

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS ARAÇATUBA**

**MEDIADORES DA VIA INTRÍNSECA DA MORTE CELULAR
PROGRAMADA RELACIONADOS À INFECÇÃO IN VITRO PELO
HERPESVIRUS BOVINO TIPO 5**

Andréa Fontes Garcia
Farmacêutica-Nutricionista

Araçatuba – SP
2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS ARAÇATUBA**

**MEDIADORES DA VIA INTRÍNSECA DA MORTE CELULAR
PROGRAMADA RELACIONADOS À INFECÇÃO IN VITRO PELO
HERPESVIRUS BOVINO TIPO 5**

Tese de Doutorado apresentada junto ao curso de Pós-graduação em Ciência Animal, área Medicina Veterinária Preventiva para obtenção do título de Doutor.

Andrea Fontes Garcia

Orientadora: Prof^a Dr^a Adj^a Tereza Cristina Cardoso Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Adj. Fábio Erminio Mingatto

Araçatuba – SP
2013

Catálogo na Publicação (CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Garcia, Andréa Fontes

G216m

Mediadores da via intrínseca da morte celular programada
Relacionados a infecção *in vitro* pelo herpesvírus bovino tipo 5.

/ Andréa Fontes Garcia. Araçatuba: [s.n], 2013

70f. il.; tab. + CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária, 2013

Orientador: Prof. Adjunto Tereza Cristina Cardoso

Co-Orientador: Prof. Adjunto Fábio Erminio Mingatto

1. BoHV-5
2. Apoptose
3. Viroses
4. Encefalite
5. Celulas-tronco
6. imunidade celular

CDD 636.21



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Mediadores da via intrínseca da morte celular programada relacionados à
infecção in vitro pelo Herpesvirus bovino tipo 5.

AUTORA: ANDRÉA FONTES GARCIA

ORIENTADORA: Dra. TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTORA em CIÊNCIA ANIMAL (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA) pela Comissão Examinadora.

Dr. RAFAEL SILVA CIPRIANO

Dra. VERA CLÁUDIA LORENZETTI MAGALHÃES CURCI

Dr. ROBERTO GAMEIRO DE CARVALHO

Dr. MÁRIO JEFFERSON QUIRINO LOUZADA

Dra. TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA

DATA DA REALIZAÇÃO: 26 de julho de 2013.

Presidente da Comissão Examinadora
Dra. TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES

Andréa Fontes Garcia – nascida no dia 02 de abril de 1973, no município de Dracena – SP formou-se em Farmácia com habilitação em Indústria (1995) e Nutrição (1999) na Universidade de Marília (UNIMAR). Atuou profissionalmente sempre nas áreas de suas graduações em Dracena e Lins. Sentindo a necessidade de aprimorar seus conhecimentos retornou a Dracena e fez especialização em Gestão Econômica e Financeira e MBA (2002) no Centro de Ensino Superior de Dracena (CESD) e depois em Nutrição Clínica (2004) no Grupo de Apoio à Nutrição Enteral e Parenteral (GANEP) em São Paulo. Atuou em outros seguimentos, mas sempre na linha de formação, em Campinas, Jaguariúna, São José do Rio Preto e Dracena.

Finalmente ingressou no Programa de Mestrado em Ciência Animal em agosto de 2008, na área de Área de Fisiopatologia Médica e Cirúrgica sob orientação do Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto, docente do campus de Dracena da UNESP, Laboratório de Bioquímica Toxicológica, onde realizou todos dos experimentos relativos à este trabalho. Exercendo a função de Nutricionista Clínica no Ambulatório de Especialidades Médicas (AME) de Dracena. Ingressou no doutorado em março de 2010, no programa Ciência Animal, na área de concentração Medicina Veterinária Preventiva sob orientação da Prof^a Dr^a Tereza Cristina Cardoso, docente da Faculdade Medicina Veterinária, campus de Araçatuba da UNESP, responsável pelo Laboratório de Virologia.

Atualmente é docente no Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium – UniSALESIANO, ministrando várias disciplinas em sete cursos de graduação: Farmácia (Bioquímica celular e humana; Toxicologia e Tecnologia de alimentos), Medicina Veterinária (Bioquímica animal), Química (Bioquímica I e II), Ciências Biológicas (Tecnologia de alimentos; Desenvolvimento de projetos científico de tecnologia de alimentos e Toxicologia), Nutrição (Higiene de alimentos I e II; Nutrição materno infantil I e II; Nutrição em geriatria; AUAN I; Dietoterapia II; Nutrição e coletividade e Tecnologia de alimentos), Engenharia de Bioprocessos (Tecnologia de alimentos e Toxicologia) e Enfermagem (Farmacologia).

EPÍGRAFE

“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes,
Mas não esqueço de que minha vida
É a maior empresa do mundo...
E que posso evitar que ela vá à falência.
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver
Apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e
Se tornar um autor da própria história...
É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar
Um oásis no recôndito da sua alma...
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.
É saber falar de si mesmo.
É ter coragem para ouvir um “Não”!!!
É ter segurança para receber uma crítica,
Mesmo que injusta...

Pedras no caminho?
Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

(Fernando Pessoa)

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas
admiráveis".
(José de Alencar)

AGRADECIMENTOS

À Deus

Luz da minha vida em todos os dias, mesmo quando eu achava que estava na escuridão. E a Nossa Senhora da Penna e a Santa Catarina de Alexandria que são protetoras dos estudantes.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Tereza Cristina Cardoso Silva

Agradeço-a por ter realizado o processamento das amostras, análise dos resultados e publicação dos artigos científicos, referentes a esta tese e ter me dado o melhor presente, a minha felina Shitara.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto

Agradeço-o além da amizade por ter me impulsionado a seguir a carreira acadêmica, hoje permanece em mim todo o conhecimento teórico-prático adquirido nesses anos.

Aos Professores Doutores Mário Jefferson Quirino Louzada e Sandra Helena Penha de Oliveira por fazerem parte da banca do Exame Geral de Qualificação. Agradeço pelas correções e sugestões para aprimorar este trabalho.

Aos componentes da banca de Defesa agradeço por fazerem parte, sugerir e corrigir para aprimorar este trabalho Prof. Dr. Rafael Silva Cipriano, Dra^a Vera Cláudia Lorenzetti Magalhães Curci, Prof. Dr. Roberto Gameiro de Carvalho e Prof. Dr. Mário Jefferson Quirino Louzada.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Campus de Araçatuba na pessoa da na pessoa da Prof^a Dr^a Adj^a Juliana Peiró, pelos conhecimentos compartilhados e em especial ao Prof. Dr. Mário Jefferson Quirino Louzada, por me fornecer inestimáveis informações científicas e amizade, além do meu emprego atual como docente.

Aos amigos do laboratório de virologia a minha amiga de todas as horas desde o mestrado Ana Carolina G. Rosa, ao meu amigo e companheiro Heitor F. Ferrari, Juliana

Bueno, Talita Antello, Camila Silva, Silmara Sakamoto e Livia Castanhas muito obrigada por todos esses anos de alegrias, tristezas, angustias e propósitos e à técnica Gilmara Castilho, grande amiga. Também aos amigos do Laboratório de Metabolismo da UNESP, campus de Dracena Marcos Maioli e Marieli Guelfi.

Agradeço à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba-FMVA-Universidade Estadual Paulista, pelos seus docentes e funcionários na pessoa do diretor Prof °Dr° Adj° Francisco Leydson Feitosa, que proporcionaram a melhor estrutura possível pra a realização deste trabalho realizado no laboratório de Virologia Animal.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação especialmente ao Joelmir e Isabela, do STAEP Adriana, Sr. Doná , Gustavo e Luis , da Biblioteca amiga querida Isabel, Fátima e Alessandra por toda ajuda para a finalização deste projeto.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo apoio financeiro a minha pessoa.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (22010/52465-9) pelo apoio financeiro recebido durante o meu projeto de doutorado.

Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium – UniSALESIANO/ Araçatuba na pessoa do vice-diretor André Ornellas por ter financiado o meu artigo científico.

A todos os meus amados familiares e amigos queridos que me apoiaram e incentivaram nestes anos.

Agradeço ainda ao meu amigo Alex Nakamura por ter ajudado nas correções e a minha amiga Analy Mendes por ter ajudado no coffe-break.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO I	16
1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	16
1.1 Herpesvirus Bovino tipo 5	16
1.2 Transmissão, patogenia e patologia das infecções pelo BOVHV-5	21
1.3 Sitemas <i>in vitro</i> de propagação do BoHV-5	25
1.4 Processos de morte celular programada (MCP)	26
1.5 Herpesvirus bovino tipo 5 e os processos de morte celular programada.....	32
2 OBJETIVOS.....	34
2.1 <i>Objetivos Gerais</i>	34
2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	34
3 RESULTADOS.....	36
3.1 BoHV-5 replica produtivamente em BWJ-MSCs.....	36
3.2 BoHV-5 regula o índice BCL-2/Bax.....	36
4 DISCUSSÃO.....	38
5 CONCLUSÃO.....	40
6 REFERÊNCIAS	41
CAPÍTULO II.....	54
1 ARTIGO CIENTÍFICO	54
ABSTRACT.....	55
INTRODUCTION.....	55
MATERIAL AND METHODS.....	57
Bovine Wharton´s jelly-derived multipotente mesenchymal stromal (bWJ-MSCs).....	57
Susceptibility of bWJ-MSCs cells to viral infection, viability assays and viral growth kinetics.....	57
Immunostaining for BCL-2 and Bax cell markers.....	59
Total RNA isolation and real time polymerase chain reaction (PCR).	59
Statistical analysis.....	60
RESULTS.....	60
BoHV-5 productively replicates in bWJ-MSCs.....	60

BoHV-5 infection up regulates BCL-2/Bax ratios.....	61
DISCUSSION.....	62
Acknowledgements.....	67
REFERENCES.....	67
ANEXO A	69
ANEXO B.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

BoHV-1	Herpesvírus bovino tipo 1
BoHV-2	Herpesvírus bovino tipo 2
BoHV-4	Herpesvírus bovino tipo 4
BoHV-5	Herpesvírus bovino tipo 5
BoHV-6	Herpesvírus bovino tipo 6
BoHV-7	Herpesvírus bovino tipo 7
CaHV-1	Herpesvírus canino tipo 1
CeHV-5	Herpesvírus cercopitecino tipo 5
CpHV-1	Herpesvírus caprino tipo 1
CvHV-1	Herpesvírus cervídeos tipo
EHV-1	Herpesvírus equídeos tipo 1
EHV-3	Herpesvírus equídeos tipo 3
EHV-4	Herpesvírus equídeos tipo 4
EHV-8	Herpesvírus equídeos tipo 8
EHV-9	Herpesvírus equídeos tipo 9
GaHV-1	Herpesvírus galináceo tipo 1
GaHV-2	Herpesvírus galináceo tipo 2
GaHV-3	Herpesvírus galináceo tipo 3
HHV-1	Herpesvírus humano labial
HHV-2	Herpesvírus humano genital
HHV-3	Herpesvírus humano da catapora
HHV-8	Herpesvírus humano tipo 8
IFN	Interferon
IFNγ	Interferon γ
IL	Interleucinas
MCP	Morte Celular Programada
Fas L	Fas Ligante
FIA	Fatores Indutores de Apoptose
SOD 1	Ezimas superóxido desmutase 1

AOP-1	Proteína anti-oxidante 1
HsP 70	Proteína do choque térmico 70
BWJ-MSCs	Células mesenquimais da geléia de Wharton do cordão umbilical bovino
P.I.	Pós –Infecção
IFA	Imunofluorescência
PFU	Unidade Formadora de Placa.
MDBK	Células de rim bovino <i>Madin-Darby</i>
NK	Natural Killer
SNC	Sistema Nervoso Central
SuHV-1	Herpes vírus suíno tipo 1
TK	Timidina quinase
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- FIGURA 1-** Alterações morfológicas decorrentes do processo de apoptose, que envolve alteração de permeabilidade de membranas, condensação da cromatina, encolhimento celular, formação de corpos apoptóticos sem desintegração de organelas..... 27
- FIGURA 2-** Mecanismos intrínsecos relacionados ao processo de infecção viral e sua relação com os processos de morte celular programada.)..... 29
- FIGURA 3-** Ilustração dos processos associados à MCP relacionados a mediadores mitocondriais..... 30

CAPÍTULO II

- FIGURA 1-** Photomicrographs representative of infected cells observed under phase contrast microscopy (x 40 magnification) and immunofluorescence for viral antigens (x 100 magnification). The cytopathic effect during 24 (A), 48 (C), 72 (E) and 96 (G) h post-infection (p.i.) showing syncytial cells from 48 h p.i. The viral antigens detected by immunofluorescence assay revealed an increase of label after 48 h p.i. (B)..... 64
- FIGURA 2-** Immunofluorescence images showing the Bax and BCL-2 antigens observed under fluorescence microscopy (x 100 magnification). The intensity of Bax antigens detection was

observed at higher grade at 48 and 96 h p.i (C-G). BCL-2 antigens were detected mostly at 48 and 72 h p.i. (D-F). The inset images show the uninfected bWJ-MSCs.
.....65

FIGURA 3- Kinetics of BoHV-5 replication and Bax/BCL-2 mRNA levels at different time points post-infection. The bWJ-MSCs infection revealed a productive infection (A) with plaque formation among infected monolayers (D,E) in comparison to uninfected ones (F). Real-time PCR was used to quantify the mRNA levels and fold-changes were calculated by $\Delta\Delta^{ct}$ method as compared with non-infection cell control (B) and using endogeneous bovine GADH mRNA level to normalization. The infected cells completely suppress the Bax mRNA expression after 48 h of infection ($p < 0.001$66

MEDIADORES DA VIA INTRÍNSECA DA MORTE CELULAR PROGRAMADA RELACIONADOS À INFECÇÃO IN VITRO PELO HERPESVIRUS BOVINO TIPO 5

RESUMO - O *herpesvirus* bovino tipo 5 (BoHV-5) é um *α -herpesvirus* responsável por uma doença neurológica em bovinos jovens e também, ocasionalmente incriminado em alterações reprodutivas. Apesar de vários estudos descreverem as vias do processo de apoptose induzidos por infecções virais, pertencendo à família *Herpesviridae*, poucas informações estão disponíveis sobre as vias intrínsecas da morte celular programada em interações entre BoHV-5 e seus hospedeiros. O BoHV-5 foi capaz, no presente estudo, de replicar e de produzir efeitos citopáticos, caracterizados por um aumento e fusão celular, tanto em células mesenquimais como nas epiteliais. Os antígenos virais foram detectados em células infectadas pela reação de imunofluorescência nos períodos pós-infecção (p.i) compreendido 48 à 96 h. De acordo com a observação dos períodos p.i., entre 48 e 72 h sinais intensos de fluorescência foram observados para a proteína anti-apoptótica BCL-2 e comparação à proteína apoptótica Bax. As células infectadas revelaram um aumento do fenótipo BCL-2 entre 48 e 96 h p.i por citometria de fluxo. Entre 48 a 96 h p.i a expressão de RNA mensageiro relacionado a proteína Bax não foi verificada em nenhuma célula infectada. Ao contrário, a expressão do RNA mensageiro relacionado a proteína BCL-2 foi quantificada em $\text{Log}_{10} 1,6 \times 10^2$ cópias de fita complementar de DNA (cDNA) em todos os p.i. O BoHV-5 quando está em fase de replicação nas células mesenquimais parece modular a expressão e respectiva transcrição gênica da proteína BCL-2, no sentido de aumentar a produção de partículas virais.

