refratárias em crianças. In: Da Costa J, Palmieri A, Yacubian EMT, Cavalheiro EA (ed) *Fundamentos neurobiológicos das Epilepsias: aspectos clínicos e cirúrgicos.* São Paulo, pp 817-829
- De Bolle L, Naesens L, De Clercq E (2005) Update on Human Herpesvirus 6 Biology, Clinical Features, and Therapy. *Clin Microbiol Rev.* 18(1):217-245. doi:10.1128/CMR.18.1.217–245.2005
- Dockrell DH (2003) Human herpesvirus 6: molecular biology and clinical features. *J Med Microbiol.* 52(Pt 1):5-18. doi: 10.1099/jmm.0.05074-0
- Donati D, Akhyani N, Fogdell-Hahn A, Cermelli C, Cassiani-Ingoni R, Vortmeyer A, Heiss JD, Cogen P, Gaillard WD, Sato S, Theodore WH, Jacobson S (2003) Detection of human Herpesvirus-6 in mesial temporal lobe epilepsy surgical brain resections. *Neurology.* 61(10):1405-1411
- Engel JJ (1996) Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 26(1):141-50. doi: 10.1016/S0920-1211(96)00043-5
- Engel J Jr (2001) Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? *Neuroscientist.* 7(4):340-52. doi: 10.1177/107385840100700410
- Engel JJ (2008) Surgical treatment for epilepsy: too little, too late? *JAMA.* 300(21):2548-50. doi: 10.1001/jama.2008.756

Fotheringham J, Donati D, Akhyani N, Fogdell-Hahn A, Vortmeyer A, Heiss JD, Williams E, Weinstein S, Bruce DA, Gaillard WD, Sato S, Theodore WH, Jacobson S (2007) Association of Human Herpesvirus-6B with Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *PLoS Med.* 4(5):e180. doi:10.1371/journal.pmed.0040180

Gelziniene G, Endziniene M, Vaiciene N, Magistris MR, Seeck M (2008) Presurgical evaluation of epilepsy patients. *Medicina (Kaunas).* 44(8):585-92

Isolan GR, Azambuja N, Paglioli Neto E, Paglioli E (2007) Anatomia microcirúrgica do hipocampo na amígdalo-hipocampectomia seletiva sob a perspectiva da técnica de Niemeyer e método pré-operatório para maximizar a corticotomia. *Arq Neuro-Psiquiatr.* 65 (4a):1062-1069. doi: 10.1590/S0004-282X2007000600031

Jeong SW, Lee SK, Kim KK, Kim H, Kim JY, Chung CK (1999) Prognostic Factors in Anterior Temporal Lobe Resections for Mesial Temporal Lobe Epilepsy: Multivariate Analysis. *Epilepsia.* 40(12):1735-1739. doi: 10.1111/j.1528-1157.1999.tb01591.x

Kosuge H (2000) HHV-6, 7 and their related diseases. *J Dermatol Sci.* 22(3):205-212. doi:10.1016/S0923-1811(99)00086-9

Majores M (2007) Molecular Neuropathology of Temporal Lobe Epilepsy: Complementary Approaches in Animal Models and Human Disease Tissue. *Epilepsia.* 48(2):4-12. doi: 10.1111/j.1528-1167.2007.01062.x

Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM (1989) Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells.* 7:209–214.

Mathern GW, Babb TL, Leite JP, Pretorius K, Yeoman KM, Kuhlman PA (1996) The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. *Epilepsy Res.* 26(1):151-61. doi: 10.1016/S0920-1211(96)00052-6

Menzler K, Thiel P, Hermsen A, Chen X, Benes L, Miller D, Sure U, Knake S, Rosenow F (2011) The role of underlying structural cause for epilepsy classification: Clinical features and prognosis in mesial temporal lobe epilepsy caused by hippocampal sclerosis versus cavernoma. *Epilepsia.* 52(4):707-11. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.02984.x

Mori Y (2009) Recent topics related to human herpesvirus 6 cell tropism. *Cell Microbiol.* 11(7):1001-1006. doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01312.x



