

APOPTOSE RELACIONADA À INFECÇÃO *IN VITRO*
POR HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 e 5

Juliana Bueno de Novais

Médica Veterinária

Araçatuba-SP

2014

APOPTOSE RELACIONADA À INFECÇÃO *IN VITRO*
POR HERPESVÍRUS BOVINOS TIPO 1 e 5

Juliana Bueno de Novais

Orientadora: Tereza Cristina Cardoso Silva

Dissertação de Mestrado apresentada junto ao curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Área de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre.

Araçatuba-SP

2014

Catálogo na Publicação(CIP)

Novais, Juliana Bueno de

N935a

Apoptose relacionada à infecção in vitro por herpesvírus bovino tipo 1 e 5 /
Juliana Bueno de Novais. -- Araçatuba: [s.n], 2014.
51 f. il.; + CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Medicina Veterinária, 2014.

Orientadora: Profa. Dra. Tereza Cristina Cardoso Silva

- Virologia-Medicina Veterinária. 2. BoHV-5. 3. MDBK.
4. Morte celular. I. T.

CDD 636.0896832019

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JULIANA BUENO DE NOVAIS - Nascida em 21 de agosto de 1988, na cidade de São Paulo – SP. Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Araçatuba – SP, em 2011. Possui duas iniciações científicas na Área de Microbiologia Animal, ambas com bolsa FAPESP. Ingressou no programa de Mestrado em Ciência Animal em Março de 2012. Em 2013 realizou estágio de pesquisa no exterior através de bolsa de estudo da modalidade BEPE (Bolsa de Estágio Pesquisa no Exterior) da FAPESP na “Université de Liège”, “Faculté de Médecine Vétérinaire”, na Bélgica, sob a supervisão do Prof. Etienne Thiry.

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.” Galileu Galilei.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo, pela minha vida, por me dar saúde, estrutura, por colocar pessoas amadas ao meu lado, por cuidar de mim todo o tempo e em cada detalhe.

Ao Bruno, meu noivo, companheiro, amor e melhor amigo, por toda a ajuda, apoio, força e compreensão. Por estar sempre ao meu lado. Eu não chegaria aqui sem você!

Aos meus pais Novais e Rosana, pelo amor imensurável, pelo apoio e por não medirem esforços para que meus sonhos se realizassem.

À minha avó Cida, pelas orações e incentivos; e ao meu irmão Rodrigo pelas conversas, apoio e carinho.

À todos os meus amigos e familiares que de forma direta ou indireta me deram suporte e torceram para o meu sucesso.

Aos amigos que fiz no laboratório de virologia animal da UNESP-Araçatuba, Ana Carolina Guedes Rosa, Talita Fontes Antello e Andrea Fontes Garcia, pela amizade, ajuda e apoio para que esse projeto se tornasse realidade.

Aos funcionários Gilmara Castilho, Cilene Vidovix e Alexandre José Teixeira, e ao Prof. Roberto Gameiro, pelo aprendizado, amizade e apoio.

À minha orientadora Prof^a. Adj^a Tereza Cristina Cardoso Silva, pela oportunidade, orientação e por acreditar no meu potencial.

À Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP – campus de Araçatuba.

Ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP – campus de Araçatuba.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro para a realização desse trabalho.

Ao professor Etienne Thiry, por prontamente me aceitar em seu laboratório e me orientar; e aos colegas que fiz durante minha estadia em Liège Axel Mauroy, William Zonta, Damien Thiry e Maria Ana de la Grandière; e especialmente a Ludovic Martinelle, por toda a ajuda e pela amizade que certamente levarei por toda a vida.

Ao meu cão Átila e meus gatos Haroldo e Nina, por cada demonstração de carinho, por me lembrarem diariamente porque escolhi ser veterinária, pelo amor puro e sincero.

TRABALHO REALIZADO NO LABORATÓRIO DE VIROLOGIA ANIMAL,
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA, CAMPUS DE ARAÇATUBA COM
O APOIO DA FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO
PAULO (PROCESSO 2011/ 13698-0).

APOPTOSE RELACIONADA À INFECÇÃO *IN VITRO* DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 e 5

RESUMO - O Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) e o herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1), membros da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*; podem replicar-se em diferentes tecidos como nervoso, glandular, linfóide e em órgãos parenquimatosos. São capazes de permanecer em estado de latência, alojando-se nos gânglios nervosos. No Brasil, casos clínicos de encefalites por BoHV-5 são a segunda maior causa de morte por encefalite com etiologia determinada, suplantada somente pela raiva, enquanto o BoHV-1 está presente de forma endêmica no rebanho nacional, sendo responsável por uma variedade de sinais clínicos como rinotraqueíte, abortamento, conjuntivite, vulvovaginite e balanopostite. É esperado que um agente viral, ao infectar uma célula, ative as vias do processo de morte celular programada, entretanto há relatos de que o gene relacionado à latência (RL) do Herpesvírus é capaz de inibir a apoptose celular, protegendo a célula infectada durante a latência, por meio de mecanismos ainda desconhecidos. Este estudo demonstra a capacidade do BoHV-5 e BoHV-1 de manipular o metabolismo mitocondrial da célula infectada, interferindo na via intrínseca de apoptose.

Palavras-chave: Herpesvírus bovino 1, Herpesvírus bovino 5, Morte celular.

APOPTOSIS RELATED TO THE EXPERIMENTAL INFECTION IN VITRO OF BOVINE HERPESVIRUS TYPE 1 AND 5

ABSTRACT - Bovine Herpesvirus type 5 (BoHV-5) and bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1), members of *Herpesviridae* family, *Alphaherpesvirinae* subfamily; may replicate in different tissues such as nervous, glandular, lymphoid and parenchymal organs and are able to remain in a latent state, lodged in nerve ganglia. In Brazil clinical cases of BoHV - 5 encephalitis are the second leading cause of death due to encephalitis with determined etiology, supplanted only by rabies, while the BoHV-1 is present in an endemic form in the national herd, being responsible for a variety of clinical signs as rhinotracheitis, abortion, conjunctivitis, vulvovaginitis and balanoposthitis. It is expected that a viral agent, to infect a cell, activate the pathways of programmed cell death process, however there are reports that the gene related to latency (RL) of Herpesvirus is able to inhibit cell apoptosis, protecting the infected cell during latency through unknown mechanisms. Therefore, this study demonstrated the capacity of BoHV-5 and BoHV-1 to manipulate mitochondrial metabolism of the infected cell, interfering with intrinsic pathway of apoptosis.

Keywords: bovine Herpesvirus 1, bovine Herpesvirus 5, cell death.

LISTA DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1 - Alterações morfológicas decorrentes do processo de apoptose, que envolve alteração de permeabilidade de membranas, condensação cromatínica, encolhimento celular, formação de corpos apoptóticos sem desintegração de organelas.....	4
Figura 2 - Mecanismos extrínsecos relacionados ao processo de infecção viral e sua relação com os processos de morte celular programada.....	5
Figura 3 - Morfologia de um vírion da família <i>Herpesviridae</i> . Modificado de Thiry et. al. 2007.....	9
Figura 4 - Organização genômica dos Alphaherpesvirus. Modificado de Thiry et. al. 2007.....	9
Figura 5 - Fotomicrografia em microscópio invertido com contraste de fase no aumento de 40x das monocamadas de células MDBK infectadas com o BoHV-5 nos diferentes tempos pós-infecção. A) 24 h; C) 48 h; E) 72 h e G) 96 h contraste fase. B) 24 h; D) 48 h; F) 72 h e H) 96 h monocamadas fixadas e contra-coradas com hematoxilina.....	23
Figura 6 - Determinação da viabilidade celular pelo método do MTT nos diferentes tempos pós-infecção revelando queda significativa ($p < 0,005$) somente entre os períodos 96h e 120h para o BoHV-5.....	24
Figura 7 - Fotomicrografia realizada em microscópio fluorescência, aumento de 40x, revelando: A) marcação positiva para Anexina V e PI no período 48 h p.i.com BoHV-5; B) marcação positiva para antígenos virais BoHV-5 no período 48 h p.i. contra-coradas com DAPI; C) marcação positiva para Anexina V e PI no período 48 h p.i.com BoHV-1; D) marcação positiva para antígenos virais BoHV-1 no período 48 h p.i.....	25
Figura 8 - Fotomicrografia realizada em microscópio fluorescência, aumento de 40x, revelando: A) marcação positiva para Apo-TRACE™ e PI no período 48 h p.i. por BoHV-5 ; B) marcação positiva para antígenos virais BoHV-5 no período 48 h p.i. contra-coradas com DAPI; C) marcação positiva para Apo-TRACE™ e PI no período 48 h p.i. por BoHV-1; D) marcação positiva para antígenos virais BoHV-1 no período 48 h p.i. contra-coradas com DAPI.....	26

Figura 9 - Reação de RT-PCR de RNAm de células MDBK experimentalmente infectadas com BoHV-5 e BoHV-1 em diferentes períodos pós infecção, em gel de agarose 1,5%. A) Marcação positiva dos genes de referência, histona e β -actina, em todos os períodos pós-infecção; B) Ausência de marcação para Bax e Bcl-2 nas células não infectadas (controle negativo) em todos os períodos C) Marcação positiva para Bax a 72 e 96h p.i. e negativa nos demais períodos pós-infecção por BoHV-5; D) Marcação negativa para BCL-2 em todos os períodos p.i por BoHV-5; E) Marcação positiva para Bax 48h p.i. e negativa nos demais períodos p.i por BoHV-1; F) Marcação positiva para Bcl-2 48h p.i. e negativa nos demais períodos p.i por BoHV-1..... 27

LISTA DE ABREVIATURAS

- > - Maior
- % - Por cento
- °C – Graus *Celsius*
- Apo-1 - Antígeno apoptose 1
- ATP – Adenosina trifosfato
- BoHV-1 – Herpesvírus bovino tipo 1
- BoHV-5 – Herpesvírus bovino tipo 5
- cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar
- CD3 – Cluster de diferenciação 3
- CO₂ – Dióxido de carbono
- DAPI – 4', 6 Diamino-2-fenilindole
- dATP – Deoxiadenosina trifosfato
- DMEM – Dulbecco's meio mínimo essencial
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- Fig. - Figura
- gB – Glicoprotéina B
- gC – Glicoproteína C
- gD – Glicoproteína D
- gE – Glicoproteína E
- gG – Glicoproteína G
- gH – Glicoproteína H
- gI – Glicoproteína I
- gK – Glicoproteína K
- gL – Glicoproteína L
- gM – Glicoproteína M
- GenBank – Banco de dados de sequência genética
- h - Horas
- HSV – Virus herpes simplex
- IBR – Rinotraqueíte infecciosa bovina
- IFN – Interferon