Palavras-Chave: Apoptose, Virose, Encefalites, Células, Imunidade Celular

INTRINSIC REAL ROUTE OF PROGRAMMED CELL DEATH RELATED TO INFECTION IN VITRO BY BOVINE HERPESVIRUS TYPE 5

SUMMARY - Bovine *herpesvirus 5* (BoHV-5) is α -*herpesvirus* responsible for neurological disease in young cattle and also occasionally incriminated in reproductive disorders. In spite of many studies describing the apoptotic pathways induced by viruses belonging to the family *Herpesviridae*, scarce information about intrinsic programmed cell death pathway in host-BoHV-5 interactions is currently available. BoHV-5 was able to replicate and to produce cytopathology characterized by cellular swelling and cell fusion on both mesenchymal and epithelial cell lines. Viral antigens were detected in infected cells by immunofluorescence assay at 48 to 96 h post-infection (p.i.). According to sequential p.i. observation, at 48 to 72 h p.i. higher fluorescent signals were visible for anti-apoptotic BCl-2 antigens in comparison to Bax, considered a pro-apoptotic protein. Infected cells revealed an increase of BCl-2 phenotype population from 48 to 96 h p.i. by flow cytometric analysis. At 48 to 96 h p.i. Bax mRNA was not expressed among of any infected cell monolayers. In contrast, BCl-2 mRNA was quantified $\text{Log}_{10} 1,6 \times 10^2$ cDNA copies at all p.i. for both cells. BoHV-5 replication seems to modulate BCl-2 expression and respective gene transcription in order to enhance production of progeny virus.

Keywords: Apoptosis, Virosis, Encephalitis, Cells, Celular inmunity

CAPÍTULO I

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Herpesvirus bovino tipo 5

O herpes vírus bovino tipo 5 (*bovine herpesvirus type 5/BoHV-5*) é um agente infeccioso membro da família *Herpesviridae*, sub-família *α -herpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*, responsável pela meningoencefalite necrótica em animais jovens, que acarreta significantes perdas econômicas no rebanho de gado de corte no Brasil, sendo relatado também em outros países. Como destacado por diversos autores, as perdas econômicas exatas causadas pelo BoHV-5 ainda não são bem definidas, em decorrência desta enfermidade ser pouco diagnosticada (CAMPOS et al., 2009; CZUPRYNSKI, 2009; DEL MÉDICO-ZAJAC et al., 2009; 2011a; RISSI et al., 2007). Já foram caracterizados mais de 200 *Herpesvirus*, provenientes de insetos, répteis e anfíbios, assim como, de praticamente todas as espécies de aves e mamíferos. A subfamília do BoHV-5 baseiam-se nas propriedades biológicas entre os vírus que a compõem e divide-se em três: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*. A primeira subfamília a *Alphaherpesvirinae* é constituída pelos *Alphaherpesvirus* caracterizados por sua ampla variedade de hospedeiros, desde o herpes vírus de humano até animais, por exemplo: o herpesvírus labial tipo1 (HHV-1) e o herpesvírus genital humano tipo2 (HHV-2), o herpesvírus da catapora ou tipo3 (VZV ou HHV-3), o herpesvírus bovinos tipo1, 2 e 5 (BoHV-1, 2 e 5), o herpesvírus caninos tipo1 (CaHV-1), o herpesvírus caprinos tipo1 (CpHV-1), o herpesvírus cervídeos tipo1

(CvHV-1), o herpesvírus equinos tipo 1, 3, 4, 8 e 9 (EHV-1, 3, 4, 8 e 9) o herpesvírus galináceos tipo 1, 2 e 3 (GaHV-1,2,3), o herpesvírus suínos tipo 1 (SuHV-1). E pelo seu rápido desenvolvimento de lise celular e, sua capacidade de desenvolver infecções latentes primariamente e também nos gânglios nervosos. A segunda subfamília *Betaherpesvirinae*, seus hospedeiros são limitados como o herpesvírus bovino tipo 7 (BoHV-7) e o herpesvírus cercopitecino tipo 5 (CeHV-5) infecta macacos verdes africanos, e a replicação tem ciclo longo. Em cultivo celular a infecção é muito lenta, desenvolve lise celular e ocorre citomegalia nas células infectadas, após alguns dias. Permanecer em latência nas glândulas secretoras, tecido linfóide, rins e outros tecidos. E a terceira subfamília *Gammaherpesvirinae*, seus hospedeiros são escassos, como exemplos o herpesvírus bovino tipo 4 e o tipo 6 (BoHV-4 e BoHV-6), e o herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8). E como todos os respectivos membros replicam-se em células linfóides e algumas produzem infecções citocidas em células epiteliais e fibroblásticas. Os vírus desta subfamília são específicos de linfócitos T e B, que são transformados em células tumorais (DAVISON et al., 2009; FENNER et al., 1992; FERRARI, 2007a; ICTV, 2013; OLIVEIRA; 2011).

O BoHV-5 é classificado em três subtipos, com base no perfil eletroforético do DNA, após clivagem em sítios específicos com enzimas de restrição, sendo designados BoHV-5 a (linhagem australiana N569), BoHV-5 b (linhagem argentina A663) e BoHV-5 c ou não “a” não “b” não corresponde a nenhuma citada anteriormente (D´ARCE et al., 2002; DEL MÉDICO-ZAJAC et al., 2011b). A estrutura da partícula viral consiste em um capsídeo, estrutura proteica com várias subunidades (capsômeros), externo contendo material genético de fita dupla de DNA e externamente

ligado a um revestimento fosfolipídico de membranas celulares, denominado envelope viral (DEL MÉDICO-ZAJAC et al., 2009; ICTV, 2013; ROIZMMAN; PELLET, 2007).

A distribuição geográfica deste vírus é limitada, com alta incidência de episódios neurológicos em países da América do Sul, principalmente Brasil e Argentina, sendo em outras partes do mundo o seu relato esporádico. A presença de vírus já foi relatada em sêmen de animais saudáveis, com ocorrência de casos clínicos em fêmeas inseminadas com sêmen contaminado (ESTEVEZ et al., 2003; GOMES et al., 2003; RISSI et al., 2008; CAMPOS et al., 2009; KIRKLAND et al., 2009; CARDOSO et al., 2011; DEL MÉDICO-ZAJAC et al., 2011a; LADELFA et al., 2011a).

No estudo realizado por Campos et al., (2009) para determinar a prevalência do BoHV-5 e BoHV-1 em fragmentos do tecido proveniente do nervo trigêmeo de 200 bovinos (sem sinais clínicos das doenças) no estado do Rio Grande do Sul, resultados positivos para ambos os vírus foram observados em 75.9% das amostras. Neste trabalho a prevalência do BoHV-5 no rebanho foi de 93.1%, revelando a importância desta enfermidade no estado do Rio Grande do Sul.

A homologia genética entre os dois subtipos virais pode ser a responsável pela proteção cruzada entre os vírus, pelo emprego da imunização ativa e passiva, que já foi demonstrada experimentalmente em bovinos (CAMPOS et al., 2011; DEL MÉDICO-ZAJAC et al. 2009, 2011a,2011b). Essa reatividade cruzada tem sido responsabilizada, em parte, pela baixa prevalência do BoHV-5 e, pela ocorrência rara da enfermidade neurológica, em países que vacinam bovinos regularmente contra o BoHV-1 (CAMPOS et al., 2011), mas segundo estudos, esta baixa prevalência dos casos de BoHV-5 se deve

ao não reconhecimento da doença que é negligenciada (DEL MEDICO ZAJAC et al., 2009).

Os testes sorológicos de rotina, muitas vezes, são incapazes de distinguir entre o BoHV-1 e o BoHV-5, devido a sua baixa sensibilidade e principalmente pela semelhança antigênica (ABDELMAGID et al., 1995; D`ARCE et al., 2002; SCHUDEL et al., 1986). O emprego de diversas estirpes virais do BoHV-5 no desenvolvimento da técnica de soroneutralização tem demonstrado aumento na sensibilidade, podendo se fazer a diferenciação entre aqueles dois vírus, que apresentam homologia antigênica, e ser utilizado como ferramenta na caracterização e erradicação viral em determinadas regiões (CARDOSO et al., 2010a; DEL MÉDICO-ZAJAC et al., 2011a; FERRARI et al., 2007b; MAHONY, 2009).

BoHV-5 até o ano de 1992 era classificado como subtipo 1.3 do BoHV-1, em virtude da similaridade entre as duas partículas virais, incluindo sua morfologia, efeito citopático em cultura de células MDBK (Células de rim bovino *Madin-Darby /Madin-Darby bovine kidney cells*) e, a não diferenciação de ambos, nos testes de imunofluorescência e soroneutralização em resultados positivos (DEL MÉDICO-ZAJAC et al., 2009). Estudos filogenéticos baseados nas glicoproteínas B e D também evidenciaram semelhanças entre o BoHV-1 e o BoHV-5 (ABDELMAGID et al., 1995; CAMPOS et al., 2009; SCHUDEL et al., 1986). Ademais, a comparação entre as duas partículas virais, pelo uso de estudos *in vitro*, revelou diferenças genéticas e antigênicas nas análises de restrição enzimática de DNA (D`ARCE et al., 2002), testes de neutralização cruzada (CAMPOS et al., 2009), especificidade dos anticorpos monoclonais, amplificação da região genômica TK (Timidina quinase/*Timidine kinase*)

(DEL MÉDICO-ZAJAC et al., 2009; 2011a; 2011b; LADELFA et al., 2011a; 2011b; MARIN et al., 2012).

O BoHV-5 possui a capacidade de invasão do sistema neurológico, tanto em infecção natural quanto na experimental, em bovinos (PEREZ et al., 2002; VOGEL et al., 2003), ovinos (SILVA, et al., 1998; SILVA et al., 1999), lagomorfos (CARON et al., 2002) e em caprinos jovens (DEL MÉDICO-ZAJAC et al., 2009). Entretanto, já foi detectado BoHV-1 em material clínico do sistema nervoso central em levantamentos epidemiológicos de bovinos jovens (DEL MÉDICO-ZAJAC et al., 2009).

Os pequenos ruminantes são importantes hospedeiros da enfermidade, uma vez que o vírus desenvolve latência nessas espécies e podem atuar como transmissores da enfermidade para bovinos imunossuprimidos em condições naturais, nos momentos de imunossupressão, sendo comum o pastoreio de bovinos e caprinos em um mesmo ambiente no Brasil (SILVA et al., 1998).

1.2 Transmissão, patogenia e patologia das infecções pelo BoHV-5

A transmissão de BoHV-5 ocorre principalmente por contato direto ou indireto entre bovinos, e os sítios de replicação primária são as mucosas oral, nasal, orofaríngea e ocular (ABRIL et al., 2004). Nesses locais, ocorre uma fase de replicação primária em células epiteliais, após a qual o vírus invade as terminações nervosas e é transportado até neurônios de gânglios sensoriais, onde o agente pode replicar ativamente ou estabelecer latência (CHOWDHURY et al., 2000; PEREZ et al., 2002; VOGEL et al., 2003). O BoHV-5 pode invadir o sistema nervoso central (SNC) por duas vias: transporte intra-axonal por nervos cranianos ou pela via hematogena (CARON et al., 2002; RISSI et al., 2007). É importante ressaltar que o BoHV-5 pode ser reativado e eliminado por secreções fisiológicas do hospedeiro, sem ocasionar quadro clínico aparente ou durante os episódios agudos da doença (CARON et al., 2002; PEREZ et al., 2002; VOGEL et al., 2003). Esta característica biológica é de extrema importância, visto que o animal infectado, e exibindo a forma latente, torna-se um reservatório natural do BoHV-5, podendo em certas situações ser reativado em qualquer momento da vida do animal (RISSI et al., 2007).

Por outro lado, o animal infectado experimentalmente pode desenvolver a sintomatologia clínica, como meningoencefalite, similar à observada em casos naturais agudos que ocorrem no campo (CARON et al., 2002; CARDOSO et al., 2010b; PEREZ et al., 2002; VOGEL et al., 2003;). Tanto o DNA viral, como partículas, virais íntegras já foram evidenciadas em sêmen de reprodutores, e em cérebros de bovinos, sem sintomas clínicos aparentes (CARDOSO et al., 2011; DEL MÉDICO-ZAJAC et al., 2011a; DIALLO et al., 2010; ESTEVES et al., 2003; GOMES et al., 2003; KIRKLAND et al., 2009; RISSI et al., 2008; RODRÍGUEZ et al., 2012).