Niehusmann P, Mittelstaedt T, Bien CG, Drexler JF, Grote A, Schoch S, Becker AJ (2010) Presence of human herpes virus 6 DNA exclusively in temporal lobe epilepsy brain tissue of patients with history of encephalitis. *Epilepsia*. 51(12):2478–2483. doi: 10.1111/j.1528-1167.2010.02741.x

Paglioli E, Palmi A, Paglioli E, da Costa JC, Portuguese M, Martinez JV, Calcagnotto ME, Hoefel JR, Raupp S, Barbosa-Coutinho L (2004) Survival analysis of the surgical outcome of temporal lobe epilepsy due to hippocampal sclerosis. *Epilepsia*. 45(11):1383-91. doi: 10.1111/j.0013-9580.2004.22204.x

Pietiläinen J, Virtanen JO, Uotila L, Salonen O, Koskiniemi M, Färkkilä M (2009) HHV-6 infection in multiple sclerosis: a clinical and laboratory analysis. *Eur J Neurol*. 17(3):506-509. doi: 10.1111/j.1468-1331.2009.02718.x

Reddy S, Manna P (2005) Quantitative Detection and Differentiation of Human Herpesvirus 6 Subtypes in Bone Marrow Transplant Patients by Using a Single Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay. *Biol Blood Marrow Transplant*. 11(7):530-541. doi:10.1016/j.bbmt.2005.04.010

Semah F, Picot MC, Adam C, Broglin D, Arzimanoglou A, Bazin B, Cavalcanti D, Baulac M (1998) Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? *Neurology*. 51(5):1256-62.

Stoeckle MY (2000) The Spectrum of Human Herpesvirus 6 Infection: From Roseola Infantum to Adult Disease. *Annu Rev Med*. 51:423-430. doi: 10.1146/annurev.med.51.1.423

Theodore WH, Epstein L, Gaillard WD, Shinnar S, Wainwright MS, Jacobson S (2008) Human herpes virus 6B: A possible role in epilepsy? *Epilepsia*. 49(11):1828-37. doi: 10.1111/j.1528-1167.2008.01699.x

Thom M, Mathern GW, Cross JH, Bertram EH (2010) Mesial temporal lobe epilepsy: How do we improve surgical outcome? *Ann Neurol*. 68:424–434. doi: 10.1002/ana.22142

Uesugi H, Shimizu H, Maehara T, Arai N, Nakayama H (2000) Presence of human herpesvirus 6 and herpes simplex virus detected by polymerase chain reaction in surgical tissue from temporal lobe epileptic patients. *Psychiatry Clin Neurosci*. 54(5):589-593. doi: 10.1046/j.1440-1819.2000.00758.x

Vezzani A, Moneta D, Richichi C, Aliprandi M, Burrows SJ, Ravizza T, Perego C, De Simoni MG (2002) Functional role of inflammatory cytokines and

antiinflammatory molecules in seizures and epileptogenesis. *Epilepsia*. 43(Suppl 5):30-5. doi: 10.1046/j.1528-1157.43.s.5.14.x

Wieser HG, ILAE Commission on Neurosurgery of Epilepsy (2004) ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia*. 45(6):695-714. doi: 10.1111/j.0013-9580.2004.09004.x

Wilborn F, Brinkmann V, Schmidt CA, Neipel F, Gelderblom H, Siebert W. (1994) Herpesvirus type 6 in patients undergoing bone marrow transplantation: serologic features and detection by polymerase chain reaction. *Blood*. 83(10):3052-3058

Yacubian E (1998) Epilepsias refratárias no adulto. In: Da Costa J, Palmini A, Yacubian EMT, Cavalheiro EA (ed) Fundamentos neurobiológicos das epilepsias: aspectos clínicos e cirúrgicos. São Paulo, pp 807-816

Yamashita N, Morishima T (2005) HHV-6 and Seizures. *Herpes*. 12(2):46-49

Yao K, Crawford JR, Komaroff AL, Ablashi DV, Jacobson S (2010) Review Part 2: Human Herpesvirus-6 in Central Nervous System Diseases. *J Med Virol* 82:1669-1678. doi: 10.1002/jmv.21861

## **CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS**

### **3.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Mesmo com o avanço da indústria farmacêutica, a descoberta de novas drogas para o tratamento de epilepsia não refletiu em uma queda significativa no número de pacientes com crises epiléticas refratárias ao tratamento (Siegel, 2004).