- IPV – Vulvovaginite infecciosa bovina
- IR – Repetição interna
- Kpb – Quilo pares de bases
- LR – Gene relacionado à latência
- MDBK – “Mardin Darby Bovine Kidney”
- MEM – Meio essencial mínimo
- mg/mL – Miligramas por mililitros
- min – Minutos
- mL – Mililitros
- mM – Milimols
- m.o.i – Multiplicidade de infecção
- MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazol brometo
- nm – Nanômetros
- pb – Pares de bases
- PBS – Solução de tampão fosfato
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- PI – Iodeto de propídeo
- p.i. – Pós-infecção
- PM – Peso molecular
- REA – Análise de restrição enzimática
- RNA – Ácido ribonucleico
- RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro
- s - Segundos
- SFB – Soro fetal bovino
- SNC – Sistema nervosa central
- TCID₅₀/mL – Dose mediana infectiva em cultura de tecidos por mililitros
- TNF – Fator de necrose tumoral
- TR – Repetição terminal
- UL – Única longa
- US – Única curta
- v/v – Volume por volume
- VZV – Vírus varicella zoster

- $\mu\text{g}/\text{mL}$ – Microgramas por mililitros
- μL – Microlitros

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. HIPÓTESE.....	6
3. OBJETIVO.....	6
3.1. Gerais.....	6
3.2. Específicos.....	6
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
4.1. Herpesvirus.....	7
4.1.1. Nomenclatura e classificação.....	7
4.1.2. Morfologia e organização genômica.....	8
4.1.3. Glicoproteínas virais.....	10
4.1.4. BoHV-1.....	10
4.1.5. BoHV-5.....	11
4.2. Apoptose.....	13
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
5.1. Vírus e cultivo celular.....	15
5.2. Infecção experimental.....	16
5.3. Teste MTT.....	16
5.4. Isolamento de RNA total e PCR.....	17
5.5. Teste transglutaminase.....	17
5.6. Coloração de células apoptóticas.....	18
5.7. Detecção da telomerase.....	19
5.8. Análise estatística.....	19
6. RESULTADOS.....	20
6.1. Cultivo celular e infecção experimental.....	20
6.2. Viabilidade celular, atividade da telomerase e transglutaminase...	20
6.3. Detecção da apoptose.....	21
6.4. Isolamento de RNA total e PCR.....	22
7. DISCUSSÃO.....	28
8. CONCLUSÕES.....	30
9. REFERÊNCIAS.....	31

1. INTRODUÇÃO

O Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e o Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) são membros da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* (PORTERFIELD, 1989) e apresentam como características gerais o diâmetro de aproximadamente 70 a 110 nm, genoma DNA linear de fita dupla com aproximadamente 137 kilobases constituído por uma região única longa (UL) e outra única curta (US); nucleocapsídeo icosaédrico com 162 capsômeros e envelope glicoprotéico (FENNER et al., 1993; WIRTH, 1993).

Os Herpesvírus são heterogêneos, não diferenciados morfológicamente pela microscopia eletrônica e podem replicar-se em diferentes tecidos como o nervoso, glandular, linfóide e em órgãos parenquimatosos (STRAUB, 1982), e são capazes de permanecer em estado de latência, alojando-se nos gânglios nervosos, podendo ser reativado em situações estressantes como parto, transporte, vacinações ou com a administração prolongada de corticóides (ACKERMANN et al., 1982).

O BoHV-1 está presente em forma enzoótica na maioria dos países onde a pecuária bovina é praticada (GIBBS e RWEYEMAMU, 1977), é o agente etiológico da Rinotraqueíte Infeciosa Bovina/Vulvovaginite Pustular Infeciosa (IBR/IPV) (ROIZMAN et al., 1995), sendo responsável por uma variedade de sinais clínicos como rinotraqueíte, abortamento, conjuntivite, vulvovaginite e balanopostite.

O BoHV-5 é associado à meningoencefalite de curso geralmente fatal, que acomete principalmente bovinos jovens (STUDDERT, 1989) e no Brasil casos clínicos de encefalites por BoHV-5 foram a segunda maior causa de

encefalites com etiologia determinada, suplantada somente pela raiva (SANCHES et al., 2000).

Os Herpesvírus bovinos tipo 1 e 5 são muito semelhantes entre si em aspectos estruturais, biológicos, antigênicos e moleculares (BRATANICH et al., 1991; FRENCH, 1962; METZLER et al., 1986; STUDDERT, 1989), tanto que previamente o BoHV-5 foi classificado como subtipo 1.3 do BoHV-1, sendo recentemente reclassificado com base em algumas características biológicas e moleculares que o distingue dos isolados respiratórios e genitais do BoHV-1 (ROIZMAN et al., 1992).

A principal diferença entre esses vírus parece estar relacionada à sua habilidade de invadir, replicar no sistema nervoso central (SNC) e causar enfermidade neurológica (BAGUST e CLARK, 1972; BELKNAP et al., 1994; STUDDERT, 1989). Amostras de alphaherpesvírus identificadas como BoHV-1 têm sido quase que exclusivamente isoladas de casos de doença respiratória ou genital, enquanto os herpesvírus isolados de casos de doença nervosa têm sido identificados como BoHV-5 (D'OFFAY et al., 1995; ROEHE et al., 1997; SALVADOR et al., 1998; STUDDERT, 1989), embora Campos et al. (2009) no estado do Rio Grande do Sul, notaram latência de ambos os vírus em 75,9% das amostras.

O diagnóstico laboratorial direto, por meio da detecção do agente etiológico, envolve o isolamento viral em cultivo celular e a microscopia eletrônica. O isolamento viral pode ser realizado em células MDBK ("Madin Darby Bovine Kidney"), cultivos primários de células de testículo de bezerro, de pulmão de feto bovino e de células turbinadas de bovino (BELKNAP et al.,

1994; RIET-CORRÊA et al., 1989; SALVADOR et al., 1998). Técnicas de biologia molecular, para a detecção do genoma viral, como a PCR e a hibridização, podem ser empregadas com sucesso, enquanto a sorologia tem valor limitado no diagnóstico indireto, uma vez que os métodos rotineiros disponíveis para a detecção de anticorpos não diferenciam animais infectados pelo BoHV-5 daqueles infectados pelo BoHV-1 (CLAUS et al., 2002).

A apoptose ocorre nas mais diversas situações, como por exemplo, na organogênese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos (GRIVICICH et al., 2007).

Apoptose denomina um tipo de morte celular no qual ocorre condensamento da cromatina seguido da formação de “blebs” (prolongamentos na membrana celular) e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem formando os corpos apoptóticos que são rapidamente fagocitados por macrófagos, resultando em nenhum fenômeno inflamatório (GHAVAMI et al., 2009), como ilustra a Figura 1.

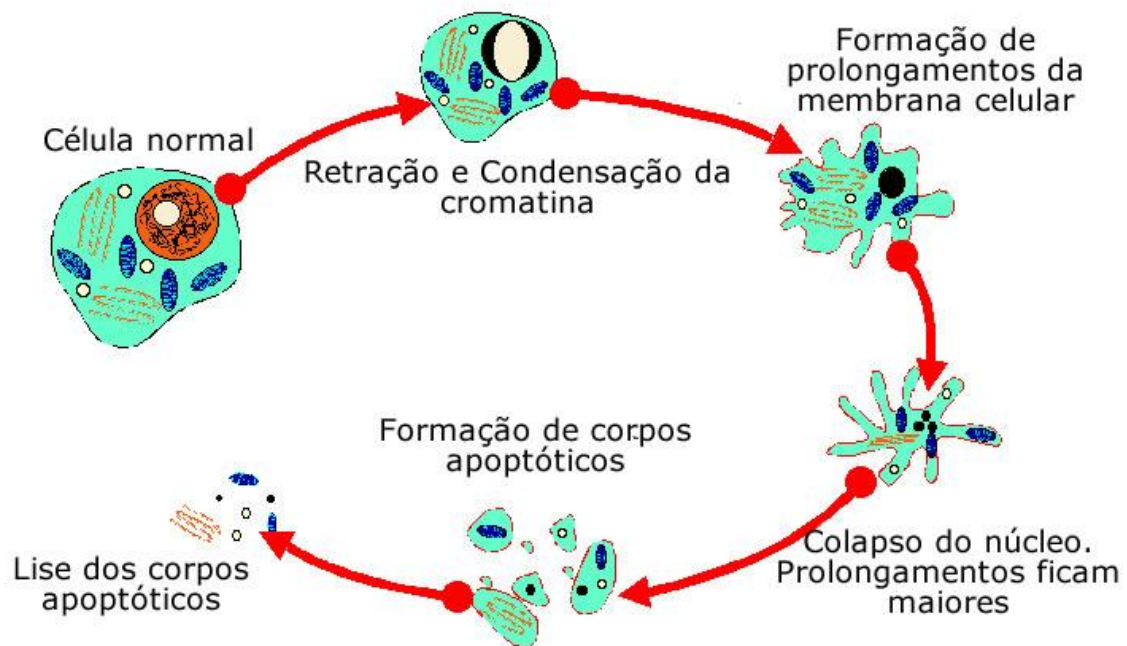


Figura 1 - Alterações morfológicas decorrentes do processo de apoptose, que envolve alteração de permeabilidade de membranas, condensação cromatínica, encolhimento celular, formação de corpos apoptóticos sem desintegração de organelas. Fonte: domínio público.

A apoptose é um programa de morte celular altamente regulado, de grande eficiência, e que requer a interação de inúmeros fatores; assim, as alterações morfológicas observadas são consequência de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados (GRIVICICH et al., 2007).

A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática), que é iniciada via receptores de morte tais como Fas, também chamado de Apo-1, e TNF (receptor fator de necrose tumoral), e requerem pró-caspase 8 ou 10 no complexo apoptossomo, ativando a caspase-3 que culmina na apoptose; ou pela via intrínseca (mitocondrial), que envolve a ativação de um membro pró-apoptótico da família Bcl-2 (Bax, Bid), que libera o citocromo c a partir da membrana mitocondrial interna. Este

se associa com Apaf-1, dATP e pró-caspase-9, caspases subsequentes são ativadas, culminando em apoptose (GHAVAMI et al., 2009), demonstrado na Figura 2.