A replicação lítica dos vírus no organismo ativa a resposta imune inata, com o objetivo de prevenir que este ciclo se complete e, assim, limitar a disseminação da infecção, até que a imunidade específica seja acionada (CZUPRYNSK, 2009; GRIFFIN et al., 2010; HAY; KANNOURAKIS, 2002; LAMKANFI; DIXIT, 2010; SCHWARTZMAN; CIDOLOWSKI, 1993). A resposta inflamatória contra vírus no SNC (Sistema Nervoso Central) é mediada por macrófagos e células da glia, que liberam citocinas como interferon (IFN) α e β , interleucinas (IL) 1 e 6 e fator de necrose tumoral α (TNF- α), além de IFN γ , constituindo a primeira linha de defesa do organismo (KANNOURAKIS, 2002). As citocinas são mediadores fundamentais para a diferenciação, amplificação e regulação da resposta imune (GRIFFIN et al., 2010). Os interferons estimulam linfócitos T CD8+ (citotóxicos) e células *natural killer* (NK), que destroem as células infectadas, enquanto que, outras citocinas ativam linfócitos T CD4+ (auxiliares), que liberam IFN γ e finalmente promovem a síntese de anticorpos pelos linfócitos B (ABRIL et al., 2004).

Ao contrário à maioria dos outros membros da subfamília *α -herpesvirinae*, a reativação do BoHV-5 é frequentemente acompanhada da supressão dos sintomas clínicos, tanto em infecções naturais, como nos modelos biológicos experimentais (VOGEL et al., 2003). Nos animais que sobrevivem à manifestação clínica, principalmente nos casos agudos, o BoHV-5 estabelece uma fase longa de latência viral que pode ser reativada sob certas circunstâncias naturais ou por estímulos específicos (DEL MÉDICO-ZAJAC et al., 2009) tornando o animal infectado em uma fonte de infecção direta ou indiretamente para outros animais (OLIVEIRA; 2011).

As lesões associadas à infecção do BoHV-5 no SNC têm sido amplamente documentadas em bovinos com quadro de meningoencefalite não supurativa (CARDOSO et al., 2010b; MACHADO et al., 2013; PEREZ et al., 2002; RISSI et al., 2007; VOGEL et al., 2003). Além disso, essas lesões também já foram descritas em outras espécies animais, como lagomorfos e ovinos (CARON et al., 2002; SILVA et al., 1998; SILVA et al., 1999). A localização e intensidade das alterações histopatológicas no SNC de bovinos, afetados por meningoencefalite ocasionada pelo BoHV-5, são mais acentuadas nas porções rostrais do telencéfalo (RISSI et al., 2007). Da mesma forma, a ausência de lesões no gânglio de Gasser, de bovinos afetados pela doença, fornecem fortes evidências de que a via olfatória é a principal rota de invasão do vírus no SNC em surtos espontâneos (RISSI et al., 2007). Apesar disso, ainda existem dúvidas quanto ao papel da viremia na invasão do SNC por BoHV- 5 (CHOWDHURY et al., 2000).

As principais alterações histopatológicas resumem-se em degeneração neuronal e intensa resposta inflamatória, acompanhadas de intenso infiltrado linfocitário, com ou sem focos hemorrágicos (RISSI et al., 2007). Em um estudo anterior, subpopulações de linfócito CD3+ associadas às áreas de intenso acúmulo celular no SNC foram descritas em bovinos acometidos pelo BoHV-5 (CARDOSO et al., 2010b). Da mesma forma, em coelhos experimentalmente infectados, intenso infiltrado inflamatório, com predominância de subpopulação de linfócitos CD3+, foi recentemente demonstrado (MACHADO et al., 2013). Uma hipótese para a disseminação do BoHV-5 em diferentes regiões do SNC seria a circulação destas células imunocompetentes, contribuindo para a diversidade dos focos inflamatórios decorrentes da infecção viral (MACHADO et al., 2013).

A latência é uma característica da família *Herpesviridae*, que permite ao agente se manter por tempo indeterminado nos indivíduos infectados, sem o desenvolvimento de manifestações clínicas (GRIFFIN et al., 2010). A capacidade de estabelecer infecções latentes é, provavelmente, a propriedade viral mais significativa a ser considerada no controle das enfermidades produzidas pelos componentes desta família viral (HAY; KANNOURAKIS, 2002).

Em síntese, nos bovinos, os locais de latência incluem o gânglio do nervo trigêmeo, córtex telencefálico, mesencéfalo, ponte, cerebelo, medula e, menos frequentemente, bulbo olfatório (CHOWDHURY et al., 2000; VOGEL et al., 2003). Entretanto, já foi descrito a importância do bulbo olfatório como porta de entrada para o BoHV-5 em coelhos, e a detecção por hibridização *in situ* de genoma BoHV-5 nesta área (CARDOSO et al., 2010a, 2010b; CARON et al., 2002). A reativação e excreção do vírus podem ocorrer naturalmente, em situações de estresse ou experimentalmente, após administração de corticoides (PEREZ et al., 2003; VOGEL et al., 2003). Essas situações propiciam condições para a transmissão e disseminação do agente para outros indivíduos suscetíveis (CARON et al., 2002). Após reativação, o vírus replica ativamente nos gânglios sensoriais e é transportado pelos axônios em direção centrífuga, de volta aos locais de replicação primária, ocorrendo assim replicação no local e excreção (CHOWDHURY et al., 2000).

1.3 Sistemas in vitro de propagação do BoHV-5

No isolamento viral, no sistema de cultivo celular contínuo, os *α-herpesvírus* replicam-se rapidamente produzindo efeitos citopáticos característicos, entretanto, em alguns casos, esse efeito não é evidente, dificultando a sua completa caracterização. Esse comportamento divergente provavelmente é decorrente da adaptação viral ao sistema *in vitro* (CARDOSO et al., 2007; GEISER et al., 2008; GUYOING, ROIZMAN, 2012; KIM et al., 2005; LADELFA et al., 2011a; LADELFA et al., 2011b; MARIN et al., 2012; XU et al., 2012). As células mais utilizadas para este propósito são as derivadas de tecido bovino, como a MDBK e BT (*bovine testis*) (CARDOSO et al., 2007; MARIN et al., 2011).

Entretanto, trabalhos revelam baixa sensibilidade deste método, no que se refere ao isolamento direto de partículas virais proveniente de amostras clínicas, mas segundo Vogel et al. (2003) esta baixa sensibilidade está relacionada com a distribuição viral e a região escolhida do SNC para o isolamento, pois a concentração viral difere de uma região para outra. As técnicas convencionais de vírus-neutralização, de imunofluorescência direta e/ou indireta e imunoperoxidase são as mais aplicadas para o diagnóstico da infecção viral, a partir de amostras clínicas, mas não permitem a diferenciação entre o BoHV-1 e/ou BoHV-5 (CAMPOS et al., 2009).

Contrariamente aos estudos *in vivo*, as células MDBK representam uma alternativa para os ensaios *in vitro*. Nos sistemas de cultivo celular, os BoHV-1 e BoHV-5 compartilham um comportamento biológico semelhante com a produção de efeitos citopáticos característicos, como formação de sincícios (CARDOSO et al., 2007;

GEISER et al., 2008; GUYOING; ROIZMAN, 2012; KIM et al., 2005; LADELFA et al., 2011a; LADELFA et al., 2011b; MARIN et al., 2012; XU et al., 2012). Recentemente, foi demonstrada a capacidade de gerar partículas virais recombinantes entre o BoHV-1 e BoHV-5 após infecções concomitantes em um modelo *in vitro* (DEL MÉDICO-ZAJAC et al., 2011b; LADELFA et al., 2011a; MARIN et al., 2012). Essas partículas novas geradas revelaram atenuação e estabeleceram formas latentes quando inoculadas em modelos *in vivo* (DEL MÉDICO-ZAJAC et al., 2011).

Em um estudo recente foi descrito o uso de células *neuron-like*, diferenciadas de células mesenquimais do cordão umbilical bovino, como uma alternativa para replicação do BoHV-5. Este sistema pode possuir a capacidade de evidenciar aspectos relacionados à morte neuronal, decorrente da infecção com variantes do BoHV-5 (CARDOSO et al., 2012a; 2012b).

1.4 Processos de morte celular programada (MCP)

É difícil, se não impossível, que um vírus infecte uma célula sem ativar uma das vias do processo fisiológico da morte celular programada, ou também denominada de processo de apoptose (POONIA et al., 2009). A morte celular programada (MCP) é um processo que ocorre nos organismos multicelulares para o descarte de células indesejadas (SCOTT, 2010). Este processo possui papel importante durante todo desenvolvimento, como na homeostase tecidual, regeneração, organogênese, hematopoiese normal e patológica, eliminação de células após dano por agentes genotóxicos, principalmente na resposta inflamatória e durante a infecção viral (POONIA et al., 2009; SCOTT, 2010; SCHWARTZMAN; CIDLOWSKI, 1993).

O processo de apoptose, um tipo de MCP característico, se caracteriza por eventos como a redução do volume celular, cromatina condensada, seguido da formação de prolongamentos na membrana celular, com a desintegração do núcleo e presença de fragmentos envoltos pela membrana nuclear, além da desintegração celular em vesículas chamadas “corpos apoptóticos” também conhecidos como apoptossomas como ilustra a Figura 1 (SCOTT, 2010). Estes corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos, e como resultado, a célula desaparece sem nenhum fenômeno inflamatório decorrente (KRZYZOWSKA et al., 2011; LIAO et al., 2010).

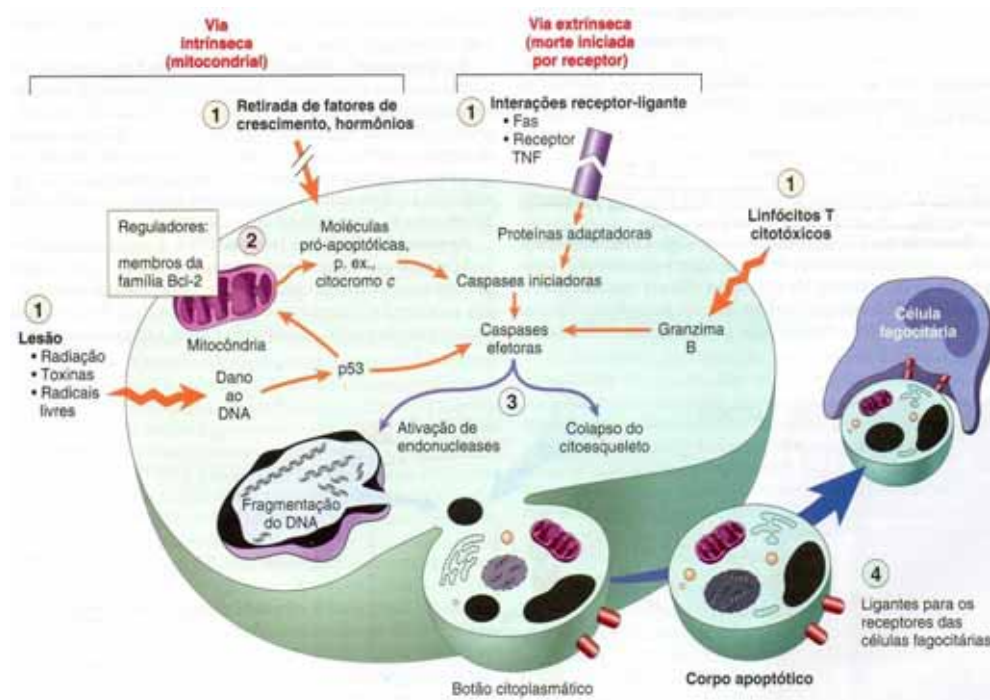


FIGURA 1- Alterações morfológicas decorrentes do processo de apoptose, que envolve alteração de permeabilidade de membranas, condensação da cromatina, encolhimento celular, formação de corpos apoptóticos sem desintegração de organelas (Fonte: Robbins & Cotran - Bases Patológicas das Doenças, 7.ed., ELSERVIER 2006).

A ativação do processo de apoptose pode ser iniciada de duas maneiras; a primeira pela via extrínseca e a segunda pela via intrínseca. A primeira via segue ativando receptores de superfície celular, que acarreta a transmissão de sinais por proteínas ligantes específicas (CHANG et al., 2007; KRZYZOWSKA et al., 2006; KRZYZOWSKA et al., 2011; LIAO et al., 2010; POONIA et al., 2009; XU, 2012). A proteína denominada Fas ligante (FasL) mantém uma parte da molécula interiorizada na membrana celular e outra, posicionada para o lado externo da mesma (CHANG et al., 2007). Essa molécula externa possui a propriedade de ligar-se a outro receptor na membrana celular dos linfócitos T citotóxicos promovendo o reconhecimento da célula-alvo, a molécula FasL, une-se à Fas e altera a forma da parte externa dessa última molécula (POONIA et al., 2009). Essa alteração faz com que a parte interna ative a caspase 8, iniciando a cascata de caspases, mecanismo esse ilustrado na Figura 2 (KRZYZOWSKA et al., 2006; KRZYZOWSKA et al., 2011).

Outros sinalizadores como CD95 ou Apaf-1 e TNF α (receptor fator de necrose tumoral) também ativam a via extrínseca da MCP, por ativação de receptores da membrana celular. Esse estímulo leva ao recrutamento e ativação proteolítica da pró-caspase 8, ativando as caspases 3, 6 e 7, consideradas como efetoras da MCP (SCHWARTZMAN; CIDLOWSKI, 1993).