Nos últimos anos, o HHV-6 tem sido estudado como possível agente etiológico das convulsões febris e da epilepsia. Isto devido às pesquisas que encontraram o DNA do vírus em amostras de tecido cerebral de pacientes com epilepsia (Uesugi, 2000; Donati, 2003; Fotheringham et al, 2007; Niehusmann et al, 2010).

O presente trabalho, segundo busca na literatura, foi o primeiro a investigar a presença do HHV-6 em amostras de tecido cerebral de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial no sul do Brasil. Com a intenção de analisar a presença do DNA do vírus nas amostras de hipocampo de pacientes com epilepsia e investigar se existe algum sítio de preferência para o estabelecimento do vírus, analisamos três amostras de cada paciente, cada uma originada de uma região diferente do hipocampo - cabeça, corpo e cauda.

O resultado deste estudo mostrou que não existe um sítio de preferência para o estabelecimento do vírus no hipocampo, uma vez que o número de amostras positivas para cada região estudada foi semelhante: 7 amostras da cabeça do hipocampo positivas, 8 do corpo e 7 da cauda.

A porcentagem de pacientes positivos para o HHV-6 encontrada (85,7%) é maior quando comparada a artigos encontrados na literatura. Esta diferença pode estar relacionada ao fato de três regiões distintas do hipocampo terem sido analisadas, pois se apenas uma amostra por paciente tivesse sido analisada, o percentual de positividade teria sido menor (entre 50,0 e 57,1%), bem próximo aos encontrados na literatura. Isto mostra a importância da

análise realizada neste trabalho, pois uma amostragem inadequada pode comprometer os resultados obtidos.

Outro dado interessante, que merece um estudo mais aprofundado, é a semelhança entre a incidência do vírus e o prognóstico pós tratamento cirúrgico dos pacientes com ELTM relatado na literatura. Jeong e colegas estudaram 93 pacientes com ELTM submetidos à lobectomia temporal anterior, dos quais 78 (84,0%) apresentaram remissão das convulsões (Jeong et al, 1999). Clusmann e colegas estudaram 321 pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico para epilepsia do lobo temporal refratária, 81,9% destes pacientes foram considerados como tendo bom prognóstico pós-cirúrgico (Clusmann et al, 2002). Kim e colegas estudaram 88 pacientes com epilepsia do lobo temporal pós lobectomia temporal, dos quais 54 (61,3%) não apresentaram crises em mais de 1 ano após a cirurgia (Kim et al, 2005). A semelhança dos resultados pós-cirúrgicos em que os pacientes ficam livres das crises convulsivas e o percentual da presença do HHV-6 encontrado neste trabalho remetem a uma questão instigante: Serão estes pacientes positivos para HHV-6 os que terão melhor prognóstico pós-cirúrgico, pois uma vez retirada a região afetada pelo vírus estariam livres das convulsões? Se comprovada esta hipótese, poderão estes pacientes suspender a medicação anticonvulsivante logo após a cirurgia? Será esta a chave para melhorar a qualidade de vida dos pacientes com epilepsia? O presente trabalho não traz respostas conclusivas a estas questões, no entanto, aponta um caminho a ser considerado.