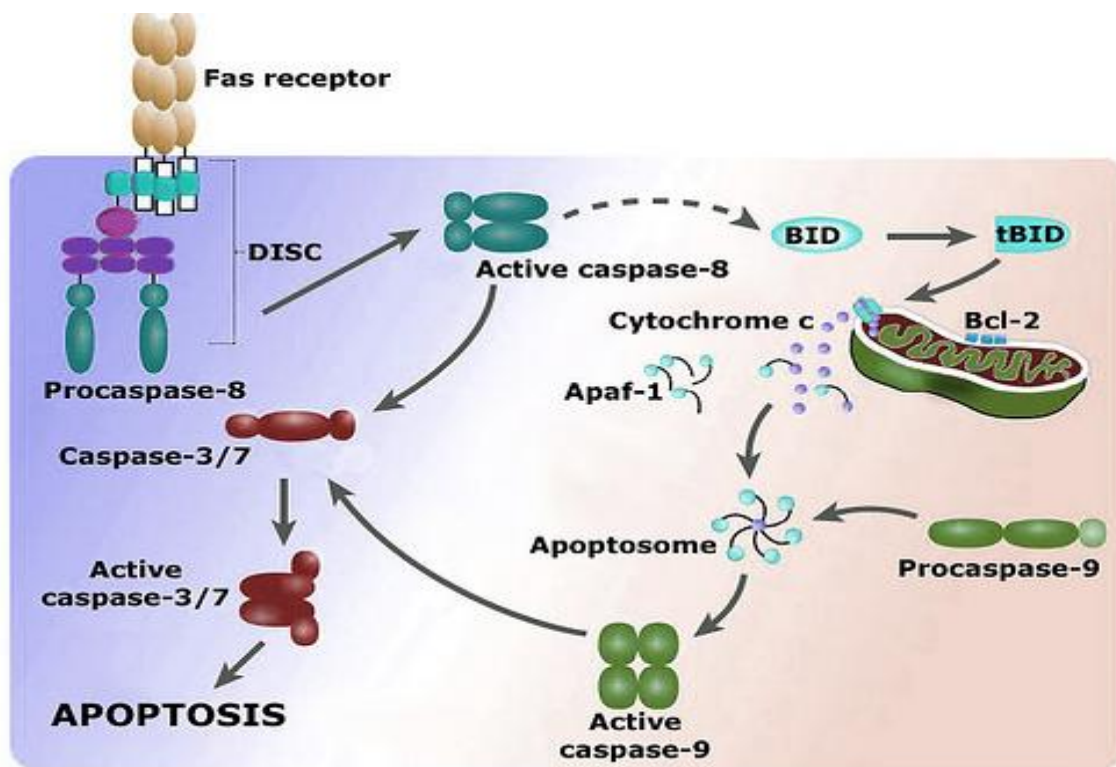


Figura 2 - Mecanismos extrínsecos relacionados ao processo de infecção viral e sua relação com os processos de morte celular programada. Fonte: domínio público

É difícil, se não impossível, que um vírus infecte uma célula sem ativar uma das vias do processo de apoptose, entretanto, estudos recentes demonstram um arranjo entre as vias apoptóticas viral e celular (HARDWICK, 2001). Kajita et al. (2006) descreveram a ativação das caspases 3 e 8 no processo de infecção viral, em monocamadas de células Vero, associando este mecanismo ao processo de morte celular.

Ciacci-Zanella et al. (1999) relataram que o gene relacionado à latência (RL) do BoHV-1 possui a capacidade de retardar a apoptose celular,

protegendo o neurônio infectado durante a latência. Há suspeitas de que casos neurológicos de BoHV-5 podem estar associados á expressão de proteínas relacionadas ao CD3 e linfócitos T (CARDOSO et al., 2010).

Recentemente, Silva-Frade et al. (2010) demonstraram que a infecção experimental de oócitos, espermatozóides e embriões com BoHV-5 não interfere na qualidade embrionária ou desenvolvimento *in vitro*. Assim, é possível inferir que o BoHV-5 possui mecanismos desconhecidos para inibir a morte celular e evitar o sistema imunológico do hospedeiro.

2. HIPÓTESE

O processo de infecção viral (BoHV-5 e BoHV-1) em monocamadas de células MDBK afeta o metabolismo das mitocôndrias, desencadeando processos de sinalização para os eventos intrínsecos da morte celular programada.

3. OBJETIVOS

3.1. Gerais

Avaliar os eventos intrínsecos de morte celular programada associados à infecção pelo BoHV-5 e BoHV-1, no cultivo de células MDBK.

3.2. Específicos

- Promover a infecção experimental com BoHV-1 e BoHV-5 e observar efeitos citopáticos;

- Avaliar parâmetros como viabilidade celular e fatores ligados aos períodos iniciais do processo de morte celular programada como a detecção da anexina V e Apo-Trace™;
- Avaliar a expressão de Bcl-2 e Bax nos diferentes períodos pós-infecção.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Herpesvirus

4.1.1. Nomenclatura e Classificação

Ordem *Herpesvirales*, Família *Herpesviridae*; a nomenclatura é derivada do grego *ερπειν* (*herpein*), rastejar, e se refere à característica lesão causada pelos Herpesvirus humanos comuns: Herpes simplex vírus (HSV) e Varicella zoster vírus (VZV). A família *Herpesviridae* inclui cerca de 200 vírus isolados de diferentes hospedeiros como moluscos, peixes, anfíbios, reptéis, aves e mamíferos. (ROIZMAN et al., 2001). A forte associação que a maioria dos herpesvírus possui com uma única espécie hospedeira leva a crer que esses vírus tenham evoluído junto com seus hospedeiros (THIRY et al., 2007).

Baseado em propriedades biológicas e moleculares, a família foi dividida em três subfamílias: *Alpha*, *Beta* e *Gammaherpesvirinae*. Os membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* possuem como característica comum o amplo espectro de hospedeiros, um ciclo de replicação curto e rápido e a capacidade de induzir latência, alojando-se nos gânglios nervosos, principalmente no trigêmeo e sacral, podendo ser reativado em situações estressantes como

parto, transporte, vacinações ou com a administração prolongada de corticóides (ACKERMANN et al., 1982; ROIZMAN et al., 2001).

Os alphaherpesvírus são classificados em quatro gêneros: *Simplexvirus*, *Mardivirus*, *Iltovirus* e *Varicellovirus* (PORTERFIELD, 1989) sendo que este último inclui vários vírus que acometem ruminantes, entre eles o Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e o Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5), que causam infecções facilmente transmitidas em populações animais de alta densidade, corroborando para grandes perdas econômicas (ACKERMANN e ENGELS, 2006).

4.1.2. Morfologia e Organização genômica

Todos os membros da família *Herpesviridae* compartilham a mesma morfologia baseada em um vírion com núcleocapsídeo icosaédrico de em média 100nm de diâmetro formado por 150 hexâmeros e 12 pentâmeros. Essa estrutura é recoberta por uma camada de proteínas, o tegumento, que por sua vez é rodeado por uma bicamada lipídica, o envelope, onde se encontram a maioria das glicoproteínas virais (FENNER et al., 1993; ROIZMAN et al., 2001), como esquematiza a Figura 3.

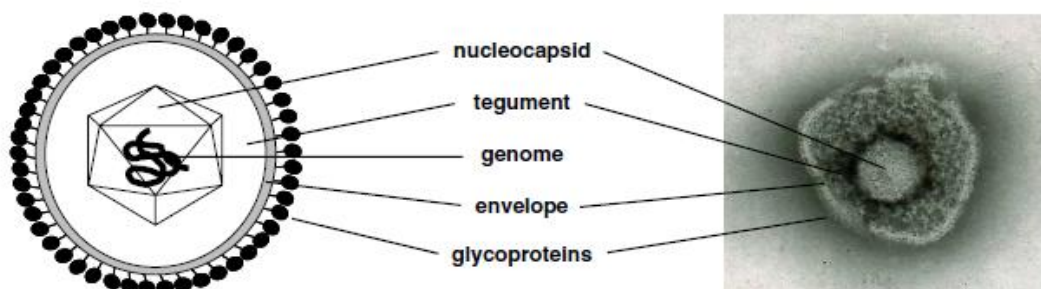


Figura 3 - Morfologia de um vírion da família *Herpesviridae*. Modificado de Thiry et. al. 2007.

O vírion maduro protege o genoma viral em seu interior, que consiste em uma dupla fita de DNA linear arranjado em uma região única longa (UL – “unique long”) de 102 a 104 Kpb e um região única curta (US – “unique short”) de 10,5 a 11 Kpb, flanqueadas por duas sequências repetidas invertidas denominadas repetição interna (IR – “Internal Repeat”) e repetição terminal (TR – “Terminal Repeat”) (FENNER et al., 1993; SCHWYZER et al., 1996), classificado como genoma de classe D (Figura 4), o que permite a formação de dois isômeros do DNA viral pela inversão do segmento US (THIRY et al., 2007).

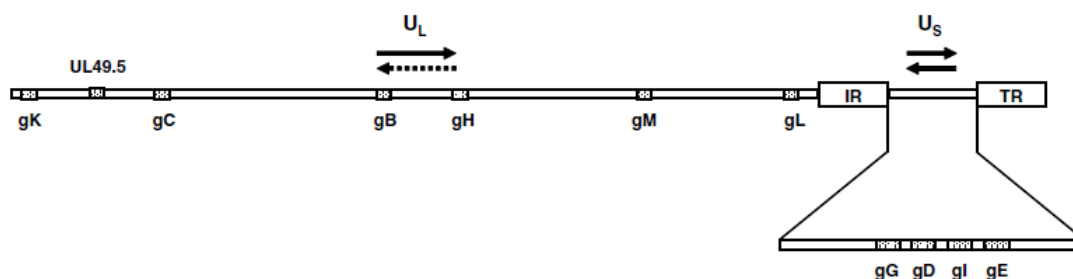


Figura 4 - Organização genômica dos *Alphaherpesvirus*. Modificado de Thiry et al. 2007.

Os genes dos *Alphaherpesvirus* são expressos em cascata: no instante em que o genoma viral se liberta do capsídeo se inicia a produção de proteínas precoces imediatas, que promovem a produção de proteínas imediatas; por fim há produção de proteínas tardias seguindo a síntese do DNA viral (SALVADOR et al., 1998).

Com similaridades antigênicas e moleculares, BoHV-1 e BoHV-5 compartilham em torno de 85% de homologia genômica (FLORES et al., 1998). Tradicionalmente a diferenciação entre eles era baseada apenas nas características clínico-epidemiológicas dos surtos, mas atualmente a análise de restrição enzimática (REA) provou ser extremamente útil para a diferenciação

entre os vários *Alphaherpesvirus* de ruminantes e tem sido largamente utilizada para comparar os vírus isolados (ENGELS et al., 1981).

4.1.3. Glicoproteínas virais

Todos os Herpesvirus codificam um amplo número de proteínas que são divididas em 3 grupos: proteínas envolvidas no metabolismo do ácido nucléico, fatores que modulam a resposta imune e glicoproteínas virais (ROIZMAN e PELLETT, 2001). Ao menos 33 das proteínas codificadas são estruturais, das quais 13 estão associadas ao envelope viral e, destas, 10 potencialmente codificam glicoproteínas (SCHWYZER e ACKERMANN, 1996).

Existem 10 glicoproteínas virais conhecidas: gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, e gM; que desempenham um importante papel na interação vírus-hospedeiro, estando envolvidas em varias etapas do ciclo viral como adsorção, penetração, maturação e liberação do vírion. Além de constituírem importante alvo para a resposta imune, sendo inclusive utilizadas como componentes de vacinas e testes diagnósticos (SCHRODER e KEIL, 1999).