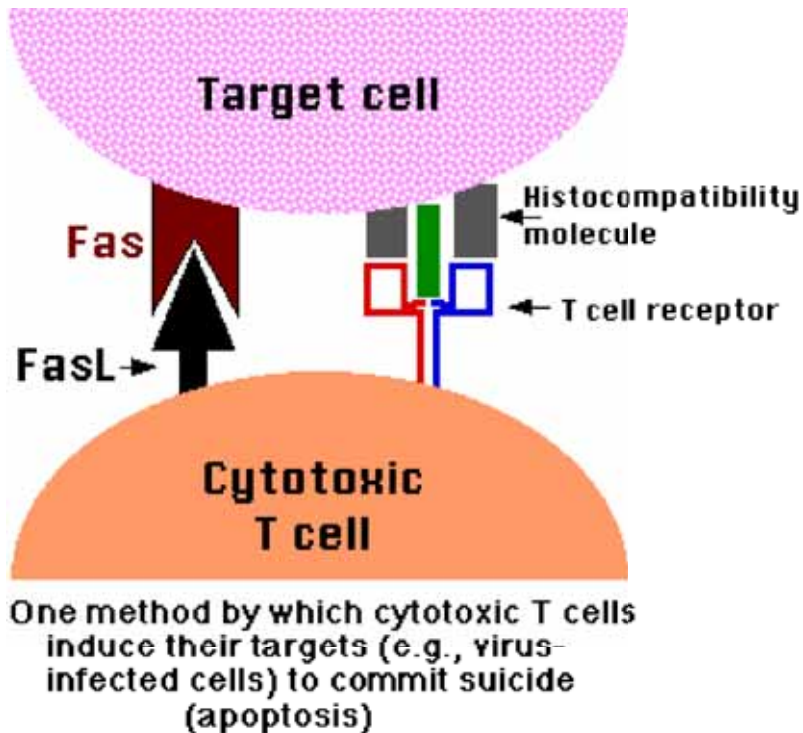


FIGURA 2- Mecanismos intrínsecos relacionados ao processo de infecção viral e sua relação com os processos de morte celular programada. (Fonte: <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/A/Apoptosis.html#Bcl-2>).

Outra via seria a via intrínseca (mitocondrial), que envolve a ativação de um membro pró-apoptótico da família BCL-2. Este grupo é composto por proteínas pró e anti-apoptóticas, que previnem a ativação da caspase através da preservação da membrana mitocondrial (OHATA; NISHIYAMA, 2011). Em um estudo recente, foi verificada a modulação da expressão de BCL-2 pela infecção experimental de células mesenquimais bovinas (GARCIA, 2013).

A atividade das proteínas BCL-2 anti-apoptóticas, como Bax e Bak é antagonizada por meio de de proteínas BH3-únicas. Em resposta ao estímulo apoptótico, as BH3-únicas se translocam para a mitocôndria onde agem de forma contrária a ação das Bcl-2 e ativam assim a Bax e Bak, proteínas pró-apoptóticas (BALOUL et al., 2004; BRAS et al., 2005; DEVIREDDY; JONES, 1999; GOUYING;

ROIZMAN, 2012). Estas proteínas mudam a sua conformação e aumentam a permeabilidade da membrana mitocondrial externa (OHATA; NISHIYAMA, 2011). Este ato leva a liberação do citocromo *c* no citosol celular, e consequente ativação das caspases efetoras (GEISER et al., 2008; KARASNEH; SHUKLA, 2011). A ativação das caspases efetoras leva a associação ao fator apoptose 1 (Apaf-1) e às pró-caspases 9 como ilustra a Figura 3.

A liberação de outras proteínas mitocondriais, como os fatores indutores de apoptose (FIA), também contribuem para a ocorrência do processo de MCP (KARASNEH; SHUKLA, 2011). Além de seu papel fundamental no controle do processo de apoptose durante a infecção, outras funções já foram atribuídas à mitocôndria, principalmente relacionada à sinalização para resposta imune inata durante a infecção viral (SCOTT, 2010; OHATA; NISHIYAMA, 2011).

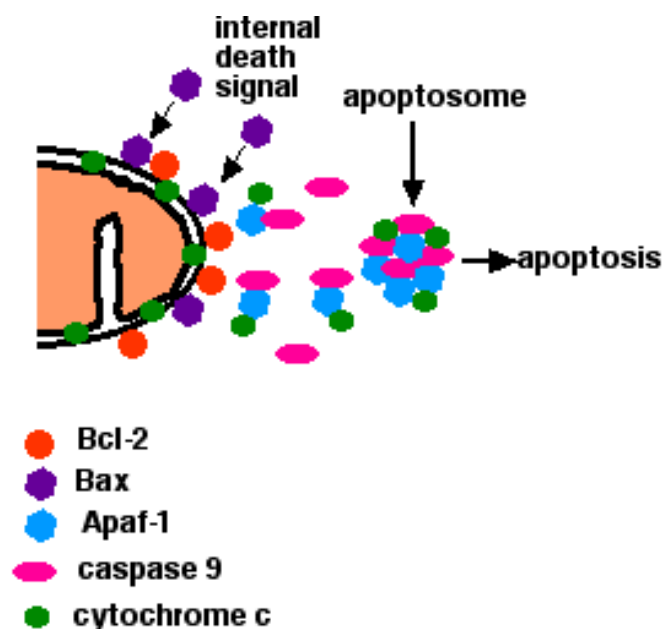


FIGURA 3- Ilustração dos processos associados à MCP relacionados a mediadores mitocondriais (Fonte: <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/A/Apoptosis.html#Bcl-2>).

A mitocôndria é uma organela dinâmica, composta de dupla membrana, e é responsável por uma gama de processos celulares, como a geração de ATP, homeostase do cálcio, biossíntese de aminoácidos, lipídeos e nucleotídeos, e como anteriormente citado, a apoptose (OHATA; NISHIYAMA, 2011). Em estudos anteriores, indícios de sua participação na resposta imune inata, mais precisamente na sinalização de receptores de reconhecimento padrão (RRP), foram demonstrados (SCOTT, 2010).

Após a infecção, o reconhecimento de patógenos ocorre com auxílio dos receptores, componentes da resposta imune inata, que detectam padrões moleculares compartilhados pelos diferentes tipos de microrganismos (BRAS et al., 2005; HAY; KANNOURAKIS, 2002; KOSHIBA, 2012; LAMKANFI; DIXIT, 2010;).

Estes receptores são expressos no citosol de células imunes e não imunes, e são necessários na produção do interferon tipo 1 e citocinas pró-inflamatórias durante a resposta viral (BRAS et al., 2005; HAY; KANNOURAKIS, 2002; KOSHIBA, 2012; LAMKANFI; DIXIT, 2010;). Em 2005, Bras et al., identificou uma nova molécula, denominada proteína sinalizadora antiviral mitocondrial, sendo que esta possui papel essencial na sinalização dos receptores da MCP, confirmando a participação da mitocôndria na resposta imune inata contra patógenos virais.

A mitocôndria também participa de forma crucial na infecção viral, no que diz respeito à produção de energia e no seu metabolismo da oxidação. Uma das funções primárias da mitocôndria é a redução do oxigênio à água durante a fosforilação oxidativa a fim de produzir adenosina trifosfato (ATP). Alterações nos níveis de

oxigênio são detectadas pela mitocôndria e comunicados a célula por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (KOSHIBA, 2012).

1.5 Herpesvirus bovino tipo 5 e os processos de morte celular programada.

Os escassos estudos envolvendo os mecanismos de MCP relacionados à infecção e replicação viral dos α -herpesvirus bovino estão relacionados ao subtipo BoHV-1 (HANON et al., 1998a; HANON et al., 1998b; XU et al., 2012). Em um estudo anterior foi descrito que o BoHV-1 seria capaz de induzir o processo de MCP em subpopulações de células mononucleares de sangue periférico bovino, tais como linfócitos B e T (HANON et al., 1998a). Entretanto, é importante ressaltar que a total internalização da partícula viral não é por si só um evento fundamental para iniciar a MCP (HANON et al., 1998b).

Nos processos de infecção *in vitro*, principalmente em monocamadas de células MDBK, foi demonstrado que o BoHV-1 ativa o processo nuclear dependente *p53* (DEVIREDDY; JONES, 1999). Com relação à infecção por BoHV-5, Brenner et al. (2012), em estudo com cultivo de blastocistos bovinos, relatam que a exposição dessas células por este vírus, levou a uma regulação da enzimas superóxido desmutase 1 (SOD 1), proteína semelhante à proteína anti-oxidante 1 (AOP-1) e a proteína do choque térmico 70 (HsP 70). Recentemente, Silva-Frade et al. (2010a; 2010b), demonstraram que a exposição experimental de oócitos, espermatozóides e embriões com BoHV-5 não interfere na qualidade embrionária ou no desenvolvimento *in vitro*. Da mesma forma, a exposição de sêmen bovino ao BoHV-5 não acarreta alterações nos parâmetros normalmente analisados na comercialização deste material biológico (SOUZA et al.,

2010). Assim, é possível inferir que o BoHV-5 possui mecanismos desconhecidos para inibir a morte celular e evitar a ação do sistema imunológico do hospedeiro em alguns tipos celulares.

Dessa forma, foi demonstrado que a proteína viral US3, tanto interfere na estrutura dos filamentos citoplasmáticos, bem como nos processos de MCP ou apoptose (LADELFA et al., 2011b). Comparativamente, o *herpesvirus simplex*, pertencente à mesma subfamília *α -herpesvirinae* do BoHV-5 ativa diferentes mecanismos da MCP, dependendo do tipo celular envolvido *in vivo* (ESAKI et al., 2010; GEISER et al., 2008).

Recentemente, um estudo demonstrado por Xu et al. (2012), em monocamadas de células MDBK demonstrou que o BoHV-1 induz ao processo de MCP pelas duas vias, simultaneamente, sugerindo uma interação durante o processo intrínseco e extrínseco. Dessa forma, as atividades de replicação viral (BoHV-1) ativaram a caspase 8 pela via do receptor Fas/FasL. Por fim, foi demonstrado que a infecção pelo BoHV-1 induz, simultaneamente, a ativação de fatores ligados à mitocôndria. Em verdade, muitos agentes virais induzem a MCP por modular a expressão de Bax/BCL-2 (Figura 3). É conhecido que a infecção *in vitro* de monocamadas de células MDBK induz a um aumento na expressão de Bax, apesar de altos títulos virais estarem relacionados a uma maior sobrevivência das células, por expressão de BCL-2.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Diante de todo o exposto, em virtude de ausência de estudos envolvendo infecção BoHV-5 e os mecanismos de MCP, avaliou os mecanismos intrínsecos e extrínsecos relacionados à interação do BoHV-5 com células permissivas. Os resultados a serem observados abrem novas perspectivas para a compreensão das vias de bloqueio, possíveis para intervenção do processo de replicação viral.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Isolar e caracterizar as células mesenquimais bovinas derivadas da geléia de Wharton do cordão umbilical bovino(BWJ-MSCs);
- ✓ Promover a infecção de monocamadas de células mesenquimais bovinas com a estirpe viral BoHV-5 (AY06417) pertencente ao Laboratório Virologia, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba;
- ✓ Avaliar parâmetros como: formação de sincícios, presença de antígenos virais e viabilidade celular em monocamadas infectadas e não infectadas;

- ✓ Acompanhar a expressão antigênica e gênica dos fatores BCl-2 (anti-apoptótico) e Bax (apoptótico) durante os períodos 24, 48, 72 e 96h após infecção com o BoHV-5, por imunofluorescência e RT-PCR quantitativo e correlacionar com a titulação viral;

3 RESULTADOS

3.1 BoHV-5 replica produtivamente em BWJ-MSCs

BoHV-5 foi capaz de replicar e produzir efeitos citopáticos às 48h *P.I.*(*pós -infecção*) com antígenos virais detectados pelo teste de imunofluorescência (IFA) (Figura 1). O efeito citopático foi caracterizado como o inchaço celular e fusão das células, seguida por placas arredondadas dispersas na monocamada de células (Figura 1). A intensidade de antígenos virais detectados por IFA aplicando o anticorpo monoclonal contra glicoproteína C viral foi também aumentando de acordo com os intervalos pós-infecção. Estes resultados demonstram que BWJ-MCS são susceptíveis a infecção produtiva BoHV-5.

3.2 BoHV-5 regula o índice BCL-2/Bax

A imunomarcagem demonstrou a expressão de Bax/BCL-2 em diferentes intervalos pós-infecção (*P.I.*). Como mostrado na Figura 2 às 24 horas *P.I.*, as células infectadas não expressam antígenos Bax/BCL-2 na sua superfície, igual ao observado em células não infectadas (Figura inserções). De acordo com observações progressivas pós-infecção, de 48 a 72 horas *P.I.* elevados sinais fluorescentes eram visíveis para os antígenos da BCL-2 em comparação com o Bax (Figura 2). A transcrição de genes Bax/BCL-2, conforme apurado por meio de medições de mRNA, revelou que às 24 h *P.I.* os genes Bax e Bcl-2 foram expressos igualmente entre as células infectadas e não infectadas, ao passo que foram detectados títulos virais como 3×10^3 PFU(unidade formadora de

placa) / ml (Figura 3). Na sequência de um aumento nos títulos de vírus (Figura 3), em 48-96 h *P.I.*, mRNA Bax não foi detectado em monocamadas de células infectadas (Figura 3). Em contraste, o mRNA BCL-2 foi detectado nos momentos p.i. A formação de placas revelou que a infecção pelo BoHV-5 foi uma infecção produtiva (Figura 3) quando comparado com bwj-MSCs não infectadas. Apesar de muitos estudos que demonstram a capacidade de outros α -herpesvírus para induzir ou suprimir alguns fatores pro-e anti-apoptóticos, esta é a primeira descrição de células não-epiteliais expressando valores mais elevados de Bcl-2 durante a infecção, acompanhado pela supressão Bax durante uma fase de produção da replicação viral.