## REFERÊNCIAS

- ACHOUR, A. et al. Length variability of telomeric repeat sequences of human herpesvirus 6 DNA. *J Virol Methods*. 2009; 159(1): 127-30.
- ANDRADE-VALENÇA, L. P. A. et al. Epilepsia do Lobo Temporal Mesial Associada à Esclerose Hipocampal. *J Epilepsy Clin Neurophysiol*. 2006; 12(1): 31-36
- ARBUCKLE, J. H. et al. The latent human herpesvirus-6A genome specifically integrates in telomeres of human chromosomes in vivo and in vitro. *PNAS*. 2010; 107(12): 5563–5568
- BAILLARGEON, J.; PIPER, J.; LEACH, C. T. Epidemiology of human herpesvirus 6 (HHV-6) infection in pregnant and nonpregnant women. *J Clin Virol*. 2000; 16(3): 149-157
- BERNSTEIN, D. I.; SCHLEISS, M. R. The Growing Family of *Herpesviridae*. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*. 1996; 7(4): 231-237
- BRAUN, D.K.; DOMINGUEZ, G.; PELLETT, P.E. Human Herpesvirus 6. *Clin. Microbiol. Rev*. 1997; 10(3): 521-567
- CASERTA, M. T.; MOCK, D. J.; DEWHURST, S. Human Herpesvirus 6. *Clin Infect Dis*. 2001; 33(6): 829-833
- CERMELLI, C.; JACOBSON, S. Viruses and Multiple Sclerosis. *Viral Immunol*. 2000; 13(3): 255-267.
- CERMELLI, C. et al. High Frequency of Human Herpesvirus 6 DNA in Multiple Sclerosis Plaques Isolated by Laser Microdissection. *JID*. 2003; 187:1377-87
- CERSÓSIMO, R. et al. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: Study of 42 children. *Seizure*. 2011; 20: 131–137
- CLARK, D. A. et al. Transmission of integrated human herpesvirus 6 through stem cell transplantation: implications for laboratory diagnosis. *J Infect Dis*. 2006; 193: 912–916.
- CLUSMANN, H. et al. Prognostic factors and outcome after different types of resection for temporal lobe epilepsy. *J Neurosurg*. 2002; 97: 1131-1141
- COLLOT, S. et al. Real-Time PCR for Quantification of Human Herpesvirus 6 DNA from Lymph Nodes and Saliva. *J Clin. Microbiol*. 2002; 40 (7): 2445-2451

CORDAS, T. A.; MORENO, R. A. *Conduitas em Psiquiatria*. 3ª Edição. São Paulo: Editora Lemos. 1999.

DA COSTA, J. C.; VIGNES, M.; GUILHERNO, C.; VELLUT, J. Bases Celulares da Epilepsia. *Jornal da liga Brasileira de Epilepsia (JLBE)*. 1992; 5(1): 9-17

DA COSTA J.; PALMINI, A. Epilepsias refratárias em crianças. In: Da Costa J., Palmini, A., Yacubian, E. M. T., Cavalheiro, E. A., ed. *Fundamentos neurobiológicos das Epilepsias: aspectos clínicos e cirúrgicos*. São Paulo, 1998: 817-829

DE BOLLE, L.; NAENSES, L.; DE CLERCQ, E. Update on Human Herpesvirus 6 Biology, Clinical Features, and Therapy. *Clin Microbiol Rev*. 2005; 18(1): 217-245

DOCKRELL, D. H. Human herpesvirus 6: molecular biology and clinical features. *J Med Microbiol*. 2003; 52(Pt 1): 5-18.

DOMINGUEZ, G. et al. Human Herpesvirus 6B Genome Sequence: Coding Content and Comparison with Human Herpesvirus 6A. *J Virol*. 1999; 73(10): 8040–8052

DONATI, D. et al. Detection of human Herpesvirus-6 in mesial temporal lobe epilepsy surgical brain resections. *Neurology*. 2003; 61(10): 1405-1411

DOURADO, M. V. et al. Quality of Life and the Self-Perception Impact of Epilepsy in Three Different Epilepsy Types. *J Epilepsy Clin Neurophysiol*. 2007; 13(4): 191-196

EEG-OLOFSSON, O. Virological and immunological aspects of seizure disorders. *Brain Dev*. 2003; 25(1): 9-13

ENGEL, J. Jr. Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*. 1996; 26(1): 141-50

ENGEL, J. Jr. Mesial Temporal Lobe Epilepsy: What Have We Learned? *Neuroscientist*. 2001; 7(4): 340-52

FISHER, R. S. et al. Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*. 2005; 46(4): 470-472

FOTHERINGHAM, J. et al. Association of Human Herpesvirus-6B with Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *PLoS Med*. 2007; 4(5): e180

GALLO, R. C. A perspective on human herpes virus 6 (HHV-6). *J Clin Virol*. 2006; 37 Suppl 1: S3.