4.1.4. BoHV-1

Em 1841, Büchner descreveu lesões genitais venéreas em vacas. Este é o primeiro registro de doença causada pelo Herpesvirus bovino tipo 1, mas sua etiologia viral só foi demonstrada em 1928 por Reisinger e Reimann como citado por Thiry et al. (2007).

O BoHV-1 é classificado em dois subtipos, sendo o subtipo 1 (BoHV-1.1) o agente causador da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), conjuntivite e abortos; e o subtipo 2 (BoHV-1.2) associado á Vulvovaginite Infecciosa (IPV) e balanopostite (ROIZMAN et al., 1995); há também registros de doença neurológica associada ao BoHV-1 embora este tipo de manifestação seja mais comumente relacionada ao BoHV-5 (SILVA et al., 2007; STUDDERT, 1989).

O BoHV-1 tipicamente apresenta alta morbidade e baixa mortalidade, sendo excretado pelas secreções respiratórias, oculares, genitais e sêmen de bovinos por 10-14 dias durante a infecção aguda. A transmissão ocorre principalmente por contato direto através de aerossóis, monta natural, inseminação artificial ou por contato indireto através de fômites (LEMAIRE et al., 1999). Por ser um vírus de distribuição mundial, presente em forma enzoótica na maioria dos países onde a pecuária bovina é praticada (GIBBS e RWEYEMAMU, 1977), é responsável por grandes perdas econômicas em países produtores de carne, o que levou a Organização Mundial de Saúde Anima (“World Organization for Animal Health”) a classificá-lo na lista de doenças a serem controladas e motivou diversos programas de erradicação em países da Europa (THIRY et al., 2007).

4.1.5. BoHV-5

Em virtude da grande similaridade e das amplas reações cruzadas em testes sorológicos, o BoHV-5 foi inicialmente considerado uma variante encefalitogênica, do BoHV-1, sendo classificado como subtipo 1.3 (BRATANICH et al., 1991; TEIXEIRA et al., 1998); até que estudos antigênicos

e análises de restrição enzimática levaram à criação do tipo 5 e sua classificação em 3 subtipos: BoHV-5 “a” (Isolado na Austrália); BoHV-5 “b” (isolado na Argentina) e BoHV-5 “non-a, non-b” (isolado no Brasil) (ROIZMAN et al., 1992; D’ARCE et al., 2002).

O Herpesvírus bovino tipo 5 causa encefalites ou meningoencefalites com baixa morbidade e alta letalidade em animais jovens, embora ocasionalmente possa causar infecção subclínica ou doença de severidade moderada em animais adultos (FRENCH, 1962; SALVADOR et al., 1998). Os sintomas descritos são depressão, isolamento do rebanho, tremores, nistagmo, bruxismo, ptialismo, ataxia, hipermetria, andar em círculos, movimentos de pedalagem, paralisia, decúbito esternal, convulsões e morte (BELTRÃO et al., 2000; MEYER et al., 2001; PEREZ et al., 2002).

A transmissão ocorre da mesma forma tanto para BoHV-1 quanto para o BoHV-5, com replicação inicial nos células epiteliais da região naso-oro-faríngea e subsequente disseminação para as terminações nervosas (FLORES et al., 1998); entretanto estudos têm apontado o envolvimento da gE do BoHV-5 em sua habilidade de se disseminar pelas células nervosas e neurovirulência, que o distingue do BoHV-1 (CHOWDHURY et al., 2002).

Contrastando com a ampla distribuição do BoHV-1, a distribuição geográfica do BoHV-5 é limitada, com alta incidência de doenças neurológicas em países da América do Sul, principalmente Brasil e Argentina, enquanto em outras partes do mundo o seu relato esporádico. A razão para esta particular distribuição ainda é indeterminada (PESHEV et al., 1998), embora a rara ocorrência de doença neurológica pelo BoHV-5 em áreas endêmicas para o

BoHV-1 pode ser explicada pela proteção cruzada induzida pela infecção natural por BoHV-1 ou vacinação (DEL MEDICO et al., 2006).

4.2. Apoptose

Durante muito tempo, a morte celular foi considerada um processo passivo de caráter degenerativo como a necrose e senescência, até que em 1964, foi proposto o termo "morte celular programada" para designar um tipo de morte celular que ocorre de forma não acidental; e em 1972, Kerr, Wyllie e Currie sugeriram o termo apoptose para indicar esse tipo ativo de morte celular (KERR et al., 1972).

Células animais possuem uma capacidade inata de perceber uma infecção viral e ativar medidas que limitam a replicação e disseminação do vírus. As duas principais medidas de defesa são: uma resposta protetora que leva à síntese de citocinas, incluindo interferons (IFN), para alertar e proteger as células vizinhas; e uma resposta suicida das células infectadas (apoptose) para restringir os componentes celulares disponíveis para a multiplicação viral. (FENSTERL et al., 2009).

As alterações morfológicas observadas na apoptose se iniciam com uma retração da célula, que leva a perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. Em seguida, a cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas contendo o conteúdo

celular denominadas corpos apoptóticos, que são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório (CLARKE e TYLER, 2009; GHAVAMI et al., 2009). Este processo de grande eficiência é extremamente regulado e requer a interação de inúmeros fatores. Sua ativação é iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial) (RAFF et al., 1998).

A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular celular, especificamente estresse mitocondrial causado por fatores como dano ao DNA. Sob o sinal de stress, as proteínas pró-apoptóticas no citoplasma, Bax e Bid, se ligam a membrana externa da mitocôndria levando a liberação do conteúdo interno. Entretanto, o sinal de Bax e Bid apenas não é suficiente para ativação completa (GRIVICICH et al., 2007).

Bac, outra proteína pró-apoptótica que reside com a mitocôndria também é necessária para promover a completa liberação do citocromo c e do conteúdo intramembranar da mitocôndria, ao passo que, a expressão do gene Bcl-2 tem como função proteger as células da morte prevenindo a liberação da citocromo c e impedindo o processo de apoptose. Seguindo a liberação, o citocromo c forma um complexo no citoplasma com adenosina trifosfato (ATP) e a enzima Apaf-1. Em seguida, o complexo ativa a caspase-9, uma proteína iniciadora que age em conjunto com o complexo citocromo c, ATP e Apaf-1 formando os apoptosomos, estes ativam a caspase-3, a proteína efetora que inicia a degradação (GHAVAMI et al., 2009).

A via extrínseca é desencadeada pela ação de moléculas sinalizadoras, conhecidas como ligantes específicos, em um grupo de receptores de morte transmembrana da célula alvo, como o FAS. Esta ligação é capaz de ativar pró-

caspases 8 ou 10, levando à ativação da caspase-3, efetora (GRIVICICH et al., 2007).

As vias apoptóticas são extremamente sofisticadas, altamente reguladas e monitoradas pelas células, e tem se mostrado um passo chave para a compreensão da patogênese dos herpesvirus (GRIFFIN et al., 2010), visto que a interferência do BoHV-5 na regulação das taxas de Bax e Bcl-2 foi recentemente comprovada (GARCIA et al., 2013).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Vírus e Cultivo celular

A estirpe “Los Angeles” do BoHV-1 foi a selecionada para o experimento, e a estirpe viral do BoHV-5 utilizada foi isolada de um bovino com infecção natural de meningoencefalite não supurativa e seqüenciada com o número de acesso (“GenBank Number”) GU9457818 (FERRARI et al., 2007). As suspensões virais foram estocadas em freezer a - 86°C, isoladas no meio essencial mínimo Eagle’s (MEM), seguido do isolamento em células MDBK (ATCC-CCL-22), cultivando as células no meio “Advanced” RPMI 1640 (Gibco-BRL® cat # 12633), sem soro fetal bovino e/ou proteína animal. O uso de células não infectadas serviu como controle negativo do isolamento viral, sendo que os resultados positivos foram determinados pelo efeito citopático, resultante da infecção viral (CARDOSO et al., 2007).

5.2. Infecção experimental

A estirpe virais “Los Angeles” do BoHV-1 e (“GenBank Number”) GU947818 do BoHV-5 foram utilizadas para a infecção experimental. As monocamadas células MDBK infectadas e não infectadas foram coletadas nos períodos 24, 48, 72, 96 e 120 h pós-infecção (p.i). O título viral de $10^{3.4}$ TCID₅₀/50 µL foi o utilizado no processo de infecção descrito a seguir. Monocamadas semi-confluentes (>70%) foram cultivadas em placas de cultivo celular de 9 orifícios (Marca Nunc®). O meio foi removido e, em seguida, adicionou-se 1 mL do inóculo viral durante 60 minutos a 37 °C em atmosfera de 5% CO₂. Após este período, foi removido o inóculo, o meio foi renovado (volume 2 mL/orifício) e as células foram avaliadas diariamente para observação dos efeitos citopáticos. A detecção viral foi realizada por imunomarcação com anticorpos monoclonais gentilmente cedidos pelo Prof. Eduardo Furtado Flores, Universidade de Santa Maria – RS. Nos períodos p.i. foram removidos o sobrenadante e as monocamadas infectadas e não infectadas para as análises descritas a seguir.

5.3. Teste MTT

A viabilidade das células controle não infectadas e das células expostas à infecção com BoHV-1 e BoHV-5 relacionados ao estresse oxidativo foram analisadas pelo teste do MTT (ARRIGO et al., 2005) com o kit “*In vitro* Toxicology Assay®” (Sigma-Aldrich® # M5655), durante os tempos de cultivo de 24, 48, 72, 96 e 120 h p.i.. Para cada período p.i. 2 mL de MTT foi

adicionado seguindo as recomendações do fabricante. As células com atividade mitocondrial transformam o MTT, de coloração amarela, em sais denominados cristais de formazan, de coloração violeta. Um volume de 50 μL /orifício de ácido isopropanolol (0,05 N) foi adicionado para solubilizar esses cristais. Após homogeneização, o sobrenadante foi submetido à espectrofotometria comprimento de onda 580 nm. Todos os valores encontrados são resultantes da média de triplicatas.

5.4. Isolamento de RNA total e PCR.

Após a colheita em 24, 48, 72, 96 e 120 h p.i., o RNA total de monocamadas de células e sobrenadantes, respectivamente, foi extraído usando protocolo Trizol™ LS de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen®). O RNA total foi utilizado para a síntese o cDNA com “Enhanced Avian RT First stand synthesis kit” (Sigma-Aldrich®). A PCR foi realizada com Jumpstart kit (Invitrogen®) para as proteínas bovinas Bax e Bcl-2, relacionadas à morte celular programada. Em todas as reações deste estudo foram usados como controle positivo os genes da histona 2a e β -actina, proteínas estruturais presentes no DNA e no citoesqueleto, respectivamente.