4 DISCUSSÃO

Este estudo foi iniciado para avaliar o impacto do BoHV-5 e para explorar a expressão de mediadores apoptóticos BCL-2/Bax neste contexto. Como as culturas de células primárias são relativamente difíceis de obter e manter ao longo de várias passagens, as células de Madin-Darby do rim de bovino (MDBK) são comumente utilizados para isolamento e multiplicação do BoHV-5 (CARDOSO et al., 2007; MARIN et al., 2010). Alguns α -herpesvírus, como vírus da pseudo-raiva (PRV) e vírus herpes simplex (HSV) são capazes de crescer numa grande gama de tipos de células. A variedade de hospedeiros do BoHV-5 não foi investigada extensivamente (DERUELLE et al., 2010; DUFOUR et al., 2011; ESAKI et al., 2010). Este estudo traz novas informações sobre a replicação do BoHV-5 em células não-epiteliais derivadas de bovinos. Durante a replicação do vírus, as culturas BWJ-MSCs desenvolveram citopatologia semelhantes aos reportados para as células MDBK (MARIN et al., 2010). Além disso, os parâmetros relacionados com a replicação *in vitro* de vários BoHV-5, o tamanho da placa após a infecção das monocamadas de MDBK foram relatados (MARIN et al., 2010). Em comparação com este estudo, a morfologia da placa e títulos virais descritos após a infecção pelo BoHV-5 em BWJ-MSCs chegou títulos semelhantes.

Indução e supressão da apoptose por infecção viral são eventos comuns na patogênese viral (GRIFFIN et al., 2010). A BCL-2 foi localizada na membrana nuclear, retículo endoplasmático e também na membrana mitocondrial externa (OHTA; NISHIYAMA, 2011). Além disso, Bax é uma proteína integral de membrana de organela, em particular da mitocôndria (OHTA; NISHIYAMA, 2011). Estas duas proteínas são intimamente relacionadas com o equilíbrio dos fenômenos de apoptose e anti-apoptose relacionados com a infecção por vírus. Neste estudo, nas fases iniciais da replicação do BoHV-5 (24-48 h de pós-infecção), um aumento na expressão de BCL-2 coincide com o aumento dos

títulos virais. Esta modulação tem sido igualmente descrita em outros membros da família Herpesviridae (OHTA; NISHIYAMA, 2011), no entanto esta é a primeira descrição relacionada para o BoHV-5. Com base no fato de que mais de 130 espécies de Herpesvírus distintas foram identificadas até à data, como um grupo, possuem um impressionante amplo espectro de hospedeiros, a ativação de alguns mediadores anti-apoptóticos, a fim de promover a sobrevivência da célula parece ser crucial para a replicação viral (GRIFFIN et al., 2010). As células estaminais mesenquimais (MSCs) são células progenitoras multipotentes e podem ser cultivadas a partir de tecidos adultos e fetais (CREMONESI et al., 2011). Recentemente, uma linha de células mesenquimais bovina foi descrita, sendo isoladas a partir de camada de geleia de Wharton (CARDOSO et al., 2012). Esta característica biológica de regulação imune tem sido demonstrada por outros (CREMONESI et al., 2011). Em conclusão, o uso de MSCs em estudos virológicos abre novas perspectivas para futuros estudos relacionados com interações célula-vírus.

Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo do papel da mitocôndria durante a infecção por BoHV-5. A interação entre as liberações de Bcl-2 durante a replicação *in vitro* do BoHV-5 traz novas informações sobre a interação hospedeiro-vírus.

5 CONCLUSÕES

- ✓ As condições de isolamento e manutenção de monocamadas de células mesenquimais originárias da geleia de Wharton, provenientes de cordões umbilicais bovinos foram padronizadas com sucesso;
- ✓ A infecção de monocamadas de células mesenquimais bovinas com a estirpe viral BoHV-5 (AY06417) pertencente ao Laboratório Virologia, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba foi executada após 3 passagens.
- ✓ A comprovação da replicação viral foi realizada com a visualização de efeitos citopáticos, formação de sincícios e pela obtenção de fluorescência positiva com o uso de anticorpos monoclonais;
- ✓ A infecção viral aumentou a viabilidade celular até 72 h pós-infecção correlacionando positivamente com altos títulos virais e maior expressão da proteína anti-apoptótica BCL-2, quando comparada á expressão da proteína Bax ($p < 0.05$);

6 REFERÊNCIAS

ABBAS, ABUL K.; FAUSTO, NELSON; KUMAR, VINAY; MITCHELL, RICHARD N. *Robbins & Cotran : Bases Patológicas das Doenças*, 7ª Ed ELSERVIER, 2006.

ABDELMAGID, O.Y.; MINOCHA, H.C.; COLLINS, J.K.; CHOWDHURY, S.I. Fine mapping of bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) glycoprotein D (gD) neutralizing epitopes by type-specific monoclonal antibodies and sequence comparison with BoHV-5 gD. *Virology*, v. 206, p. 242-253, 1995.

ABRIL, C.; ENGELS, M.; LIMAN, A.; HILBE, M.; FRANCHINI, M.; SUTER, M.; ACKERMANN, M. Both viral and host factors contribute to neurovirulence of bovine herpesviruses 1 and 5 in interferon receptor-deficient mice. *Journal of Virology*, v. 78, p. 3644-3653, 2004.

BALOUL, L.; CAMELO, S.; LAFON, M. Up-regulation of Fas ligant (FasL) in the central nervous system: A mechanism of imune evasion by rabies virus. *Journal Neurovirology*, v. 10, p. 372-382, 2004.

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S.A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry*, v. 70, p. 231-239, 2005.

BRENNER, M. P.; SILVA-FRADE, C.; FERRAREZI, M.C.; GARCIA, A. F. FLORES, E.F.; CARDOSO, T. C.. Evaluation of developmental changes in bovine in

vitro produced embryos following exposure to bovine Herpesvirus type 5. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 10, p. 53, 2012.

CAMPOS, F. S.; FRANCO, A. C.; HÜBNER, S. O.; OLIVEIRA, M. T.; SILVA, A. D.; ESTEVES, P. A.; ROEHE, P. M.; RIJSEWIJK, F. A. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in Southern Brazil. *Veterinary Microbiology*, v. 139, n. 1-2, p. 67-73, 2009.

CAMPOS, F.S.; DEZEN, D.; ANTUNES, D.A.; SANTOS, H.F.; ARANTES, T.S.; CENCI, A.; GOMES, F.; LIMA, F.E.; BRITO, W.M.; FILHO, H.C.; BATISTA, H.B.; SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; RIJSEWIJK, F.A.; ROEHE, P.M. Efficacy of an inactivated recombinant bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) vaccine. *Veterinary Microbiology*, v. 148, n. 1, p. 18-26, 2011.

CARDOSO, T.C.; FERRARI, H.F.; LUVIZOTTO, M.C.R.; ARNS, C.W. Bio-safety technology in production of Bovine Herpesvirus type 5 (BoHV-5) using an alternative serum-free medium. *American Journal Biochemistry Biotechnology*, v. 3, p. 125-130, 2007.

CARDOSO, T.C.; GOMES, D.E.; FERRARI, H.F.; SILVA-FRADE, C.; ROSA, A.C.G.; ANDRADE, A.L.; LUVIZOTTO, M.C.R. A novel *in situ* polymerase chain reaction hybridisation assay for the direct detection of bovine herpesvirus type 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Journal Virology Methods*, v. 163, n. 3, p. 509-12, 2010a.

CARDOSO, T.C; FERRARI, H.F.; GARCIA, A.F.; BREGANO, L.C.; ANDRADE, A.L.; NOGUEIRA, A.H. Immunohistochemical approach to the pathogenesis of clinical cases of bovine Herpesvirus type 5 infections. *Diagnostic Pathology*, v. 5, p. 57, 2010b.

CARDOSO, T.C, ANTELLO, T.F.; VIEIRA, F.V.; MACHADO, S.T.; NOGUEIRA, A.H. Estimation of the diagnostic accuracy of the glyco-C and US9 gene-based polymerase chain reaction technique for the detection of bovine Herpesvirus type 5 DNA in decomposed brain suspension from a slaughter house using Bayesian analysis, Brazil. *Tropical Animal Health Production*, v. 44, n.3, p. 379-382, 2012. doi:10.1007/s11250-011-9929-7, 2011.

CARDOSO TC, FERRARI HF, GARCIA AF, NOVAIS JB, SILVA-FRADE C, FERRAREZI MC, ANDRADE AL, GAMEIRO R. Isolation and characterization of Wharton's jelly derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three-dimensional system. *BMC Biotechnology*, v.12, p. 18, 2012a.

CARDOSO, T.C.; NOVAIS, J.B.; ANTELLO, T. F.; SILVA-FRADE, C.; FERRAREZI, M. C.; FERRARI, H.F.; GAMEIRO, R.; FLORES, E.F. Susceptibility of neuron-like cells derived from bovine Wharton's jelly to bovine Herpesvirus type 5 infection. *BMC Veterinary Journal*, v. 8, p. 242, 2012b. doi: 10.1186/1746-6148-8-242.

CARON, L.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; SCHERER, C.F.; IRIGOYEN, L.F.; ROEHE, P.M.; ODEON, A.; SUR, J.H. Latent infection by bovine herpesvirus type-5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. *Veterinary Microbiology*, v. 84, p. 285-295, 2002.

CZUPRYNSKI, C. J. Host response to bovine respiratory pathogens. *Animal Health Research Reviews*, v. 10, p. 141-143, 2009

D`ARCE, R.C.; ALMEIDA, R.S.; SILVA, T.C.; FRANCO, A.C.; SPILKI, F.; ROEHE, P.M.; ARNS, C.W. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesvirus types 1 and 5. *Veterinary Microbiology*, v. 88, p. 315-324, 2002.

DAVISON, A.J. herpesvirus systematics. *Veterinary Microbiology*, v143 p 52-69, 2010.

DEL MÉDICO-ZAJAC, M.P., LADELFA, M.F., KOTSIAS, F., MUYLKENS, B., THIRY, J., THIRY, E., ROMERA, S.A. Biology of bovine herpesvirus 5. *The Veterinary Journal*, v. 184, p. 138-145, 2009.

DEL MÉDICO-ZAJAC, M.P.; ODEÓN, A.; BLANCO-VIEIRA, J.; COMBESSIES, G.; FONDEVILA, N.; PALACIOS, M.; THIRY, J.; MUYLKENS, B.; THIRY, E.; ROMERA, A.S. Characterization of BoHV-5 field strains circulation and report of transient specific subtype of bovine herpesvirus 5 in Argentina. *BMC Veterinary Research*, v. 7, p. 8, 2011a.

DEL MÉDICO-ZAJAC, M.P.; ROMERA, A.S.; LADELFA, M.F.; KOTSIAS, F.; DELGADO, F.; THIRY, J.; MEURENS, F.; KEIL, G.; THIRY, E.; MUYLKENS, B. In vitro-generated interspecific recombinants between bovine herpesviruses 1 and 5 show

attenuated replication characteristics and establish latency in the natural host. *BMC Veterinary Research*, v. 7, p. 19, 2011b.

DEVIREDDY, L.R.; JONES, C.J. Activation of caspases and p53 by bovine herpesvirus 1 infection results in programmed cell death and efficient virus release. *Journal of Virology*, v. 73, n. 5, p. 3778-3788, 1999.

DIALLO, I.S.S.; HEWITSON, G.R.; HOAD, J.; TURNER, S.; CORNEY, B.G.; RODWELL, B.J. Isolation of bovine herpesvirus type 5 from the semen of a healthy bull in Australia. *Australian Veterinary Journal*, v. 88, p. 93-5, 2010.

ESAKI, S.; GOSHIMA, F.; KATSUMI, S.; WATANABE, D et al. Apoptosis induction after Herpes simplex virus infection differs according to cell type in vivo. *Archives Virology*, v. 155, p. 1235-1245, 2010.

ESTEVEZ, P.A.; SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; SILVA, T.C.; OLIVEIRA, E.A.S.; MOOJEN, V.; ESMERALDINO, A.M.; ROEHE, P.M. Bovine herpesvirus type 5 in the semen of a bull not exhibiting clinical signs. *Veterinary Record*, v. 24, p. 658-659, 2003.

FERRARI, H.F. Detecção Herpesvírus bovino tipo 5 em cortes histológicos e fragmentos de encéfalo congelado pela técnica da PCR. 2007. 91f. Mestrado em Ciência Animal. Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP. 2007a.

FERRARI, H.F.; LUVIZOTTO, M.C.R.; RAHAL, P.; CARDOSO, T.C. Detection of bovine *Hesperivirus type 5* in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine brain by PCR: a useful adjunct to conventional tissue based diagnostic test of bovine encephalitis. *Journal Virological Methods*, v. 143, p. 335-40, 2007b.

GEISER, V., ROSE, S., JONES, C. Bovine herpesvirus type 1 induces cell death by cell-type-dependent fashion. *Microbial Pathogens*, v. 44, p. 459-466, 2008.

GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; SOUZA, J.G.; COSTA, E.A.; BARBOSA-STANCIOLO, E.F. Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semen: amplification and sequence analysis of the US4 gene. *Veterinary Research Communications*, v. 27, p. 495-504, 2003.

GREENEN, K.; FAVOREEL, H.W.; NAUWYNCK, H.J. Cell type-specific resistance of trigeminal ganglion neurons towards apoptotic stimuli. *Veterinary Microbiology*, v. 113, p. 223-229, 2006.

GRIFFIN, B.D.; VERWEIJ, M.C.; WIERTZ, E.J. Herpesvirus and immunity: art of invasion. *Veterinary Microbiology*, v. 143, p. 89-100, 2010.

GUOYING, Z.T.D.; ROIZMAN, B. Induction of apoptosis accelerates reactivation of latent HSV-1 in ganglionic organ cultures and replication in cell cultures. *PNAS*, v. 4, n. 36, p. 14616-14621, 2012.

HANON, E., LAMBOT, M., HOORNAERT, S., et al. Bovine herpesvirus 1-induced apoptosis: phenotypic characterization of susceptible peripheral blood mononuclear cells. *Archives Virology*, v. 143, p. 441-452, 1998a.

HANON, E., MEYER, G., VANDERPLASSCHEN, A et al. Attachment but not penetration of bovine herpesvirus 1 is necessary to induce apoptosis in target cells. *Journal Virology*, v. 72, n. 9, p. 7638-7631, 1998b.

HAY, S.; KANNOURAKIS, G. A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *Journal General Virology*, v. 83, p. 1547-64, 2002.