GELŽINIENĖ, G. et al. Presurgical evaluation of epilepsy patients. *Medicina (Kaunas)*. 2008; 44(8): 585-92

GETTS, D. R. et al. Viruses and the immune system: their roles in seizure cascade development. *J Neurochem*. 2008; 104(5): 1167-1176.

GILDEN, D. H. et al. Herpesvirus infections of the nervous system. *Nat Clin Pract Neurol*. 2007; 3 (2): 82-94

GOMPELS, U. A. et al. The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content, and genome evolution. *Virology*. 1995; 209(1): 29-51.

HALL, C.B. et al. Chromosomal integration of human herpesvirus 6 is the major mode of congenital human herpesvirus 6 infection. *Pediatrics*. 2008; 122(3): 513–20

HORI, T. et al. Subtemporal amygdalohippocampectomy for treating medically intractable temporal lobe epilepsy. *Neurosurgery*. 1993; 33(1): 50-57

ISAACSON, E. et al. Evidence of Human Herpesvirus 6 Infection in 4 Immunocompetent Patients with Encephalitis. *Clin Infect Dis*. 2005; 40: 890-893

ISOLAN, G. R. et al. Anatomia microcirúrgica do hipocampo na Amígdalo-hipocampectomia seletiva sob a perspectiva da técnica de Niemeyer e método pré-operatório para maximizar a corticotomia. *Arq. Neuro-Psiquiatr*. 2007; 65 (4): 1062-1069

JEONG, S-W. et al. Prognostic Factors in Anterior Temporal Lobe Resections for Mesial Temporal Lobe Epilepsy: Multivariate Analysis. *Epilepsia*. 1999; 40(12): 1735-1739

KIM, Y. D. Antiepileptic Drug Withdrawal after Successful Surgery for Intractable Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsia*. 2005; 46(2): 251-257

KOSUGE, H. HHV-6, 7 and their related diseases. *J Dermatol Sci*. 2000; 22(3): 205-212

LAINA, I. et al. Febrile Seizures and Primary Human Herpesvirus 6 Infection. *Pediatr Neurol*. 2010; 42: 28-31

LEONG, H.N. et al. The prevalence of chromosomally integrated human herpesvirus 6 genomes in the blood of UK blood donors. *J Med Virol*. 2007; 79(1): 45–51.

MAJORES, M. Molecular Neuropathology of Temporal Lobe Epilepsy: Complementary Approaches in Animal Models and Human Disease Tissue. *Epilepsia*. 2007; 48(2): 4-12

MARINKOVIC S, MILIASAVLJEVIC S, PUSKAS L. Microvascular anatomy of the hippocampal formation. *Surg Neurol.* 1992. 37(5): 339-349

MILLICHAP J. G.; MILLICHAP J. J. Influenza virus and febrile convulsions. *J Infect Dis.* 2004; 189: 564-565.

MILLICHAP, J. G.; MILLICHAP, J. J. Role of Viral Infections in the Etiology of Febrile Seizures. *Pediatr Neurol.* 2006; 35(3): 165-172

MORI, Y. Recent topics related to human herpesvirus 6 cell tropism. *Cell Microbiol.* 2009; 11(7): 1001-1006

NIEHUSMANN, P. et al. Presence of human herpes virus 6 DNA exclusively in temporal lobe epilepsy brain tissue of patients with history of encephalitis. *Epilepsia.* 2010; 51(12): 2478–2483

OPSAHL, M. L.; KENNEDY, P. G. Early and late HHV-6 gene transcripts in multiple sclerosis lesions and normal appearing white matter. *Brain.* 2005; 128: 516-527

OSTER, B.; BUNDGAARD, B.; HÖLLSBERG, P. Human Herpesvirus 6B Induces Cell Cycle Arrest Concomitant with p53 Phosphorylation and Accumulation in T Cells. *J Virol.* 2005; 79(3): 1961–1965