5.5. Teste transglutaminase

A enzima transglutaminase, presente em maior quantidade em células em apoptose, catalisa uma ligação covalente entre um grupo amina livre da poli-L-lisina, a qual é ligada covalentemente à placa, e o grupo γ - carboxamida

do substrato biotina-TVQQEL-OH presente no “Assay Buffer” (A573). Esta reação resulta em imobilização da biotina na superfície da placa, que é então corada com “Streptoavidin-Peroxidase” (S5512) e TMB “substrate” (T8665). A leitura foi feita em espectrofotômetro comprimento de onda 450 nm.

5.6. Coloração de células apoptóticas

A marcação das células MDBK em estágio inicial de apoptose foi realizada utilizando “Annexin V-FITC apoptosis detection kit” (Sigma-Aldrich®) e kit Apo-TRACE™ (Sigma-Aldrich®, V7639).

O kit Apo-TRACE™ possui uma molécula orgânica com propriedades fluorescentes, que responde às alterações no potencial da membrana plasmática, corando o citoplasma de células apoptóticas. O resultado foi avaliado em microscopia de fluorescência. Para a marcação foram utilizadas lamínulas de vidro estéreis, adicionadas 6×10^4 células MDBK/mL em cada lâmina e incubadas até que se atingisse 80 a 90% de confluência, sendo então submetidas à infecção experimental com BoHV-1 ou BoHV-5. Inicialmente, foi adicionado 250 μ L de “working medium B”, que contém 75 μ g/mL de Apo-TRACE™ e 0,5 μ g/mL de PI (iodeto de propídeo). As células foram incubadas à temperatura ambiente por 15 a 30 minutos protegidas da luz. Após uma lavagem com 250 μ L de solução tamponada de fosfato (PBS), todas as lâminas foram recobertas com 1 mL Fluormount® (Sigma-Aldrich®).

Para a marcação com Anexina, uma suspensão de MDBK, na concentração de 1×10^6 células/mL, infectadas e não infectadas, foram fixadas

com 3:1 (metanol e ácido acético) em lâminas de vidro. Depois de fixadas, as mesmas foram incubadas com 5 μ L de anexin V-FITC e 10 μ L de PI. Em seguida foram incubadas à temperatura ambiente por 10 min, protegidos da luz.

As lâminas resultantes de ambos os testes foram submetidas à análise em microscópio Axio Imager A.1 (Carl Zeiss Oberkochen®, Alemanha) conectado a câmera AxioCam MRc (Carl Zeiss®) e as micrografias foram processadas no programa Axiovision v. 4.7 (Carl Zeiss®).

5.7. Detecção da telomerase

Telomerase é uma transcriptase reversa que tem como função adicionar sequências específicas e repetitivas de DNA ao telômero dos cromossomos de células eucariotas, impedindo assim alterações cromossômicas e consequente apoptose celular. Esta enzima possui alta atividade em células germinativas, cancerosas e células tronco. As amostras foram lisadas e submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) com primers fluorescentes para amplificar as sequências criadas pela telomerase em um substrato oligonucleotídico. Os produtos da reação foram visualizados em gel de poliacrilamida 12,5%.

5.8. Análise estatística

As análises comparativas foram realizadas em triplicata. Para a estatística foi utilizado o teste-t de Student considerando $P > 0,05$ como diferença estatística.

6. RESULTADOS

6.1. Cultivo celular e Infecção experimental

As monocamadas de células MDBK foram mantidas nas condições descritas em material e métodos, e após a infecção experimental os efeitos citopáticos foram observados. Estes efeitos revelam, pela fotodocumentação, grandes áreas de células agrupadas, com citoplasma em fusão celular até a formação de grandes sincícios, ou células gigantes (Fig. 5 A, C, E e G). A observação foi feita em microscopia contraste de fase (Olympus, modelo IX 70) e visualizadas em todos os diferentes períodos p.i. As monocamadas também foram fixadas com 1% formamida e submetidas à coloração com hematoxilina (Fig. 5 B, D, F e H), para individualizar o núcleo, na intenção de identificar a formação de placas.

6.2. Viabilidade celular, Transglutaminase e Atividade da Telomerase

Conforme a Figura 6, o processo de produção viral afetou numericamente a viabilidade das células MDBK em comparação às monocamadas não infectadas, embora não haja diferença estatística. Isso se deve aos metabólitos gerados no decorrer do processo de replicação. Como o Herpesvírus tem seu ciclo de replicação no núcleo, nesse estudo verificamos a atividade da telomerase, cuja função é reparar danos ao DNA celular. Essa enzima, quando em alta atividade, sugere a ocorrência de abalos nas sequências gênicas da célula infectada. A ação da telomerase também é

aumentada em células cancerígenas e nas células embrionárias. No presente estudo, não foi detectada atividade da enzima telomerase, indicando a fase produtiva viral. Outra característica desta família seria a fase de latência, e neste caso poderia haver alterações na atividade da enzima telomerase, o que não constitui o foco do trabalho em questão. Também não foram encontradas diferenças significantes na atividade da enzima transglutaminase entre os grupos infectados com BoHV-1 e BoHV-5 e o grupo controle.

6.3. Detecção da apoptose

Os processos iniciais de apoptose ou morte celular programada inicializada pela infecção por BoHV-5 e BoHV-1 foram avaliados pela técnica Anexina V/ PI e Apo-TRACE™. Os resultados estão apresentados nas Figuras 7 e 8, respectivamente. A Figura 7 revela a detecção da Anexina V / PI nos diferentes intervalos p.i. Devemos observar que células positivamente marcadas somente para Anexina V revelam apoptose celular; duplamente marcadas para Anexina V e PI, acentuada apoptose celular e somente marcada para PI, necrose celular. Diante dos resultados, verificamos que a proporção Anexina V positiva aumenta com os intervalos e somente após 72h p.i. as células iniciam o processo de necrose com aumento de células positivas PI em relação à anexina V. Para o parâmetro Apo-TRACE™ ocorreu um aumento concomitante ao processo de infecção ($r = 0,98$) sendo considerado como correlação positiva (Fig. 8), indicando que nos momentos iniciais, até 72h p.i., o Herpesvírus mantém as células em apoptose e nos momentos finais, 96h p.i., já ocorrem os processos de necrose.

6.4. Isolamento de RNA total e PCR

Os resultados obtidos pela reação de RT-PCR demonstram a expressão do gene Bax a partir de 72 h p.i por BoHV-5 e 48h p.i por BoHV-1, demonstrando que há uma inibição do processo apoptótico até que o vírus atinja seu pico de replicação entre 48 e 72 h (Fig. 9). Não foi observada expressão de Bcl-2 em nenhum período pós-infecção por BoHV-5, enquanto na infecção por BoHV-1 há expressão de Bcl-2 em 48 h p.i. A reação foi bem conduzida, confirmado pela amplificação dos genes de referência.

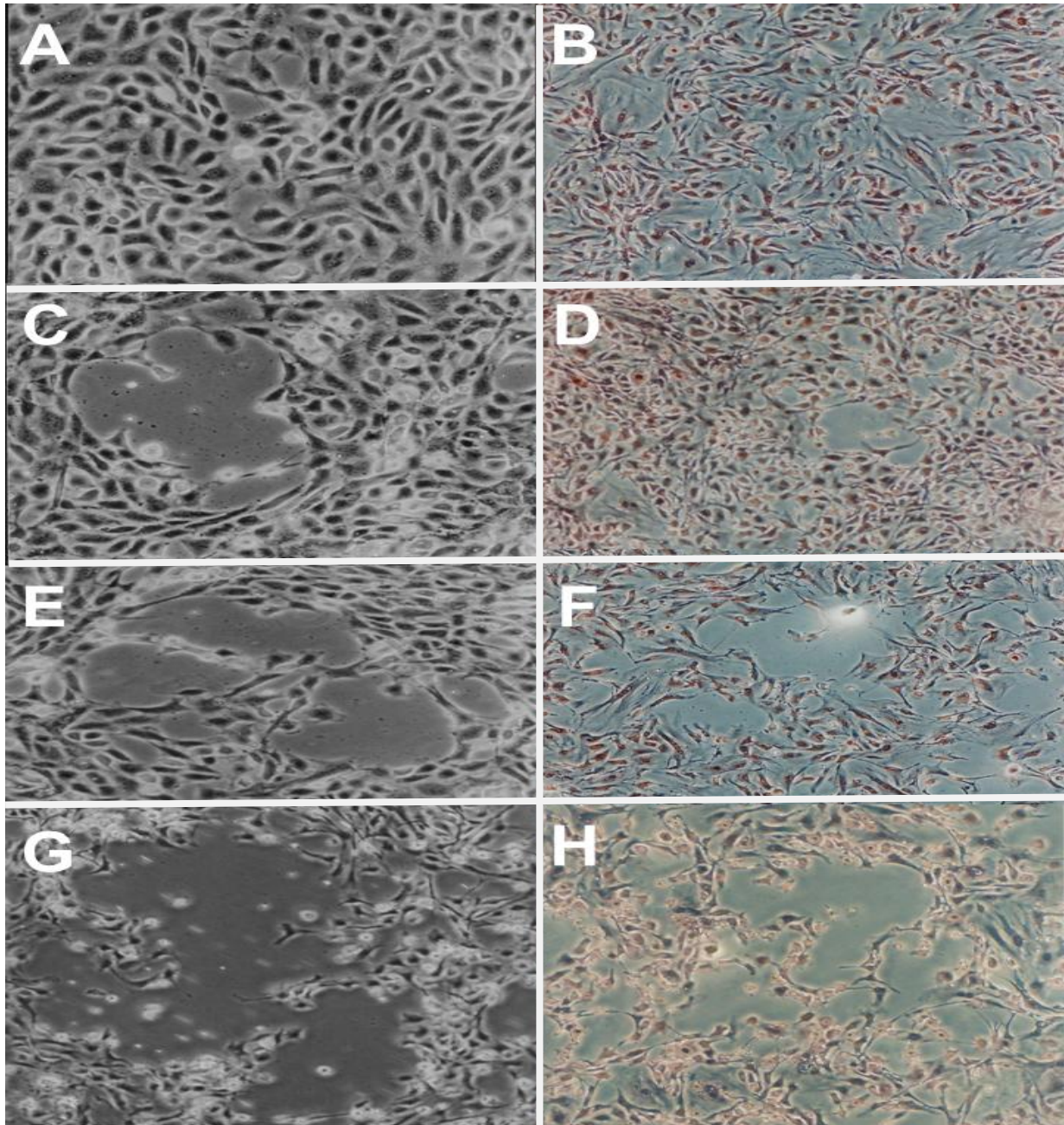


Figura 5 - Fotomicrografias em microscópio invertido com contraste de fase no aumento de 40X das monocamadas de células MDBK infectadas com o BoHV-5 nos diferentes tempos post-infecção. A) 24 h; C) 48 h; E) 72 h e G) 96 h contraste fase. B) 24 h; D) 48 h; F) 72 h e H) 96 h monocamadas fixadas e contra-coradas com hematoxilina.