ISERNHAGEN, A.J.; COSENZA, M., DA COSTA, M.C., et al. Asymptomatic encephalitis in calves experimentally infected with bovine herpesvirus-5. *Canadian Veterinary Journal*, v. 52, n. 12, p. 1312-1318, 2011.

KARASNEH, G.; SHUKLA, D. Herpes simplex virus infects most cell types in vitro: clues to its success. *Virology Journal*, v. 8, p. 481, 2011.

KIM, O.; YI, S.J. The replication of canine herpesvirus (CHV) induces apoptosis in canine kidney cell line. *Acta veterinary Hungarica*, v. 53, n. 1, p. 147-151, 2005.

KIRKLAND, P.D.; POYNTING, A.J.; GU, X.; DAVIS, R.J. Infertility and venereal disease in cattle inseminated with semen containing bovine Herpesvirus type 5. *Veterinary Record*, v. 165, p. 111-3, 2009.

KOSHIBA, T. Mitochondrial-mediated antiviral immunity. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1833 , n. 1, p. 225-232, 2012.

KRZYZOWSKA, M.; SHESTAKOV, A.; ERIKSSON, K et al. Role of Fas/FasLin regulation of inflammation in vaginal tissue during HSV-2 infection. *Cell death and Disease*, v. 2, e132, 2011.

KRZYZOWSKA, M., CYMERS, J., WINNICKA, A et al. Involvement of Fas and FasL in Ectromelia virus-induced apoptosis in mouse brain. *Virus Research*, v. 115, p. 141-149, 2006.

LADELFA, M.F.; DEL MÉDICO-ZAJAC, M.P.; KOTSIAS, F et al. Comparative study on the in vitro and in vivo properties of two bovine herpesvirus reference strains. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 53, p. 37, 2011a.

LADELFA, M.F.; KOTSIAS, F.; DEL MÉDICO-ZAJAC, M.P., et al. Effect of the US3 protein of bovine herpesvirus 5 on the actin cytoskeleton and apoptosis. *Veterinary Microbiology*, v. 153, n. 3-4, p. 361-366, 2011b.

LAMKANFI, M., DIXIT, V.M. Manipulation of host-cell death pathways during microbial infections. *Cell Host and Microbes*, v.8, p. 22, 2010.

LIAO, H., XU, J., HUANG, J. FasL/Fas pathway is involved in Dengue virus induced apoptosis of the vascular endothelial cells. *Journal of Medical Virology*, v. 82, p. 1392-1399, 2010.

MACHADO, G.F.; BERNARDI, F., HOSOMI, F.Y., et al. Bovine herpesvirus-5 infection in a rabbit experimental model: immunohistochemical study of the cellular response in the CNS. *Microbial Pathogens*, v. 57, p. 10-16, 2013.

MAHONY, T. Bovine herpesvirus: What is missing from our understanding of the relationship between BoHV-1 and BoHV-5 ? *The Veterinary Journal*, v. 184, n. 2, p. 124-125, 2009.

MARIN MS, PÉREZ SE, VERNA AE, et al. Descripción clínico-patológica de la infección natural y experimental por Herpesvirus bovino tipo 1. *Rev. Med. Vet.*, v.91, n.5-6, p. 95, 2010.

MARIN, M.S., LEUNDA, M.R., VERNA, A.E.; et al. In vitro replication of bovine herpesvirus types 1 and 5. *Journal Virological Methods*, v. 181, p. 80-85, 2012.

OHATA, A., NISHIYAMA, Y. Mitochondria and viruses. *Mitochondrion*, v. 11, p. 1-12, 2011.

OLIVEIRA, Martha Trindade Detecção de herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e tipo 5 (BoHV-5) em amostras de sêmen e construção de um BoHV-5 com uma deleção do gene UL49. 2011. 135f. DISSERTAÇÃO (Mestrado em Microbiologia do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Porto Alegre, 2011.

PEREZ, S.E., BRETSCHEIDER, G., LEUNDA, M.R., et al. Primary infection, latency and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. *Veterinary Pathology*, v. 39, p. 437-444, 2002.

POONIA, B., PAUZA, C.D., SALVATO, M. Role of the Fas/FasL pathway in HIV or SIV disease. *Retrovirology*, v. 6, p. 91, 2009.

RISSI, D.R.; RECH, R.R.; FLORES, E.F.; KOMMERS, G.D.; BARROS, C.S.L. Meningoencefalite por herpesvirus bovino-5. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 27, n. 7, p. 251-260, 2007.

RISSI, R.D., PIEREZAN, F., SILVA, M.S., FLORES, E.F., BARROS, C.S.L. Neurological disease in cattle in southern Brazil associated with *Bovine herpesvirus* infection. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 20, p. 346-349, 2008.

RODRÍGUEZ, M., BARRERA, M., SÁNCHEZ, O., RODRÍGUEZ, E.C., MARTÍNEZ, N., PARRA, N.C., TOLEDO, J.R. First report of bovine herpesvirus 5 in bull semen. *Archives Virology*, v. 157, p. 1775-1778, 2012.

ROIZMAN, B.; PELLET, P.E. The family Herpesviridae: a brief introduction. In: Fields, B.S., Knipe, D.M., Howley, P.M., Chanock, R.M., Monath, T.P., Meinick, J.L., Roizman, B., Straus, S.E. (Eds). *Fields Virology*, 4th edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 2480-2499, 2007.

SCHUDEL, A.A.; CARRILO, B.J.; WYLER, R.; METZLER, A.E. Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease. *Journal of Veterinary Medicine*, v. 33, p. 303-310, 1986.

SCHWARTZMAN, R.A.; CIDLOWSKI, J.A. Apoptosis: molecular biology of programmed cell death. *Endocrinology Reviews*, v. 14, p. 133-151, 1993.

SCOTT, I. The role of mitochondria in the mammalian antiviral defense system. *Mitochondrion*, v. 10, p. 316-320, 2010.

SILVA, A. M.; WEIBLEN, R.; IRIGOYEN, L. F.; ROEHE, P. M.; SUR, H. J.; OSORIO, F. A.; FLORES, E.F. Experimental infection of sheep with bovine herpesvírus type-5 (BHV-5): acute and latent infection. *Veterinary Microbiology*, v. 66, p.89-99, 1999.

SILVA, A.M.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; BOTTON, S.A.; IRIGOYEN, L.F.; ROEHE, P.M.; BRUM, M.C.S.; CANTO, M.C. Infecção aguda e latente em ovinos inoculados com herpesvírus bovino 5 (BHV-5). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 18, p. 99-106, 1998.

SILVA-FRADE, C; GAMEIRO, R.; MARTINS JÚNIOR, A.; CARDOSO, T.C. Apoptotic and developmental effects of bovine Herpesvirus type-5 infection on in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*, v. 74, p. 1296-303, 2010a.

SILVA-FRADE, C.; MARTINS JÚNIOR, A.; BORSANELLI, A.C.; CARDOSO, T.C. Effects of bovine Herpesvirus type 5 on development of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*, v. 73, p. 324-31, 2010b.

SITE:Página de imagens do Google: <<http://www.http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/A/Apoptosis.html#Bcl-2>> Acesso em: 30 de junho. 2013.

Página do site International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?msl_id=27> Acesso em: 05 de abril. 2011.

SOUZA, D.G.; SILVA-FRADE, C.; MARTINS JÚNIOR, A.; CARDOSO, T.C. Bull semen variables after experimental exposure with Bovine Herpesvirus type 5. *Animal Reproduction Science*, v. 124, p. 55-60, 2011.

STEUKERS, L., VANDEKERCKHOVE, A.P., BROECK, W.V., GLORIEUX, S., NAUWYNCK, H. Comparative analysis of replication characteristics of BoHV-1 subtypes in bovine respiratory and genital mucosa explants: a phylogenetic enlightenment. *Veterinary Research*, v. 42, p. 33, 2011.

VOGEL, F.S.F.; CARON, L.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E.R.; MAYER, S.V.; BASTOS, R.G. Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous system of latently, experimentally infected calves. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, p. 4512-4520, 2003.

XU, X., ZHANG, Y.H., CHEN, G., ZHANG, H., TONG, D. Bovine herpes virus type 1 induces apoptosis through Fas-dependent and mitochondria-controlled manner in Madin-Darby bovine kidney cells. *Virology Journal*, v.9, p. 202, 2012.

CAPÍTULO II

1 ARTIGO CIENTÍFICO

GMR Genetics and Molecular Research

Bovine Herpesvirus type 5 infection regulates Bax/Bcl-2 ratios in vitro

A. F. Garcia¹, J. B. Novais¹, T.F. Antello¹, C. Silva-Frade¹, M.C. Ferrarezi¹, E. F. Flores², T.C. Cardoso^{1*}

¹ Universidade Estadual Paulista (UNESP), Laboratório de Virologia Animal e Cultivo Celular, Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, São Paulo, 16050-680, Brasil,

² Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Laboratório Virologia, Santa Maria, RS, Brasil, 97115-900.

*Corresponding author: Tereza C Cardoso

E-mail address: tcardoso@fmva.unesp.br

Tel: +55 18 36361379

ABSTRACT - Bovine *herpesvirus* 5 (BoHV-5) is α -*herpesvirus* responsible for neurological disease in young cattle and also occasionally incriminated in reproductive disorders. In spite of many studies describing the apoptotic pathways induced by viruses belonging to the family *Herpesviridae*, scarce information about intrinsic programmed cell death pathway in host-BoHV-5 interactions is currently available. BoHV-5 was able to replicate and to produce cytopathology characterized by cellular swelling and cell fusion on both mesenchymal and epithelial cell lines. Viral antigens were detected in infected cells by immunofluorescence assay at 48 to 96 h post-infection (p.i.). According to sequential p.i observation, at 48 to 72 h p.i. higher fluorescent signals were visible for anti-apoptotic BCl-2 antigens in comparison to Bax, considered a pro-apoptotic protein. Infected cells revealed an increase of BCl-2 phenotype population from 48 to 96 h p.i. by flow cytometric analysis. At 48 to 96 h p.i. Bax mRNA was not expressed among of any infected cell monolayers. In contrast, BCl-2 mRNA was quantified $\text{Log}_{10} 1,6 \times 10^2$ cDNA copies at all p.i. for both cells. BoHV-5 replication seems to modulate BCl-2 expression and respective gene transcription in order to enhance production of progeny virus.

Key words: BoHV-5, *in vitro* propagation, mitochondrion, programmed cell death

Running Title: BoHV-5infection induces Bax/BCl-2 expression

INTRODUCTION

Bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) belongs to the family *Herpesviridae*, subfamily α -*herpesvirinae*, genus *Varicellovirus*, and is responsible for meningoencephalitis frequently observed in young cattle and, to a lesser extent, also incriminated in reproductive disorders In spite of displaying different tropism and

pathogenesis in vivo, in cell culture BoHV-1 and BoHV-5 share similar behavior and phenotype concerning host-cell range and cytopathic effects, mainly characterized by the production rounded, giant cells and multinucleated syncytial cells (Marin et al., 2012).

Apoptosis, a programmed suicide cell death, characterized by chromatin condensation, DNA fragmentation, membrane blebbing and cell shrinkage, can be induced through intrinsic and extrinsic pathways (Clarke & Tyler, 2009). In the mitochondria-mediated pathway, mitochondria release several apoptotic factors, including cytochrome c, Smac/Diablo, and apoptosis-inducing factor (AIF) into the cytosol (Ohta, 2011). In addition, mitochondrial apoptotic signaling and mitochondrial-outer-membrane permeabilization (MOMP) is controlled by the B-cell lymphoma 2 (BCL-2) family proteins (West et al., 2011). The anti-apoptotic BCL-2 family proteins, such as BCL-2, BCL-w, BCL-xl and myeloid cell leukemia 1 (MCL1) are generally aggregated into the outer mitochondrial membrane (West et al., 2011). Under death stimuli, Bax, another member of the BCL-2 family, display a pro-apoptotic effect (Ohta and Nishiyama, 2011). Mammalian DNA and RNA viruses are among the stimuli that have been associated with cell apoptosis (Griffin et al., 2010). Viruses possess various biochemical and genetic mechanisms to evade and/or induce apoptosis modulation through virus-encoded proteins. Apoptosis modulation seems to be a key step in *herpesviruses* pathogenesis (Griffin et al., 2010). In spite of many studies on subfamily *α -herpesvirus* regarding to anti-and-pro-apoptosis mechanisms, evidence of association of BoHV-5 with these events is completely unknown (Deruelle et al., 2010; Dufour et al., 2011; Esaki et al., 2010).

In the present study, we investigated the effect of BoHV-5 infection in BCL-2/Bax expression, and mitochondrial function in bovine Wharton's Jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells (bWJ-MSCs).

MATERIAL AND METHODS

Bovine Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal (bWJ-MSCs)

bWJ-MSCs were isolated and characterized as described previously, according to the Animal Care Committee at the University of São Paulo State, Brazil. The cell monolayers have been maintained at the laboratory of Animal Virology and cell culture since 2010 following standard procedures for seeding, frozen-thawing and propagation (Ferrari et al., 2007). The undifferentiated bWJ-MSCs at passage 30 were kept at $3,5 \times 10^5$ cells/ml in 25-cm² tissue culture flasks (Falcon™, BD) at 38.5 °C in 5% CO₂ in a humidified incubator seeded with Advanced-DMEM (Invitrogen®, Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA) with the addition of 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), 2mM glutamine and 10mM non-essential aminoacids (Sigma-Aldrich®) according to standard protocol (Cardoso et al., 2012; Cardoso et al., 2007; Marin et al., 2012).