OSTER, B. et al. Human herpesvirus 6B inhibits cell proliferation by a p53-independent pathway. *J Clin Virol.* 2006; 37(1): S63-S68

OSTER, B. et al. Human herpesvirus 6B induces phosphorylation of p53 in its regulatory domain by a CK2- and p38-independent pathway. *J Gen Virol.* 2008; 89: 87-96

PAGLIOLI, E.; CENDES, F. Epilepsia: tratamento cirúrgico. In Guerreiro CAM, Guerreiro MM, Cendes F, Lopes-Cendes I (org). 3ª Ed. Epilepsia, 2000

PAGLIOLI, E. et al. Survival analysis of the surgical outcome of temporal lobe epilepsy due to hippocampal sclerosis. *Epilepsia.* 2004; 45: 1383-1391

PAGLIOLI, E. et al. Seizure and memory outcome following temporal lobe surgery: selective compared with nonselective approaches for hippocampal sclerosis. *J Neurosurg.* 2006; 104: 70-78

PALMINI, A.; DA COSTA, J. C. Seleção de Candidatos à Cirurgia da Epilepsia: A Inseparável Parceria entre Conhecimento e Bom Senso. In: Da Costa J, Palmi, A., Yacubian, EMT, Cavalheiro, EA., ed. Fundamentos neurobiológicos das Epilepsias: aspectos clínicos e cirúrgicos. São Paulo, 1998: 833-856



PALMINI, A.; DA COSTA, J. C.; CALCAGNOTTO, M. E.; MARTINEZ, J. V. L. Avaliação pré-cirúrgica de Pacientes com Epilepsia Parcial Refratária. In: Da Costa J, Palmi, A., Yacubian, EMT, Cavalheiro, EA., ed. Fundamentos neurobiológicos das Epilepsias: aspectos clínicos e cirúrgicos. São Paulo: Lemos, 1998: 857-878

PASS, R. F. HHV6 and HHV7: Persistence and Vertical Transmission. *J Pediatr.* 2004; 145: 432-434

PEDLEY, T. A. As Epilepsias. In: CECIL, Tratado de Medicina Interna / Editado por Lee Goldman, Dennis Ausiello; Tradução da 22ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier. 2005: 2640-2654

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

PERSSON, A. et al. Varicella-zoster virus CNS disease--viral load, clinical manifestations and sequels. *J Clin Virol.* 2009; 46(3): 249-53

PIETILÄINEN, J. et al. HHV-6 infection in multiple sclerosis. A clinical and laboratory analysis. *Eur J Neurol.* 2009; 17(3): 506-509

REDDY, S.; MANNA, P. Quantitative Detection and Differentiation of Human Herpesvirus 6 Subtypes in Bone Marrow Transplant Patients by Using a Single Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005; 11(7): 530-541

SANTORO, F. et al. CD46 Is a Cellular Receptor for Human Herpesvirus 6. *Cell.* 1999; 99: 817–827

SIEGEL, A. M. Presurgical evaluation and surgical treatment of medically refractory epilepsy. *Neurosurg Rev.* 2004; 27: 1–18

STOECKLE, M. Y. The Spectrum of Human Herpesvirus 6 Infection: From Roseola Infantum to Adult Disease. *Annu. Rev. Med.* 2000; 51: 423-430

TAVAKOLI, N. P. et al. Detection and Typing of Human Herpesvirus 6 by Molecular Methods in Specimens from Patients Diagnosed with Encephalitis or Meningitis. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(12): 3972-3978

THEODORE, W. H. et al. Human herpes virus 6B: A possible role in epilepsy? *Epilepsia.* 2008; DOI: 10.1111/j.1528-1167.2008.01699.x

THOM, M. et al. Mesial temporal lobe epilepsy: How do we improve surgical outcome? *ANN NEUROL.* 2010; 68: 424–434

TYLER, K. L. Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: the continuing conundrum. *J Infect Dis.* 2003; 187(9): 1360-1364

TYLER, K. L. Emerging Viral Infections of the Central Nervous System Part 1. *Arch Neurol.* 2009; 66(8): 939-948

UESUGI, H. et al. Presence of human herpesvirus 6 and herpes simplex virus detected by polymerase chain reaction in surgical tissue from temporal lobe epileptic patients. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2000; 54(5): 589-593

WEIL, S.; DEPPE, C.; NOACHTAR, S. The treatment of women with epilepsy. *Dtsch Arztebl Int.* 2010; 107(45): 787–93.