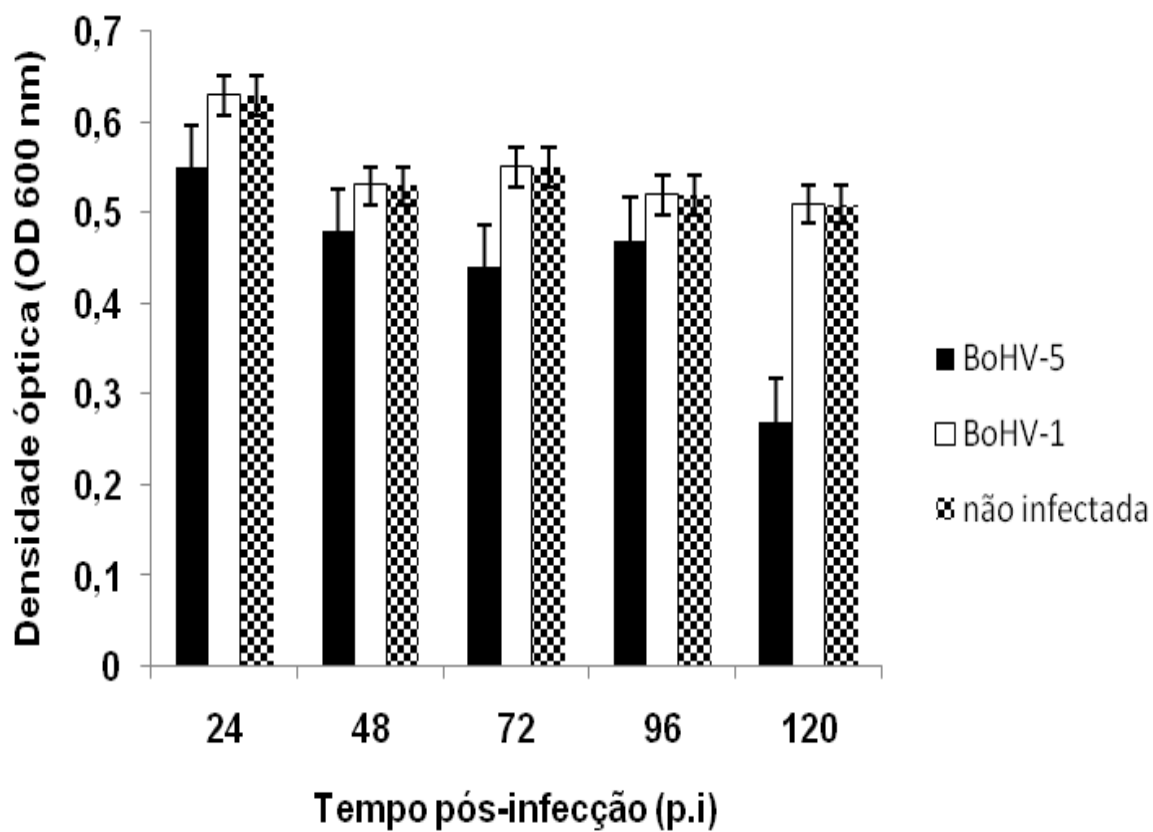


Figura 6 - Determinação da viabilidade celular pelo método do MTT nos diferentes tempos pós-infecção revelando queda significativa ($p < 0,005$) somente entre os períodos 24 e 48 h pi para o BoHV-1 e entre os períodos 96h e 120h para o BoHV-5.

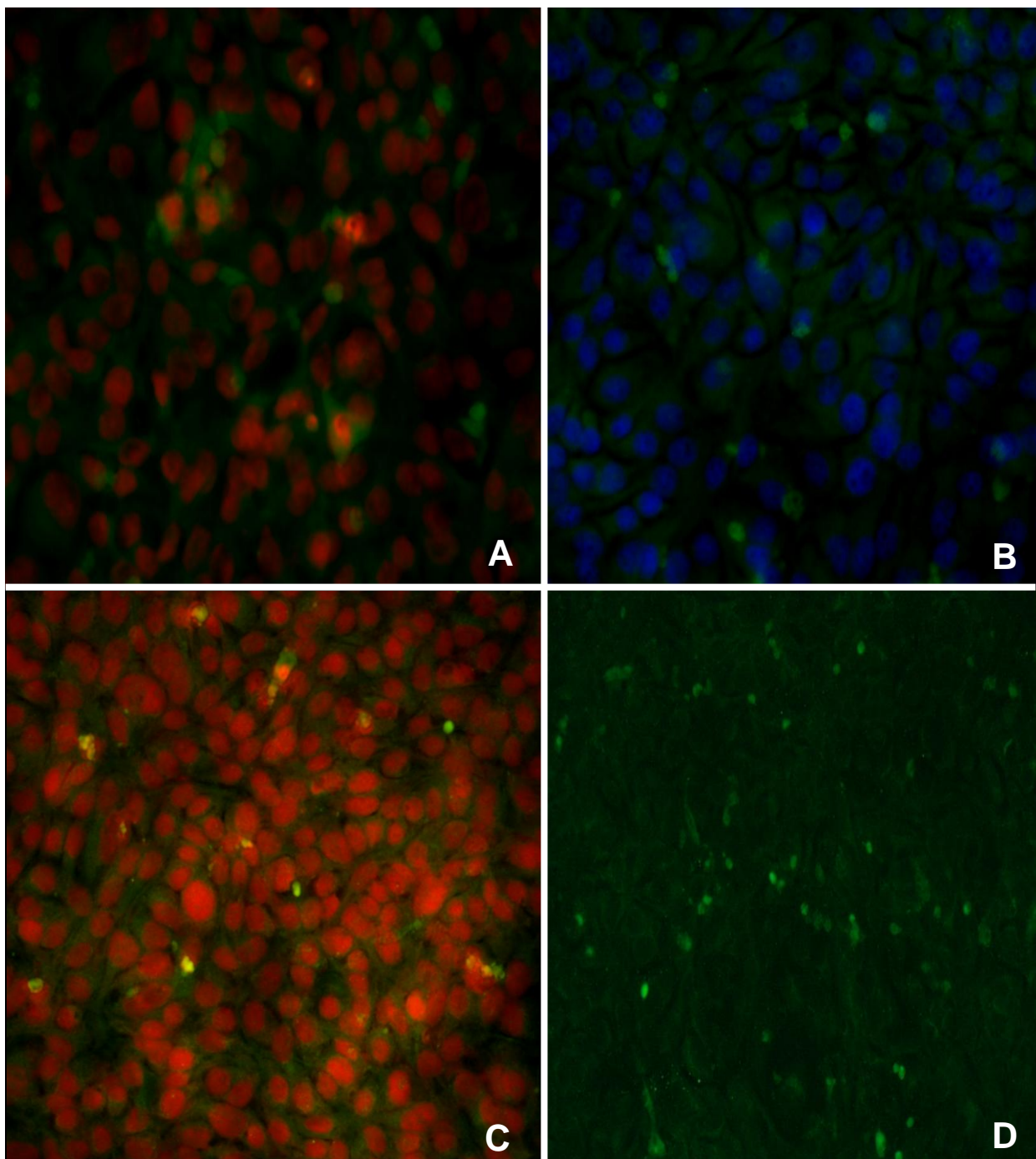


Figura 7 - Fotomicrografia realizada em microscópio fluorescência, aumento de 40x, revelando: A) marcação positiva para Anexina V e PI no período 48 h p.i.com BoHV-5; B) marcação positiva para antígenos virais BoHV-5 no período 48 h p.i. contra-coradas com DAPI; C) marcação positiva para Anexina V e PI no período 48 h p.i.com BoHV-1; D) marcação positiva para antígenos virais BoHV-1 no período 48 h p.i.

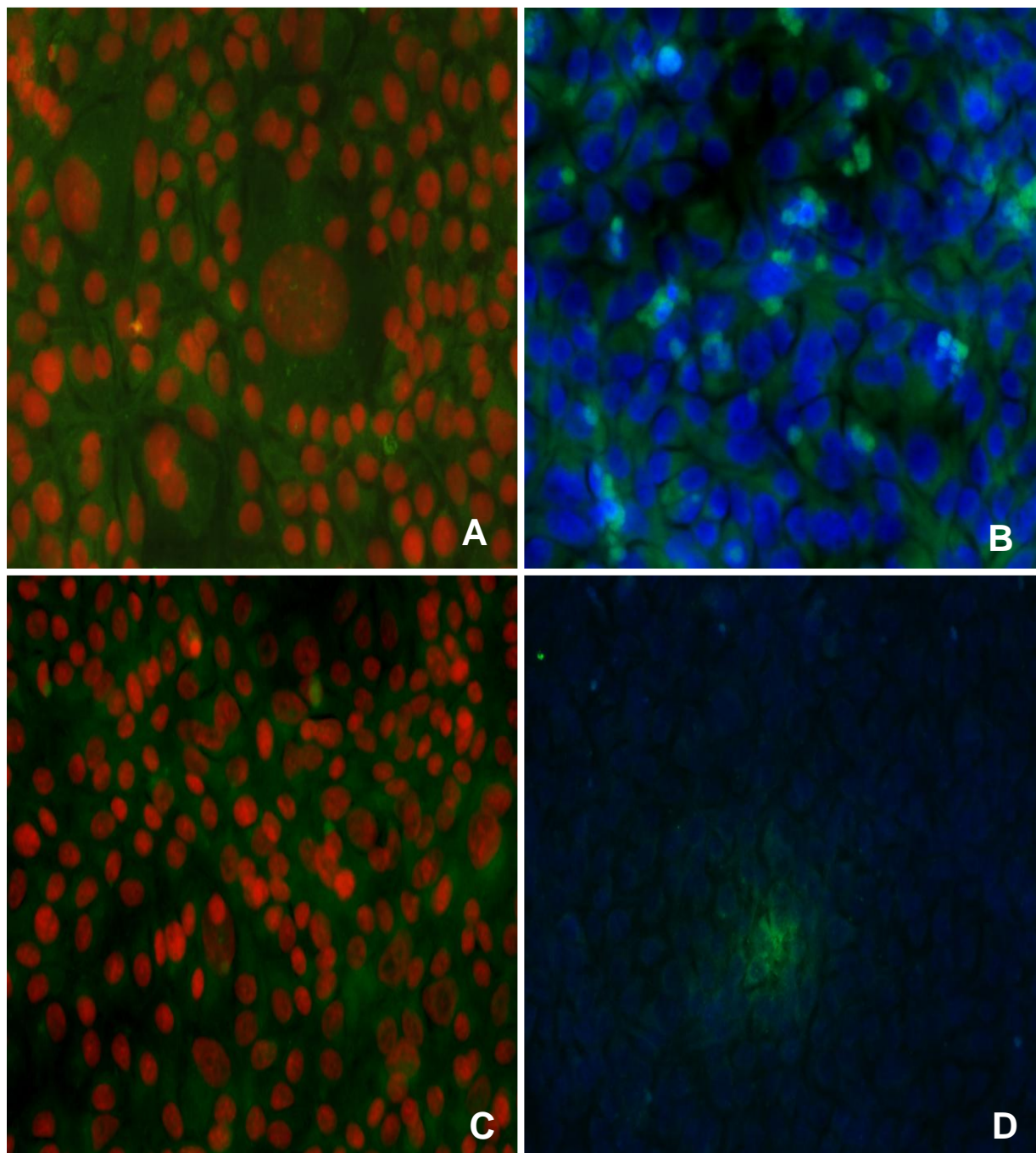
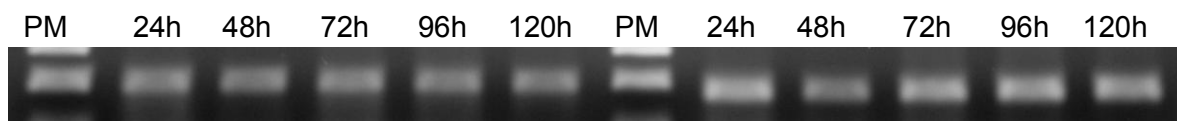
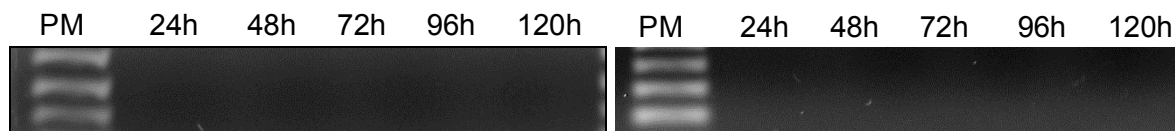