Susceptibility of bWJ-MSCs cells to viral infection, viability assays and viral growth kinetics

The BoHV-5 strain used in the infection experiment was isolated from an outbreak of neurological disease and submitted to partial sequence of the US9 gene for

characterization (Ferrari et al., 2007). For infection, bWJ-MSCs were grown to 70% confluence in Lab-Tek[®] chambers slides (Falcon, BD) and infected with 100 µl of a BoHV-5 suspension ($10^{3.2}$ TCID₅₀/ml), corresponding to a multiplicity of infection (m.o.i.) of 0.1. The viral suspension was allowed to adsorb for 1 h at 38.5°C. After incubation, viral suspension was removed and the monolayers were supplemented with the same medium. Inoculated cells were monitored thereafter for cytopathic effect (cpe). Viral antigens were detected by immunofluorescence assay by reacting monoclonal anti-*glyco-C* viral epitopes with fixed infected and uninfected bWJ-MSCs at p.i. after infection. Cell proliferation analysis was performed using an In Vitro Toxicology Assay[®] Kit, an MTT-based assay in both infected and non-infected bWJ-MSCs cells at 0, 24, 48, 72 and 96 h post-infection (p.i.) (TOXI-1 Kit; Sigma-Aldrich[®]). For each p.i., the culture supernatant was removed and 2 ml MTT (tetrazolium salts) added following the manufacturer's recommendations (Sigma-Aldrich[®]). Absorbance was measured at 600 nm with a Biophotometer (Eppendorf[®], Hamburg, Germany). All reported values are means of triplicated samples.

One-step growth curve of the BoHV-5 in bWJ-MSCs cells was assayed in a multiplication kinetics experiment, following by infection at 80% of monolayer confluence at m.o.i of 1 cultured on 6-well culture plates (Falcon[™], BD). Adsorption was allowed for 90 min at 38.5 °C, the inoculum was removed and 2 ml of 2 x fresh medium plus 1% of agarose were added in order to verify the plaque formation. The bWJ-MSCs cells were incubated at different time intervals (24, 48, 72 and 96 h p.i) with 1 ml of viral suspension. At each time p.i., the cells were fixed with 4% of paraformaldehyde during 30 min and the agarose removed. In order to facilitate the plaque morphology analysis and calculate the viral titres as PFU (plaque forming units)/ml, all plates were staining with 1 ml of 2% violet crystal overnight at room

temperature. All experiments were performed in triplicates. Infectious virus titres were calculated according to the Spearman-Kärber method and expressed as PFU/ml.

Immunostaining for BCL-2 and Bax cell markers

Infected and uninfected bWJ-MSCs were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min in Lab-Tek[®] chamber slides (Falcon[™], BD). The cells were permeabilized for 10 min at room temperature in 0.4% Triton X-100 diluted in phosphate buffered solution (PBS). The fixed cells were incubated overnight at 4 °C with each of the primary antibodies anti-Bax (cat # N5413, diluted at 1:100) and anti-BCL-2 (cat # SAB3300030, 1:50) all purchased from Sigma-Aldrich[®]. On the next day, after three washes, cells were incubated with the respective goat secondary antibody (1:100) anti-mouse FITC (Sigma-Aldrich[®]). For nuclear staining, DAPI (1 mg/ml) was diluted in Fluormount[™] aqueous medium and loaded onto samples for 15 min. The images were collected under an AxioImager[®] A.1 light and an ultraviolet (UV) microscope connected to an AxioCam[®] MRc (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). The images were processed using AxioVision[®] 4.8 software (Carl Zeiss) for each antigen, whereas values were determined by visually counting positive cells. The undifferentiated cells were submitted to the same staining procedure to assess for cross reaction among antibodies. The negative controls consisted of incubation of slides with bovine IgG and IgM isotypes as the primary antibodies.

Total RNA isolation and quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR)

Upon harvest at 24, 48, 72 and 96 h p.i. cells monolayers and respective supernatants, total RNA was extracted using Trizol LS[™] protocol according to manufacturer's instructions (Invitrogen[®]). One average, 150 ng total RNA was used for

first-strand cDNA synthesis with Enhanced Avian RT First stand synthesis (Sigma-Aldrich®). The qPCR was carried out and analyzed by the software on a StepOnePlus® real time instrument (Applied Biosystems). The real time PCR mixtures (50 µl) contained 1.2 µg of cDNA, 400 nM primers and 200 nM probes FAM-labeled customized for Bax and BCL-2 bovine sequences (Applied Biosystems™) were used. The PCR was initiated by sequential amplification of 40 cycles at 95°C (15s) and 60°C (60s). The results were obtained from three replicates of each sample to ensure representative and accuracy pipetting. The expression of bovine GADH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) gene was also quantified in a similar way for normalization. The comparative delta-delta C_t method was used to analyze the results with the expression level of the respective Bax and BCL-2 gene at the corresponding time point in infected and uninfected bWJ-MSCs in comparison to GADH C_t values.

Statistical analysis

All of the experiments were performed at least in triplicate. Results of representative experiments are presented. Descriptive statistics include the mean \pm standard deviation (s.d). A p -values < 0.001 was considered significantly significant.

RESULTS

BoHV-5 productively replicates in bWJ-MSCs

BoHV-5 was able to replicate and produce cytopathic effects at 48h p.i. with viral antigens detected by immunofluorescence assay (IFA) (Figure 1). The cytopathic effect was characterized as cellular swelling and cell fusion, followed by rounded plates

dispersed into cell monolayers (Figure 1). The intensity of viral antigens detected by IFA applying monoclonal antibody against *glyco-C* viral protein was also increasing according to the post-infection intervals. These results demonstrate that bWJ-MCS are susceptible to productive BoHV-5 infection.

BoHV-5 infection up regulates BCL-2/Bax ratios

The immunostaining demonstrated Bax/BCL-2 expression at different intervals post-infection (p.i.). As shown in Figure 2 at 24 h p.i., infected cells did not express Bax/BCL-2 antigens in their surface, the same observed in uninfected cells (Figure insets). According to progressive post-infection observations, at 48 to 72 h p.i. higher fluorescent signals were visible for BCL-2 antigens in comparison to Bax (Figure 2). The transcription of Bax/BCL-2 genes, as ascertained by mRNA measurements, revealed that at 24 h p.i. Bax and BCL-2 genes were equally expressed among infected and uninfected cells, whereas viral titres were detected as to 3×10^3 PFU/ml (Figure 3). Following an increase in virus titres (Figure 3), at 48-96 h p.i., Bax mRNA was not detected in infected cell monolayers (Figure 3). In contrast, BCL-2 mRNA was detected at p.i. times. The plaque formation revealed that BoHV-5 infection underwent a productive infection (Figure 3) when compared to uninfected bWJ-MSCs. In spite of many studies demonstrating the ability of other α -herpesvirus to induce or suppress some pro-and-anti-apoptotic factors, this is the first description of non-epithelial cells expressing higher BCL-2 amounts during infection, accompanied by Bax suppression during a productive phase of viral replication.

DISCUSSION

This study was initiated to evaluate the impact of BoHV-5 infection and to explore the expression of BCL-2/Bax apoptotic mediators in this context. As primary cell cultures are relatively difficult to obtain and maintain over several passages, Madin-Darby bovine kidney cells (MDBK) are commonly used for BoHV-5 isolation and multiplication (Cardoso et al., 2007; Marin et al., 2010). Some α -herpesviruses, such as pseudorabies virus (PrV) and herpes simplex virus (HSV) are able to grow in a wide range of cell types. The host range of BoHV-5 has not been investigated extensively (Deruelle et al., 2010; Dufour et al., 2011; Esaki et al., 2010). This study brings new information regarding to BoHV-5 replication on non-epithelial bovine derived cell type. During virus replication, bWJ-MSCs cultures developed cytopathology similar to those reported for MDBK cells (Marin et al., 2010). Moreover, parameters related to the *in vitro* replication of several BoHV-5 isolates, the plaque size after infection of MDBK monolayers have been reported (Marin et al., 2010). In comparison to this study, plaque morphology and viral titres described after BoHV-5 infection of bWJ-MSCs reached similar titers.

Induction and suppression of apoptosis by viral infection are common events in viral pathogenesis (Griffin et al., 2010). The BCL-2 has been localized to the nuclear membrane, endoplasmic reticulum and also to the outer mitochondrial membrane (Ohta and Nishiyama, 2011). In addition, Bax is an integral organelle membrane protein, in particular in mitochondria (Ohta and Nishiyama, 2011). These two proteins are closely related to the balance of apoptosis and anti-apoptosis phenomena related to virus infection. In this study, at early stages of BoHV-5 replication (24-48 h time post-infection), an increase in BCL-2 expression coincided with the increase in viral titres. This modulation has been also described for other members of *Herpesviridae* family

(Ohta and Nishiyama, 2011), however this is the first description related for BoHV-5. Based on the fact that over 130 distinct *Herpesvirus* species have been identified to date as a group, boast an impressively broad spectrum of host, the activation of some anti-apoptotic mediators in order to promote cell survival seems to be crucial for viral replication (Griffin et al., 2010). Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent progenitor cells and they can be cultured from adult and fetal tissues (Cremonesi et al., 2011). Recently, a bovine mesenchymal cell line has been described, being isolated from Wharton's jelly layer (Cardoso et al., 2012). This biological characteristic of immune regulation has been demonstrated by others (Cremonesi et al., 2011). In conclusion, the use of MSCs on Virological studies open new perspectives for future studies related to virus-cell interactions.

To our knowledge this is the first study of the role of mitochondria during BoHV-5 infection. The interaction between BCL-2 releases during *in vitro* BoHV-5 replication brings new information in host-virus interaction.

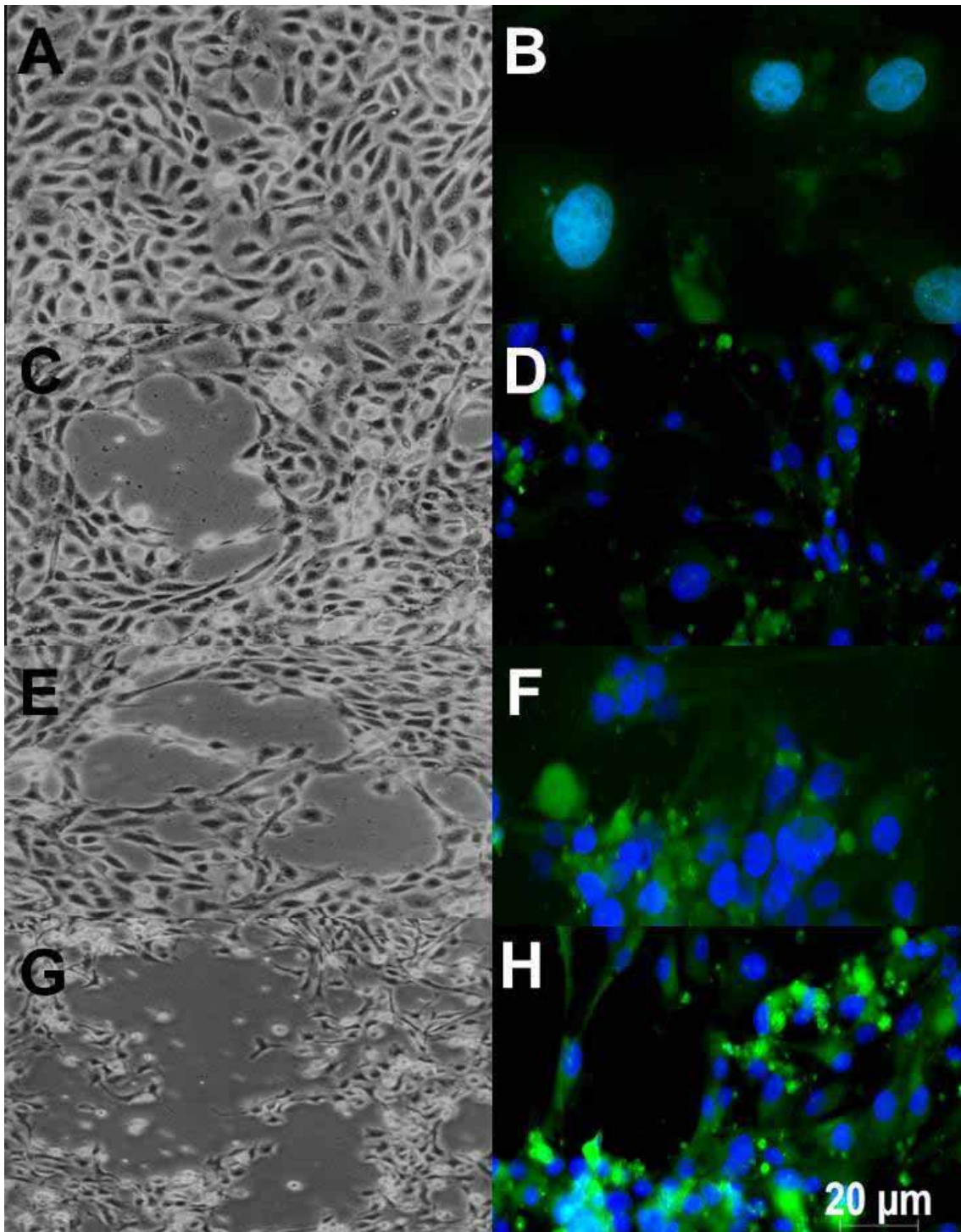


Figure 1 Photomicrographs representative of infected cells observed under phase contrast microscopy (x 40 magnification) and immunofluorescence for viral antigens (x 100 magnification). The cytopathic effect during 24 (A), 48 (C), 72 (E) and 96 (G) h post-infection (p.i.) showing syncytial cells from 48 h p.i. The viral antigens detected by immunofluorescence assay revealed an increase of label after 48 h p.i. (B).