YACUBIAN. E. Epilepsias refratárias no adulto. In: Da Costa J., Palmini, A., Yacubian, E. M. T., Cavalheiro, E. A., ed. *Fundamentos neurobiológicos das Epilepsias: aspectos clínicos e cirúrgicos.* São Paulo, 1998: 807-816

YAMASHITA, N.; MORISHIMA, T. HHV-6 and Seizures. *Herpes.* 2005; 12(2): 46-49

YAO, K. et al. Review Part 2: Human Herpesvirus-6 in Central Nervous System Diseases. *J. Med. Virol.* 2010; 82: 1669-1678

YOSHIKAWA, T.; ASANO, Y. Central nervous system complications in human herpesvirus-6 infection. *Brain Dev.* 2000; 22: 307-314

ZERR, D. M. et al. Clinical Outcomes of Human Herpesvirus 6 Reactivation after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *CID.* 2005; 40: 932–940

## ANEXOS

Tabela 1. Características dos pacientes estudados e resultado para detecção do HHV-6. F, Feminino; M, Masculino; ELTM, Epilepsia do Lobo Temporal Mesial; DNCT, Displasia Neocortical Temporal; LTA, Lobectomia Temporal Anterior; AH, Amigdalohipocampectomia; LT, Lobectomia Temporal; D, Direito; E, Esquerdo. HHV-6 positivos em (1) são para cabeça do hipocampo; em (2) são para o corpo; e em (3) para a cauda.

Nº DO PACIENTE	AMOSTRAS Nº	SEXO	TIPO DE EPILEPSIA	TIPO DE CIRURGIA	LADO	HHV-6
1	01; 02; 03	F	ELTM	ATL	D	1
2	04; 05; 06	F	ELTM	AH	E	2; 3
3	07; 08; 09	F	ELTM	AH	E	1
4	10; 11; 12	F	ELTM	ATL	E	(-)
5 (controle)	13	F	DNCT	TL	E	(-)
6	14; 15; 16	M	ELTM	AH	D	3
7	17; 18; 19	F	ELTM	AH	E	1
8	20; 21; 22	F	ELTM	ATL	D	1; 2; 3
9	23; 24; 25	M	ELTM	ATL	D	2; 3
10	26; 27; 28	M	ELTM	AH	D	2; 3
11	29; 30; 31	M	ELTM	AH	D	2
12	32; 33; 34	F	ELTM	ATL	D	1; 2; 3
13	35; 36; 37	F	ELTM	AH	E	1; 2
14	38; 39; 40	F	ELTM	AH	E	1; 2; 3
15	41; 42; 43	F	ELTM	AH	D	(-)

E-mail de confirmação de submissão do artigo científico.

De: [em.njiv.0.22add5.7cf9a366@editorialmanager.com](mailto:em.njiv.0.22add5.7cf9a366@editorialmanager.com)  
[mailto:[em.njiv.0.22add5.7cf9a366@editorialmanager.com](mailto:em.njiv.0.22add5.7cf9a366@editorialmanager.com)] Em nome de Journal of NeuroVirology

Enviada em: quinta-feira, 28 de abril de 2011 17:15

Para: Virginia Minghelli Schmitt

Assunto: NJIV: A manuscript number has been assigned to Detection of Human Herpesvirus 6 in Brain Tissue Samples from Patients Who Underwent Surgery as Treatment for Refractory Mesial Temporal Lobe Epilepsy

Dear Dr. Schmitt,

Your submission entitled "Detection of Human Herpesvirus 6 in Brain Tissue Samples from Patients Who Underwent Surgery as Treatment for Refractory Mesial Temporal Lobe Epilepsy" has been assigned the following manuscript number: NJIV-D-11-00037.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.

The URL is <http://njiv.edmgr.com/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office  
Journal of NeuroVirology