Figura 8 - Fotomicrografia realizada em microscópio fluorescência, aumento de 40x, revelando: A) marcação positiva para Apo-TRACE™ e PI no período 48 h p.i. por BoHV-5; B) marcação positiva para antígenos virais BoHV-5 no período 48 h p.i. contra-coradas com DAPI; C) marcação positiva para Apo-TRACE™ e PI no período 48 h p.i. por BoHV-1; D) marcação positiva para antígenos virais BoHV-1 no período 48 h p.i. contra-coradas com DAPI.

A) Histona e β -actina

B) Bax e Bcl-2



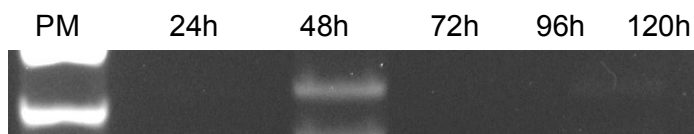
C) Bax



D) Bcl-2



E) Bax



F) Bcl-2

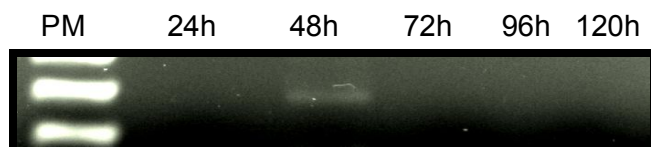


Figura 9 - Reação de RT-PCR de RNAm de células MDBK experimentalmente infectadas com BoHV-5 e BoHV-1 em diferentes períodos pós-infecção, em gel de agarose 1,5%. A) Marcação positiva dos genes de referência, histona e β -actina, em todos os períodos pós-infecção; B) Ausência de marcação para Bax e Bcl-2 nas células não infectadas (controle negativo) em todos os períodos; C) Marcação positiva para Bax a 72 e 96h p.i. e negativa nos demais períodos pós-infecção por BoHV-5; D) Marcação negativa para Bcl-2 em todos os períodos p.i por BoHV-5; E) Marcação positiva para Bax 48h p.i. e negativa nos demais períodos p.i por BoHV-1; F) Marcação positiva para Bcl-2 48h p.i. e negativa nos demais períodos p.i por BoHV-1.

7. DISCUSSÃO

Este estudo teve início a fim de avaliar e comparar o efeito das infecções pelo BoHV-1 e BoHV-5 sobre a expressão dos mediadores apoptóticos Bax e Bcl-2.

O cultivo de células MDBK é comumente utilizado para isolamento e multiplicação de *Alphaherpesvirus* (LADELFA et al., 2011; MARIN et al., 2012). Após a infecção viral, as culturas foram capazes de produzir lise celular progressiva ao longo dos períodos pós infecção e efeitos citopáticos similares aos descritos na literatura como fusão celular, formação de placas, células gigantes e formação sincicial (MARIN et al., 2012). A eficiência da infecção é demonstrada também pela crescente marcação de células apoptóticas pelas técnicas da Anexina V e Apo-TRACE ao longo dos períodos p.i. É importante ressaltar que cultivos celulares *in vitro* submetidos a estímulos que levem a apoptose eventualmente sofrem necrose secundária ao estímulo, comprovada pela marcação vermelha do iodeto de propídeo.

A Bcl-2 é encontrada na membrana nuclear, retículo endoplasmático e na membrana mitocondrial externa (GOLDMACHER, 2005) enquanto Bax é uma proteína integral da membrana mitocondrial (OHTA, 2011). Estas duas proteínas são relacionadas ao equilíbrio dos fenômenos de apoptose e anti-apoptose relacionados à infecção viral, eventos cruciais na patogenia viral (GRIFFIN et al., 2010). Assim muitos vírus desenvolveram a capacidade de ativar alguns mediadores anti-apoptóticos a fim de promover a sobrevivência da célula hospedeira, que é crucial para a replicação viral (DERUELLE et al., 2010; REEVERS et al., 2012).

Essa manipulação é evidenciada pelo teste MTT, no qual a viabilidade das células infectadas por ambos os vírus se mantém muito semelhante às células controle. Observa-se também a expressão de Bcl-2 às 48h p.i pelo BoHV-1 como forma de, pela formação de dímeros, neutralizar a expressão de Bax e garantir que o vírus alcance sua fase produtiva às 72h p.i.. Xu et al. (2012) já constataram que o vírus induz a ativação da caspase-8 nos momentos iniciais da infecção, levando as células à morte num primeiro momento, mas regulando a morte celular em seguida. Em contrapartida, não foi observada expressão Bcl-2 pela infecção pelo BoHV-5, enquanto a expressão de Bax só ocorre após a fase produtiva (72 h p.i) quando as células finalmente entram em processo de morte, com grande queda da viabilidade a 120 h p.i. Este tipo de modulação já foi descrito anteriormente para outros membros da família *Herpesviridae* (OHTA, 2011) e para o próprio BoHV-5 (GARCIA et al., 2013).

É sabido que há uma interligação entre as vias intrínseca e extrínseca de apoptose, e que ambas culminam na fase de execução, a via final da apoptose (CHAU et al., 2000) e já foi relatado que o gene LAT do HSV protege os neurônios infectados da morte através da modulação do TNF e das caspases, que correspondem à etapa final de ambas as vias apoptóticas, além de atuar no ciclo de estabelecimento e reativação da latência (PERNG et al., 2000); a modulação destes mesmos fatores também já foi descrita durante infecção experimental por BoHV-1 em células MDBK (XU et al., 2012). Portanto, é pertinente afirmar que a ação viral nas proteínas apoptóticas certamente não está restrita a duas proteínas (Bax e Bcl-2), podendo modular também outras das demais 23 proteínas da família Bcl-2, além dos receptores

de morte da via extrínseca de morte celular e dos fatores relacionados à fase de execução.

Apesar dos diversos estudos sobre as proteínas relacionadas ao equilíbrio da apoptose, os mecanismos moleculares de ação e ativação destas proteínas ainda não estão completamente compreendidos, tornado necessário que mais estudos sejam realizados, a fim de elucidar as várias funções das proteínas reguladoras da apoptose e sua relação com a infecção viral.

8. CONCLUSÃO

Ambos BoHV-1 e BoHV-5 desenvolveram mecanismos para evitar a morte celular, incluindo a manipulação da expressão de Bax e Bcl-2 pelas células infectadas. O BoHV-1 promove apoptose nos momentos iniciais da infecção, mas em seguida consegue modulá-la para que haja o pico de replicação viral, mantendo melhor a viabilidade celular durante todo o processo de infecção, enquanto o BoHV-5 bloqueia o processo apoptótico até o pico de replicação, ocorrendo significativa queda da viabilidade celular em seguida.

Os resultados deste estudo são apenas uma parte do complexo mecanismo de controle da apoptose na relação vírus/hospedeiro. Há ainda muitos outros elementos a serem esclarecidos para o completo entendimento da interação dos herpesvírus bovinos com a célula hospedeira e modulação da morte celular.

9. REFERÊNCIAS

ACKERMANN, M.; ENGELS, M. Pro and contra IBR-eradication. **Vet. Microbiol.** v. 113, p. 293–302, 2006.

ACKERMANN, M.; PETERHANS, E.; Wyler, R. DNA of bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. **Am. J. Vet. Res.** v. 43, p. 36–40, 1982.

ARRIGO, A-P.; FIRDAUS, W.; J.J., MELLIER, G.; MOULIN M.; PAUL, C.; DIAZ-LATOUD, C.; KRETZ-REMY, C. Cytotoxic effects induced by oxidative stress in cultured mammalian cells and protection provided by Hsp27 expression. **Methods**, v. 35, p. 126-138, 2005.

BAGUST, T.J.; CLARK L. Pathogenesis of meningoencephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. **J. Comp. Pathol.**, v. 82, p. 375-383, 1972.

BELKNAP, E.B.; Collins, J.K.; Ayers, V.K.; Schultheiss, P.C. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 5 (BHV-5). **Vet. Pathol.**, v. 31, p. 358-365, 1994.

BELTRÃO, N.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; SILVA, A.M.; ROEHE, P.M.; IRIGOYEN, L.F. Infecção e enfermidade neurológica pelo herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5): coelhos como modelo experimental. **Pesq. Vet. Bras.**, v 20, n. 4, p. 144-150, 2000.

BRATANICH, A.C.; SARDI, S.I.; SMITSAART, E.N.; SCHUDEL, A.A. Comparative studies of BHV-1 variants by in vivo - in vitro tests. **J. Vet. Med. B.**, v. 38, p. 41-48, 1991.

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

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. **Am. J. Biochem. Biotechnol.**, 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.; A novel in situ polymerase chain reaction hybridization assay for the direct detection of bovine herpesvirus type 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. **J. Virol. Methods.**, v. 163, p. 509-512, 2010.

CIACCI-ZANELLA, J.; STONE, M.; HENDERSON, G.; JONES, C. The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 inhibits programmed cell death. **J. Virol**, v. 73, n. 12, p. 9734–40, 1999.

CHAU, B.N.; CHENG, E.H.; KERR, D.A.; HARDWICK, J.M. Aven, a novel inhibitor of caspase activation, binds BclxL and Apaf-1. **Mol Cell**, v 6, p 31–40, 2000.