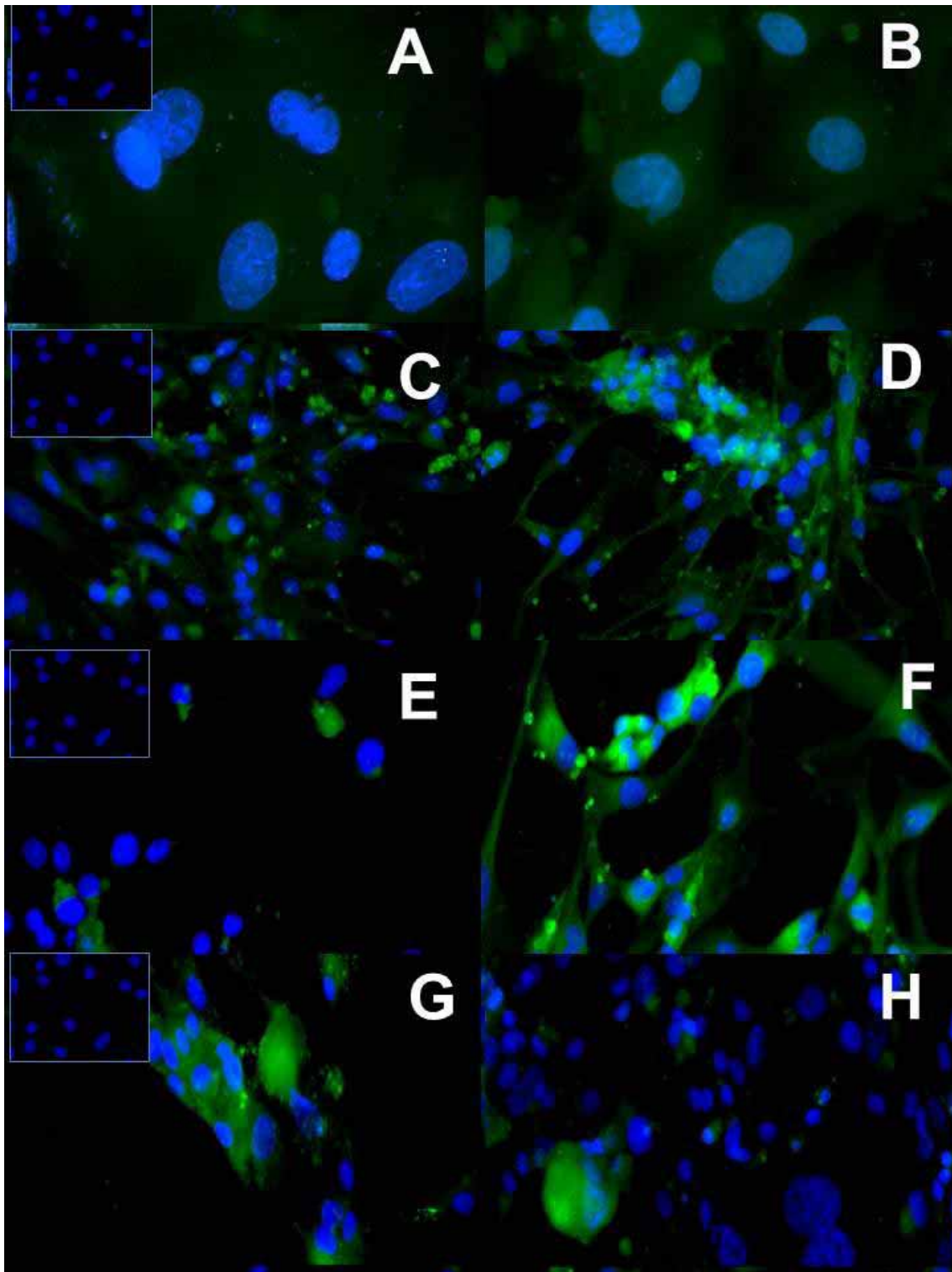


Figure 2 Immunofluorescence images showing the Bax and BCL-2 antigens observed under fluorescence microscopy (x 100 magnification). The intensity of Bax antigens detection was observed at higher grade at 48 and 96 h p.i (C-G). BCL-2 antigens were detected mostly at 48 and 72 h p.i. (D-F). The inset images show the uninfected bWJ-MSCs.

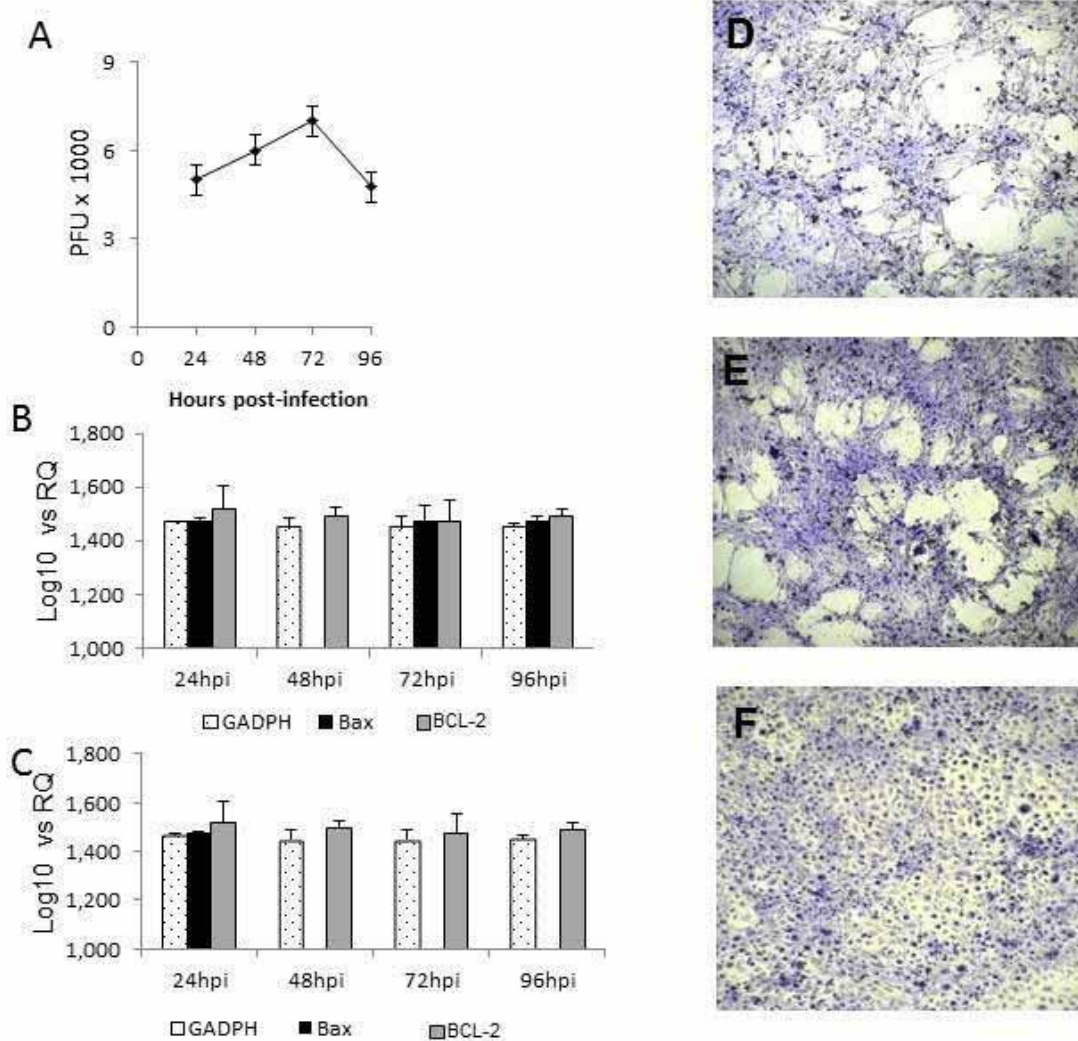


Figure 3 Kinetics of BoHV-5 replication and Bax/BCL-2 mRNA levels at different time points post-infection. The bWJ-MSCs infection revealed a productive infection (A) with plaque formation among infected monolayers (D,E) in comparison to uninfected ones (F). Real-time PCR was used to quantify the mRNA levels and fold-changes were calculated by $\Delta\Delta^{ct}$ method as compared with non-infection cell control (B) and using endogenous bovine GADH mRNA level to normalization. The infected cells completely suppress the Bax mRNA expression after 48 h of infection ($p < 0.001$).

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP (Grants 2009/17635-3 and 2010/50782-7). The authors are grateful for the donation of the bovine umbilical cords. TC Cardoso and EF Flores are recipients of funding from the CNPq (Brazilian Council for Research).

REFERENCES

- Cardoso TC, Ferrari HF, Garcia AF, and Novais et al. (2012). Isolation and characterization of wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three-dimensional system. *BMC Biotechnol.* 12: 8
- Cardoso TC, Ferrari HF, Luvizotto MCR, Arns CW (2007). Bio-safety technology in production of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) using an alternative serum-free medium. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 3:125-130.
- Clarke P, Tyler KL (2009). Apoptosis in animal models of virus-induced disease. *Nat. Rev. Microbiol.* 7: 144-155.
- Cremonesi F, Corradetti B, Lange-Consiglio A (2011). Fetal adnexa derived stem cells from domestic animal: progress and perspectives. *Theriogenology*, 75:1400-1415.
- Deruelle MJ, De Corte N, Engleibienne J, and Nauwynch J, et al. (2010). Pseudorabies virus US3-mediated inhibition of apoptosis does not affect infectious virus production. *J. Gen. Virol.* 91: 1127-1132.
- Dufour F, Sasseville MS, Chabaud S, and Massie B, et al. (2011). The ribonucleotide reductase R1 subunits of herpes simplex virus types 1 and 2 protect cells against

TNF α -and FasL-induced apoptosis by interacting with caspase-8. *Apoptosis* 16: 256-271.

Esaki S, Goshima F, Katsumi S, and Watanabe D et al. (2010). Apoptosis induction after herpes simplex virus infection differs according to cell type in vivo. *Arch. Virol.* 155, 1235-1245.

Ferrari HF, Luvizotto MCR, Rahal P, Cardoso TC (2007). Detection of bovine Herpesvirus type 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine brain by PCR: a useful adjunct to conventional tissue-based diagnostic test of bovine encephalitis. *J. Virol. Meth.* 146: 335-340.

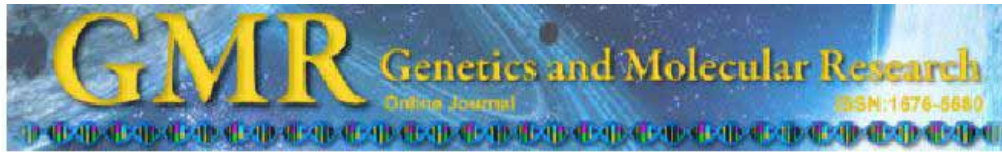
Griffin BD, Verweij MC, Wiertz EJHJ (2010). Herpesvirus and immunity: the art of evasion. *Vet. Microbiol.* 143:89-100.

Marin MS, Leunda MR, Verna AE, and Faverin C, et al. (2012). In vitro replication of bovine herpesvirus types 1 and 5. *J. Virol. Meth.* 181: 80-85.

Ohta A, Nishiyama Y (2011). Mitochondria and viruses. *Mitochondrion* 11: 1-12.

West AP, Shadel GS, Ghosh S (2011). Mitochondria in innate immune responses. *Nature Rev.* 11: 389-402.

ANEXO A



Bovine herpesvirus type 5 infection regulates Bax/Bcl-2 ratio

A.F. Garcia¹, J.B. Novais¹, T.F. Antello¹, C. Silva-Frade¹, M.C. Ferrarezi¹, E.F. Flores² and T.C. Cardoso¹

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Laboratório de Virologia Animal e Cultivo Celular,
Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, São Paulo, Brasil
²Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Laboratório Virologia,
Santa Maria, RS, Brasil

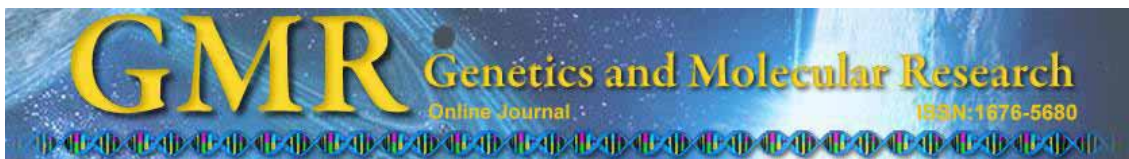
Corresponding author: T.C. Cardoso
E-mail: tcardoso@fmva.unesp.br

Genet. Mol. Res. 12, 2013 (in press)
Received October 16, 2012
Accepted January 11, 2013

ABSTRACT. Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) is an α -herpesvirus that causes neurological disease in young cattle and is also occasionally involved in reproductive disorders. Though there have been many studies of the apoptotic pathways induced by viruses belonging to the family Herpesviridae, there is little information about the intrinsic programmed cell death pathway in host-BoHV-5 interactions. We found that BoHV-5 is able to replicate in both mesenchymal and epithelial cell lines, provoking cytopathology that is characterized by cellular swelling and cell fusion. Viral antigens were detected in infected cells by immunofluorescence assay at 48 to 96 h post-infection (p.i.). At 48 to 72 h p.i., anti-apoptotic Bcl-2 antigens were found at higher levels than Bax antigens; the latter is considered a pro-apoptotic protein. Infected cells had increased Bcl-2 phenotype cells from 48 to 96 h p.i., based on flow cytometric analysis. At 48 to 96 h p.i., Bax mRNA was not expressed in any of the infected cell monolayers. In contrast, Bcl-2 mRNA was found at high levels at all p.i. in both types of cells. BoHV-5 replication apparently modulates Bcl-2 expression and gene transcription, enhancing production of virus progeny.

Key words: BoHV-5; *In vitro* propagation; Mitochondrion; Programmed cell death

ANEXO B




Ribeirão Preto, 11 de janeiro de 2013.

Prezados Autores,

Informamos que o artigo **“Bovine herpesvirus type 5 infection regulates Bax/BCl-2 ratio”** GMR 2568, de autoria **A. F. Garcia, J. B. Novais, T.F. Antello, C. Silva-Frade, M.C. Ferrarezi, E. F. Flores, T.C. Cardoso**, foi aceito para publicação na *Genetics and Molecular Research (GMR)*.

Aproveitamos a oportunidade para informar que a GMR está indexada em 74 bases de dados, entre elas: Index Medicus, PubMed, Medline e ISI. E tem fator de impacto 1,184, segundo JCR - junho 2012.

Atenciosamente,



Francine Muniz
Coordenadora editorial (Mtb 44.300)
Genetics and Molecular Research
www.funpecrp.com.br/gmr
Tel. (16) 3620-1251 - Fax. (16) 3621-1991