CHOWDHURY, S.I.; ONDERCI, M.; BHATTACHARJEE, P.S.; AL-MUBARAK, A.; WEISS, M.L.; ZHOU, Y. Bovine herpesvirus 5 (BHV-5) US9 is essential for BHV-5 neuropathogenesis. **J. Virol.**, v 76, p. 3839-3851, 2002.

CLARKE, P.; TYLER, K.L. Apoptosis in animal models of virus induced disease. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 7, p. 144–155, 2009.

CLAUS, M.P.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Herpesvírus Bovino Tipo 5 e Meningoencefalite Herpética Bovina; Meningoencephalitis by Herpesvirus Type 5; **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 131-141,2002.

D'ARCE, R.C.F.; 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 herpesviruses types 1 and 5. **Vet. Microbiol.**, v. 88, p. 315-324, 2002.

DEL MEDICO ZAJAC, M.P.; PUNTEL, M.; ZAMORANO, P.I.; SADIR, A.M.; ROMERA, S.A.; BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. **Re. Vet. Sci.**, v. 81, n. 3, p. 327-334, 2006.

DERUELLE, M.J.; DE CORTE, N.; ENGLEIBIENNE, J.; NAUWYNCH, J.; FAVOREEL, N.W.; Pseudorabies virus US3-mediated inhibition of apoptosis does not affect infectious virus production. **J. Gen. Virol.**, v. 91, p. 1127-1132, 2010.

D' OFFAY, J. M.; ELY, R. W.; BALDWIN, C. A.; WHITENACK, D. L.; STAIR, E. L.; COLLINS, J. K.; Diagnosis of encephalitic bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) infection in cattle: virus isolation and immunohistochemical detection of antigen in formalin-fixed brain tissue. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 7, p. 247-251, 1995.

ENGELS, M; STECK, F.; WYLER, R.; Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis. **Arch. virol.**, v. 67, n. 2, p. 169-174, 1981.

FENNER, F.; GIBBS, E.P.; MURPHY, F.A.; **Vet. Virol.**, 2.ed. London:Academic Press, 1993.

FENSTERL, V.; SEN, G.C. Interferons and viral infections. **Biofactors** v. 35, p. 14–20, 2009.

FERRARI, H.F.; LUVIZOTTO, M.C.R.; RAHAL, P.; CARDOSO, T.C. 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. Methods.**, v. 146, p. 335-340, 2007.

FLORES, E.F.; SILVA, A.M.; WEIBLEN, R. Neuropatogenicidade do herpesvirus bovino tipo 5 (BHV-5). In: Simpósio Internacional sobre Herpesvirus Bovino (tipo 1 e 5) e Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV), 01, Santa Maria, **Anais...Santa Maria: UFSM**, p. 127-136, 1998.

FRENCH, E.L. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. **Aust. Vet. J.**, v. 38, p. 216-221, 1962.

GARCIA, A.F.; NOVAIS, J.B.; ANTELLO, T.F.; SILVA-FRADE, C.; FERRAREZI, M.C.; FLORES, E.F.; CARDOSO, T.C. BoHV-5 infection induces Bax/BCI-2 expression. **Genet. Mol. Res.**, v. 12, n. 3, p. 3897-3904, 2013.

GHAVAMI, S.; HASHEMI, M.; ANDE, S.R.; YEGANEH, B.; XIAO, W.; ESHRAGHI, M.; BUS, C.J.; KADKHODA, K.; WIECHEC, E.; HALAYKO, A.J.; LOS, M. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. **J. Med. Genet.**, v. 46, p. 497-510, 2009.

GIBBS, E.P.J.; RWEYEMANN, M.M. Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1. **Vet. B.**, v. 47, n. 5, p. 317-343, 1977.

GOLDMACHER, V.S., Cell death suppression and cytomegaloviruses. **Apoptosis**, v. 10, p. 251-265, 2005.

GRIFFIN, B.D.; VERWEIJ, M.C.; WIERTZ, E.J.H.J. Herpesvirus and immunity: the art of evasion. **Vet. Microbiol.** v. 143, p. 89-100, 2010.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

HARDWICK, J.M. Apoptosis in viral pathogenesis. **Cell death differ.**,v. 8, p. 109-110, 2001.

KAJITA, M; KATAYAMA, H; MURATA, T; KAI, C; HORI, M; OZAKI, H. Canine Distemper Virus induces apoptosis through Caspase-3 and -8 activation in Vero cells. **J. Vet. Med.**, v. 53, p. 273 – 277, 2006.

KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer.**, v. 6, p. 239-57, 1972.

LADELFA, M.F.; DEL MÉDICO ZAJAC, M.P.; KOTSIAS, F.; DELGADO, F.; MUYLKENS, B.; THIRY, J.; THIRY, E.; ROMERA, S.A. Comparative study on the in vitro and in vivo properties of two bovine herpesvirus-5 reference strains. **Acta Vet. Scand**, v. 53, p. 37, 2011.

LEMAIRE, M.; SCHYNTS, F.; MEYER, G.; THIRY, E. Antibody response to glycoprotein E after bovine herpesvirus type 1 infection in passively immunised, glycoprotein E-negative calves. **Vet. Rec.**, v. 144, p. 172-176, 1999.

MARIN, M.S.; LEUNDA, M.R.; VERNA, A.E.; FAVERIN, C.; PÉREZ, S.E.; ODEÓN, A.C. In vitro replication of bovine herpesvirus types 1 and 5. **J. Virol. Methods.**, v. 181, p. 80-85, 2012.

MEYER, G.; LEMAIRE, M.; ROS, C.; BELAK, K.; GABRIEL, A.; CASSART, D.; COIGNOUL, F.; BELAK, S.; THIRY, E. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus type 1 and 5. **Arch. virol.**, v. 146, n. 4, p. 633-652, 2001.

METZLER, A.E.; SCHUDEL, A.A.; ENGELS, M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. **Arch. Virol.**, v. 87, p. 205- 217, 1986.

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

PEREZ, S.E.; BRETSCHHEIDER, G.; LEUNDA, M.R.; OSORIO, F.A.; FLORES, E.F.; ODEÓN, A.C.; Primary infection, latency, and reactivation of Bovine Herpesvirus type 5 in bovine nervous system. **Vet. Pathol**, v. 39, p. 437-444, 2002.

PERNG, G. C.; JONES, C. J.; CIACCI-ZANELLA, J.; STONES, M.; HENDERSON, G. A.; YUKHT, A.; SLANINA, S. M.; HOFMAN, F. M.; GHIASI, H.; NESBURN, A. B.; WECHSLER, S. L. Virus-induced apoptosis blocked by Herpes Simplex Virus latency-associated transcript. **P. Vet. Biomed. Sci.** v. 287, p. 1500 – 1503, 2000.

PESHEV, R.; CHRISTENSEN, L.; CHRISTOV, A.L. Comparative molecular epidemiological investigation on different bovine herpes viruses. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 21, n. 4, p. 247-255, 1998.

PORTERFIELD, J.S. Andrewes' Viruses of Vertebrates. 5th ed. **Baillière Tindall**, London, p. 457, 1989.

RAFF, MARTIN. Cell suicide for beginners. **Nature** v. 396, p. 119-122, 1998.

REEVERS, M.B.; BREIDENSTEIN, A.; COMPTON, T. Human cytomegalovirus activation of ERK and myeloid cell leukemia-1 protein correlates with survival of latency infected cells. **PNAS Microbiol.**, v. 109, p. 588-593, 2012.

RIET-CORREIA, F.; VIDOR, T.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C. Meningoencefalite e necrose do córtex cerebral em bovinos causadas por herpesvírus bovino-1. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 9, n. 1-2, p. 13-16, 1989.

ROEHE, P.M.; SILVA, T.C.; NARDI, N.B.; OLIVEIRA, L.G.; ROSA, J.C.A. 1997. Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina e herpesvírus da encefalite bovina com anticorpos monoclonais. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 17, n. 1, p. 41-44, 1997.

ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R.C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A.C.; STUDDERT, M.J. The family herpesviridae: an update. **Arch. Virol.**, v. 123, p. 425-448. 1992.

ROIZMAN, B.; DESROISIERS, R.C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A.C.; STUDDERT, M.J. Family Herpesviridae. **Arch. Virol. suppl.**, v. 10, p. 114-127, 1995.

ROIZMAN B.; PELLETT P.E. The family Herpesviridae: A brief introduction, in: Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.), **Fields Virology**, 4th ed., Lippincott Williams and Wilkins publishers, Philadelphia, p. 2381–2398, 2001.

SALVADOR, S.C.; LEMOS, R.A.A.; RIET-CORREA, F.; ROEHE, P.M.; OSÓRIO, A.L.R. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 18, n. 2, p. 76-83, 1998.

SANCHES, A.W.D.; LANGOHR, I.M.; STIGGER, A.L.; BARROS, C.S.L. Doenças do sistema nervosa central em bovinos no Sul do Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 20, p. 113–8, 2000.

SCHRODER C.; KEIL G.M. Bovine herpesvirus 1 requires glycoprotein H for infectivity and direct spreading and glycoproteins gH(W450) and gB for glycoprotein D-independent cell-to-cell spread, **J. Gen. Virol.**, v. 80, p. 57–61, 1999.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminant herpesviruses, **Vet. Microbiol.**, v. 53, p. 17–29, 1996.

SILVA, M. S.; BRUM, M.C.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovinos tipo 1 e 5 isolados de amostras clínicas

no centro-sul do Brasil, Argentina e Uruguai. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 27, n. 10, p. 403-408, 2007.

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, 2010.

STRAUB, O.C. Problems concerning the taxonomy of the “moval type” bovine herpesvirus. **Intervirol**, v. 28, n. 1, p. 1-7, 1982.

STUDDERT, M.J. Bovine encephalitis herpesvirus. **Vet. Rec.**, v. 125, p. 584, 1989.

TEIXEIRA, M. F. B.; ESTEVES, P. A.; COELHO, C. S. S.; SILVA, T. C.; OLIVEIRA, L. G.; ROEHE, P. M. Diferença em níveis de anticorpos neutralizantes contra herpesvirus bovinos tipo 1 (BHV-1) e tipo 5 (BHV-5). **Pesq. Agro. Gaúcha**, v. 4, p. 61-65, 1998.

THIRY, J.; WIDÉN, F.; GRÉGOIRE, F.; LINDEN, A.; BELÁK, S.; THIRY, E. Isolation and characterization of a ruminant Alphaherpesvirus closely related to Bovine Herpesvirus 1 in a free-ranging red deer. **BioMed Central Vet. Res.**, v. 3, n. 26, 2007.

WIRTH, U.V. Comparasion of immediate-early transcripte among bovine herpesvirus type 1 and type 5 strains differing in neurovirulent potential. **Virus Res.**, v. 27, p. 1-12, 1993.

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